

Sirkuler

Informasi Teknologi Tanaman Rempah dan Obat

ISBN 978-979-548-051-8



**PROTOKOL PERBANYAKAN BENIH TEMU LAWAK
(*Curcuma xanthorrhiza*) SECARA IN VITRO**



Kementerian Pertanian
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan
Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat



SCIENCE INNOVATION NETWORKS
www.itsang.pertanian.go.id

Sirkuler

**Informasi Teknologi
Tanaman Rempah dan Obat**



Protokol Perbanyakan Benih Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) Secara *In Vitro*

Sitti Fatimah Syahid dan Endang Hadipoentyanti



Kementerian Pertanian
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan
Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat



SCIENCE. INNOVATION. NETWORKS
www.litbang.pertanian.go.id

Sirkuler

Informasi Teknologi Tanaman Rempah dan Obat



Penanggung Jawab

Kepala Balitro

Dr. Wiratno, M. Env. Mgt

Penyunting Ahli

Ketua Merangkap Anggota

Dr. Devi Rusmin

Anggota

Ir. Agus Ruhnayat

Sondang Suriati, S.Si

Dra. Siti Fatimah Syahid

Penyunting Pelaksana

Dra. Nur Maslahah, M.Si

Efiana, S.Mn.

Miftahudin

Diterbitkan oleh:

Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat

Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan

Alamat Redaksi

Jl. Tentara Pelajar No. 3

Kampus Penelitian Pertanian Cimanggu Bogor 16111

Email: publikasitro@gmail.com

Design Sampul dan Tata Letak :

Miftahudin

Sumber Dana

DIPA 2017

Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat

Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan



KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan ke hadirat Allah Subhanahu wa Ta'ala yang telah memberikan rahmat Nya kepada kita semua sehingga Sirkuler tentang protokol perbanyakan benih temulawak secara *in vitro* dapat terselesaikan. Metode perbanyakan benih melalui kultur jaringan merupakan salah satu alternatif dalam penyediaan benih dalam jumlah massal. Teknik ini memiliki banyak keunggulan diantaranya tidak tergantung musim, tidak memerlukan areal yang luas dalam perbanyakan bahan tanaman, bebas hama dan penyakit serta dapat dipergunakan sewaktu-waktu diperlukan. Selain bertujuan untuk memproduksi benih dalam jumlah massal, teknik ini juga bermanfaat dalam tujuan penyimpanan plasma nutfah.

Dalam makalah ini teknik tersebut diatas disajikan dengan relatif mudah dan lengkap dengan petunjuknya berbagai aspek perbanyakan benih temulawak secara kultur jaringan. Materinya pun dirangkum dengan bahasa yang relatif sederhana dan dilengkapi dengan gambar yang dapat memberikan ilustrasi.

Kami mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang sudah bekerja sama dengan baik untuk mewujudkan terselesaikannya Sirkuler protokol perbanyakan benih temulawak secara *in vitro* dan saran yang membangun sangat diharapkan untuk penyempurnaan sirkuler ini. Semoga sirkuler ini dapat memberikan manfaat bagi pihak yang memerlukannya.

Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Kepala,

Dr. Wiratno, M. Env. Mgt.
NIP. 19630702 198903 1 002

KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR	iv
DAFTAR TABEL	v
PENDAHULUAN	1
PEMILIHAN SUMBER EKSPLAN	3
STERILISASI EKSPLAN	4
PEMBUATAN MEDIA	6
Cara pembuatan stok hara makro media.	9
Cara pembuatan stok hara mikro media	9
Cara pembuatan stok vitamin (kepekatan 1000 kali untul 100 ml)	10
PENANAMAN EKSPLAN	10
Cara penanaman eksplan	10
INISIASI DAN MULTIPLIKASI TUNAS	11
PEMELIHARAAN BIAKAN DAN LINGKUNGAN KULTUR	12
PENGAMATAN	13
AKLIMATISASI	13
PENUTUP	15
DAFTAR PUSTAKA	15

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1. Sumber eksplan temulawak (mata tunas)	3
Gambar 2. Eksplan temulawak siap untuk ditanam pada media tumbuh <i>in vitro</i>	5
Gambar 3. Alat-alat yang diperlukan untuk penanaman <i>in vitro</i>	10
Gambar 4. Penanaman di laminar airflow	11
Gambar 5. Tunas temulawak di media MS +BA 1,5mg/l.	11
Gambar 6. Inisiasi tunas temulawak <i>in vitro</i> umur 1 minggu	11
Gambar 7. Multiplikasi tunas temulawak <i>in vitro</i>	12
Gambar 8. Plantlet temu lawak siap diaklimatisasi	13
Gambar 9. Pemisahan anakan temulawak sebelum proses aklimatisasi ..	13
Gambar 10. Media tanam temulawak untuk aklimatisasi	14
Gambar 11. Penanaman plantlet temulawak ke dalam media tumbuh	14
Gambar 12. Aklimatisasi temulawak di rumah	14
Gambar 13. Benih temulawak umur 2 bulan, siap dipindah ke polibag	14

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1. Komposisi Media MS (Murashige Skoog)	6
Tabel 2. Komposisi larutan stok Media MS dalam satu liter	8

PENDAHULUAN

Kultur jaringan tanaman adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, jaringan atau organ (daun, petal, batang, akar, mata tunas, meristem) serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik dalam media buatan, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap (George *et al.*, 2008).

Teknologi perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan semakin berkembang pesat setelah ditemukannya zat pengatur tumbuh dari golongan auksin di tahun 1940, dan kinetin dari golongan sitokinin di tahun 1955 serta formulasi media dasar untuk menumbuhkan berbagai jenis tanaman oleh T. Murashige dan F. Skoog di tahun 1962 (Lestari, 2008). Saat ini perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan sudah banyak diaplikasikan pada tanaman hortikultura, kehutanan dan perkebunan.

Di Indonesia, aplikasi perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan telah dilakukan mulai tahun 1980, yang difokuskan untuk memperbanyak tanaman. Berkembangnya teknologi kultur jaringan telah banyak diaplikasikan untuk penyimpanan plasma nutfah dan perbaikan tanaman.

Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) merupakan salah satu tanaman obat dari famili *Zingiberaceae* yang potensial untuk dikembangkan. Temulawak adalah tanaman asli Indonesia, namun saat ini sudah banyak dibudidayakan di berbagai negara di dunia diantaranya Malaysia, India, Cina dan Jepang. Temulawak dikenal dengan berbagai sebutan diantaranya di Jawa disebut temulawak, di daerah Sunda (Jawa Barat) dikenal dengan nama koneng gede, serta di Madura dikenal dengan sebutan temu labak.

Temulawak merupakan tanaman semusim, memiliki batang semu yang tegak, berlapis-lapis yang merupakan bagian dari pelepah daun yang saling bertumpang tindih. Batang tanaman berwarna hijau atau hijau kecoklatan. Rimpang utama temulawak berbentuk bulat telur dan berwarna coklat kemerahan dengan bagian daging rimpang berwarna orange. Bagian tanaman yang dimanfaatkan sebagai obat adalah rimpangnya yang memiliki aroma yang tajam serta rasa yang pahit. Rimpang temulawak adalah bagian yang paling banyak digunakan sebagai obat dibandingkan bagian lainnya.

Temulawak merupakan salah satu tanaman obat yang dibudidayakan atas rekomendasi Badan POM (BPS, 2003). Berdasarkan hasil survey, temulawak terdapat

dalam 176 jenis jamu yang beredar di Indonesia dan dapat mengobati 12 kelompok penyakit (Purwakusumah *et al.*, 2008).

Rimpangnya banyak digunakan sebagai bahan baku obat untuk mengobati penyakit lever yang memperbaiki fungsi hati dan menurunkan kadar SGOT (*Serum glutamic oxaloactic transaminase*) dan SGPT atau *Serum glutamic pyruvate transminase* (Syahid dan Hadipoentyanti, 2001). Selain penggunaan sebagai bahan baku obat, bahan baku industri seperti minuman dan pewarna alami, manfaat lain dari temulawak adalah dapat meningkatkan sistem imunitas tubuh, mengobati kanker, mengurangi radang sendi, memperlancar pencernaan dan ASI. Selain itu temulawak berkhasiat sebagai anti-inflamasi, anti tumor, anti diabetes, anti bakteri, anti oksidan, anti mikroba, anti hiperlipidemia dan anti kolera (Raharjo dan Rostiana, 2003; Hwang, 2006 ; Hwang *et al.*, 2000 ; Darusman *et al.*, 2007 ; Rukayadi *et al.*, 2006 dan Masuda *et al.*, 1992).

Banyaknya manfaat dan khasiat dari temulawak berhubungan dengan kandungan kimia yang dimilikinya, diantaranya geranil acetat, curcuminoid, xanthorhizol, kamphor, zerumbon, β -curcumen, zingiberen dan ar-curcumen (Jantan *et al.*, 2012). Senyawa xanthorrhizol dan kurkumin dalam rimpang temulawak inilah yang menyebabkan tanaman sangat berkhasiat obat (Peschel *et al.*, 2006). Ozaki (1991) berhasil menemukan zat aktif germakron di dalam rimpang temulawak yang berfungsi mengurangi rasa sakit.

Semakin berkembangnya industri obat tradisional dan fitofarmaka, permintaan bahan baku temulawak juga makin meningkat. Salah satu upaya penyediaan bahan tanaman dalam jumlah massal adalah dengan perbanyakan benih melalui kultur jaringan. Teknik ini memiliki beberapa keunggulan diantaranya: dapat menghasilkan benih dalam jumlah banyak dan waktu yang relatif singkat, tidak memerlukan ruangan yang luas karena biakan hanya ditumbuhkan dalam botol-botol kultur, tidak tergantung musim karena perbanyakan tanaman di laboratorium, bebas hama penyakit karena perbanyakan tanaman dilakukan dalam kondisi aseptik/steril sehingga benih yang dihasilkan terbebas dari bakteri, jamur, nematode maupun hama lainnya (Pierik, 1987).

Metode perbanyakan benih temulawak secara kultur jaringan telah diperoleh oleh Syahid dan Hadipoentyanti (2000) menggunakan media MS dengan

penambahan zat pengatur tumbuh Benzil Adenin 1,5 mg/l dan menghasilkan multiplikasi tunas sekitar 3-4 tunas dalam waktu delapan minggu. Multiplikasi tunas temulawak *in vitro* menggunakan zat pengatur tumbuh alami air kelapa, dapat menghasilkan 3-4 tunas dalam waktu 2 bulan (Seswita, 2011). Plantlet temulawak hasil kultur jaringan dapat diaklimatisasi dengan baik di tingkat rumah kaca dan tanaman dapat tumbuh normal di lapang.

George *et al.*, (2008) menyatakan bahwa tanaman melalui teknik kultur jaringan dapat dilakukan melalui serangkaian tahapan yaitu pemilihan sumber eksplan, sterilisasi eksplan, pembuatan media tumbuh, penanaman, pemeliharaan dan pengamatan kultur serta aklimatisasi di rumah kaca, dan tahapan tersebut dapat diaplikasikan untuk perbanyakan temulawak secara *in vitro*.

Tahapan dalam memproduksi benih melalui teknik kultur jaringan untuk tanaman temulawak



Gambar 1. Sumber eksplan temulawak (mata tunas)

PEMILIHAN SUMBER EKSPLAN

Sumber eksplan adalah bahan tanaman terpilih yang akan dijadikan bahan tanaman secara *in vitro*. Pada perbanyakan *in vitro* temulawak, sumber eksplan yang digunakan adalah mata tunas yang telah dikecambahkan terlebih dahulu. Mata tunas temulawak yang digunakan sebagai sumber eksplan

sebaiknya berasal dari rimpang yang cukup umur sekitar 9-10 bulan (Gambar 1). Rimpang disimpan dalam ruang penyimpanan dan ditutup karung goni dan dibasahi dengan cara memercikkan air sedikit-sedikit di atas rimpang. Usahakan percikan air yang diberikan jangan terlalu basah karena dapat menyebabkan eksplan menjadi lembab dan busuk. Apabila mata tunas sudah muncul maka eksplan dapat diambil dan dapat digunakan untuk disterilisasi secara *in vitro*.

STERILISASI EKSPLAN

Sterilisasi eksplan bertujuan untuk mematikan kontaminan yang melekat pada eksplan. Sterilisasi mata tunas ini terdiri dari sterilisasi luar (dilakukan di luar *laminar airflow*) dan sterilisasi dalam (dilakukan di dalam *laminar airflow*). Sterilisasi luar terdiri dari pembersihan kulit rimpang, pencucian dengan air mengalir, perendaman dalam larutan detergen, perendaman dalam larutan insektisida berbahan aktif karbosulfan 200 dengan konsentrasi 11 g/l, perendaman dalam larutan fungisida berbahan aktif propineb 70%, serta perendaman dalam larutan bakterisida berbahan aktif streptomisin sulfat 20%.

Tahapan sterilisasi luar mata tunas temulawak :

1. Pemotongan tunas temulawak.
2. Pembersihan kulit rimpang.
3. Pencucian dengan air mengalir
4. Perendaman dalam larutan detergen selama 5 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir selama 10 menit.
5. Perendaman dalam larutan insektisida selama 60 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir sampai bersih.
6. Perendaman dalam larutan fungisida selama 45 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir sampai bersih.

Detergen berfungsi untuk merenggangkan dinding sel, sehingga desinfektan dapat masuk dan mematikan kontaminan *di dalam* jaringan serta berfungsi untuk mengangkat debu dan kotoran fisik lainnya yang menempel pada mata tunas temulawak. Insektisida berbahan aktif karbosulfan 200,11 g/l berfungsi sebagai racun bagi serangga. Fungisida berbahan aktif propineb 70% berfungsi untuk mematikan jamur yang terdapat pada tunas. Setiap selesai melakukan perendaman dalam larutan fungisida, dilakukan pembilasan dengan air mengalir sampai bersih, yang bertujuan

untuk menghilangkan sisa fungisida yang masih menempel pada mata tunas supaya tidak mempengaruhi pekerjaan sterilisasi pada tahap selanjutnya.

Sterilisasi dalam dilakukan di dalam *laminar airflow* dengan tahapan terdiri dari : perendaman eksplan di dalam alkohol 70%, perendaman dalam larutan HgCl_2 0,2 % dan perendaman dalam larutan NaClO 20%.

Tahapan sterilisasi dalam:

1. Perendaman dalam larutan alkohol 70% selama 5 menit, kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali.
2. Perendaman dalam larutan HgCl_2 0,2 % selama 7-9 menit, kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali.
3. Perendaman dalam larutan NaClO 20 % selama 10 menit, kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali.
4. Pembilasan dengan akuades steril sebanyak 3 kali.

Alkohol berfungsi untuk mematikan mikroorganisme yang masih hidup yang terbawa dari sterilisasi yang dilakukan di luar *laminar airflow*. HgCl atau merkuri clorit juga mematikan kontaminan yang masih terbawa dari tahapan sebelumnya. HgCl digunakan karena temulawak rimpangnya berasal dari dalam tanah dengan tingkat kontaminasinya lebih tinggi sehingga diperlukan bahan kimia dengan daya aktivitas tinggi untuk mematikannya. Larutan NaClO 20% berfungsi untuk mematikan



Gambar 2. Eksplan temulawak siap untuk ditanam pada media tumbuh *in vitro*

kontaminan yang masih tersisa atau tersembunyi pada seludang eksplan temu lawak. Tahap *akhir* adalah pembilasan terakhir menggunakan akuades steril sebanyak 3 kali untuk membersihkan sisa-sisa sterilan yang masih menempel pada mata tunas temulawak karena dapat mempengaruhi sterilitas. Setelah itu eksplan siap untuk ditanam pada media tumbuh yang sudah disiapkan (Gambar 2).

PEMBUATAN MEDIA

Keberhasilan dalam kultur jaringan akan dipengaruhi oleh penggunaan media yang digunakan. Media kultur jaringan tidak hanya terdiri dari unsur hara makro, mikro, vitamin dan zat pengatur tumbuh, tetapi juga karbohidrat yang pada umumnya berupa gula untuk menggantikan karbon yang biasanya diperoleh dari atmosfer melalui proses fotosintesis.

Media kultur jaringan merupakan campuran air dan hara yang mengandung garam-garam organik dan zat pengatur tumbuh. Garam-garam anorganik terdiri dari unsur-unsur hara makro (N, P, K, Ca, Mg dan Na) dan unsur-unsur hara mikro (B, Co, Mn, I, Fe, Zn dan Cu). Tanaman membutuhkan unsur hara tersebut untuk melakukan proses-proses metabolisme, terutama pada masa vegetatif. Diharapkan unsur yang terserap dapat digunakan untuk mendorong pembelahan sel dan pembentukan sel-sel baru guna membentuk organ tanaman seperti daun, batang, dan akar yang lebih baik sehingga dapat memperlancar proses fotosintesis (Rizqiani *et al.*, 2007).

Media Murashige and Skoog banyak digunakan sebagai media kultur. Menurut George and Sherington (1984), media MS mengandung garam-garam anorganik yang tinggi. Media MS merupakan media yang sangat luas pemakaiannya karena mengandung unsur hara makro dan mikro yang lengkap sehingga dapat digunakan untuk berbagai spesies tanaman. Komposisi media MS terdiri dari unsur hara makro, unsur hara mikro, besi, vitamin, myoinositol, sukrosa dan bahan pemat (agar). Unsur hara makro MS terdiri dari: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, sedangkan unsur hara mikro terdiri dari: $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, KI, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Besi yaitu $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan Na_2EDTA . Vitamin MS terdiri dari: Thiamine-HCL, Pyridoxine-HCL, Nicotinic Acid dan Glycine. Selain komposisi media dasar tersebut juga dapat ditambahkan zat pengatur tumbuh sesuai perlakuan yang diinginkan.

Tabel 1. Komposisi Media MS (Murashige Skoog)

No.	Komposisi	Konsentrasi (mg/L)	No.	Komposisi	Konsentrasi (mg/L)
	Hara makro		13	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
1	NH_4NO_3	1650	14	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
2	KNO_3	1900	15	Myo-inositol	100

Tabel 1. Komposisi Media MS (Murashige Skoog) **Lanjutan**

No.	Komposisi	Konsentrasi (mg/L)	No.	Komposisi	Konsentrasi (mg/L)
3	CaCl ₂ .2H ₂ O	440		Vitamin	
4	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	16	Myo-Inositol	100
5	KH ₂ PO ₄	170	17	Asam nikotinat	0,5
	Hara mikro		18	Piridoksin	0,5
6	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	19	Thiamin HCL	0,1
7	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3		Sumber Karbon	
8	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	20	Sukrosa	30.000
9	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6		Bahan lain	
10	H ₃ BO ₃	6,2	21	Agar	8 g/l
11	KI	0,83		pH media	5.8
12	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25		Zat pengatur tumbuh	Sesuai perlakuan media

Sumber : George and Sherington (1984).

Prinsip dasar dalam pembuatan media adalah penyediaan larutan stok yang akan digunakan untuk membuat berbagai media perlakuan. Larutan stok yang digunakan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat yaitu stok unsur makro, stok unsur mikro, vitamin dan zat pengatur tumbuh. Stok hara makro dan mikro dapat disimpan dalam jangka waktu 4-8 minggu sedangkan stok vitamin lebih singkat, hanya 1-2 minggu. Adanya larutan stok yang tersedia, pembuatan media dapat dilakukan dengan teknik pengenceran dan pencampuran.

Dalam pembuatan larutan stok, dibutuhkan ketelitian dalam melakukan penimbangan dan pencampuran bahan kimianya. Bahan kimia yang ditimbang harus sesuai dengan komposisi yang telah ditentukan, serta tidak boleh dikurangi maupun dlebihkan karena akan berpengaruh terhadap keseimbangan pertumbuhan tanaman.

Untuk memudahkan dalam pembuatan media dan menghemat pekerjaan menimbang bahan kimia secara berulang-ulang dan menghindari penimbangan dalam jumlah yang sangat sedikit, diperlukan larutan stok dari masing-masing komposisi yang diinginkan. Banyaknya larutan stok yang dibuat tergantung kebutuhan. Larutan stok dapat dibuat untuk 25, 50, 100 kali dan seterusnya. Unsur hara makro dapat dibuat 20 kali kepekatan untuk satu liter media. Untuk unsur mikro dapat dibuat 100 kali kepekatan dalam satu liter media dan vitamin dapat dibuat 1000 kali kepekatan dalam satu liter media. Sebagai contoh adalah pembuatan larutan stok media MS yang digunakan di laboratorium kultur jaringan Balitro (Tabel 2).

Prinsip dasar dalam pembuatan larutan stok yaitu melarutkan satu persatu unsur hara secara berurutan dimulai dari bobot molekul yang paling kecil ke bobot molekul yang paling besar. Setiap unsur dilarutkan satu persatu sampai benar-benar larut kemudian unsur yang lain berikutnya.

Tabel 2. Komposisi larutan stok Media MS dalam satu liter

No.	Komposisi	(mg/l)	g/l	kepekatan (mg/l)	Pemakaian untuk 1 liter
	Hara makro			20 x	
1	NH ₄ NO ₃	1650	1,65	33000	50 ml
2	KNO ₃	1900	1,9	38000	
3	CaCl ₂ .2H ₂ O	440	0,44	8800	
4	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	0,37	7400	
5	KH ₂ PO ₄	170	0,17	3400	
	Hara mikro			100 x	
6	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	0,0278	2,78	10 ml
7	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	0,0373	0,025	
8	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	0,0223	2,23	
9	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	0,0086	0,86	
10	H ₃ BO ₃	6,2	0,0062	0,62	
11	KI	0,83	0,00083	0,083	
12	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,00025	0,025	
13	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,000025	0,0025	
14	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,000025	0,0025	
	Vitamin			1000 x	
15	Asam nikotinat	0,5	0,0005	0,5	1 ml
16	Piridoksin	0,5	0,0005	0,5	
17	Thiamin	0,1	0,0001	0,1	
	Myo-inositol			100 x	
15	Myo-Inositol	100	0,1	10	10 ml
	Sumber karbon				
19	Sukrosa	30,000			
	Bahan lain				
20	Agar	8 g/l			
	pH media	5,8			
	Zat pengatur tumbuh	Sesuai perlakuan media			

Cara pembuatan stok hara makro media.

1. Bahan kimia yang akan digunakan seperti unsur hara makro, ditimbang menggunakan timbangan analitik sesuai jumlah yang sudah ditentukan.
2. Bahan yang sudah ditimbang kemudian dilarutkan satu persatu ke dalam akuades yang sudah diisikan ke dalam erlemeyer sesuai dengan komposisi yang paling besar. Pembuatan larutan dimulai dengan melarutkan unsur $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , dan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Bahan kimia $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan paling akhir karena memiliki bobot molekul paling besar sehingga menghindari terjadinya pengendapan. Semua bahan yang dilarutkan diaduk secara merata menggunakan *hot plate magnetic stirrer*. Setelah semua unsur hara makro larut, maka larutan ditara sampai volume mencapai 1000 ml menggunakan gelas ukur.
3. Larutan stok hara makro yang sudah jadi sebanyak 1000 ml dimasukkan ke dalam botol gelas bervolume 1200 ml, berwarna coklat. Selanjutnya botol diberi label dan tanggal pembuatan stok dan disimpan pada suhu ruang.
4. Larutan stok hara makro ini dapat digunakan untuk 20 kali pemakaian pembuatan media masing-masing 1 liter.

Cara pembuatan stok hara mikro media.

1. Bahan kimia unsur hara mikro, ditimbang menggunakan timbangan analitik sesuai jumlah yang sudah ditentukan.
2. Bahan yang sudah ditimbang kemudian dilarutkan satu persatu ke dalam akuades yang sudah diisikan di dalam erlemeyer yaitu $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, KI dan $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Pembuatan larutan stok Fe+EDTA dimulai dengan melarutkan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan NaEDTA. Semua bahan yang dilarutkan diaduk secara merata menggunakan *hot plate magnetic stirrer*. Setelah semua unsur hara mikro larut, maka larutan ditara sampai volume mencapai 1000 ml menggunakan gelas ukur.
3. Larutan stok hara mikro yang sudah jadi sebanyak 1000 ml dimasukkan ke dalam botol gelas bervolume 1200 ml, berwarna coklat. Selanjutnya botol diberi label dan tanggal pembuatan stok hara mikro tersebut dan disimpan pada suhu ruang.
4. Larutan stok hara mikro ini dapat digunakan untuk 100 kali pemakaian pembuatan media masing-masing 1 liter dengan menggunakan larutan stok sebanyak 10 ml dalam membuat 1 liter media.
5. Larutan FeEDTA dipisahkan wadah penyimpanannya dengan larutan mikro dan disimpan dalam lemari pendingin (kulkas).

Cara pembuatan stok vitamin (kepekatan 1000 kali untul 100 ml).

1. Timbang bahan-bahan yang diperlukan menggunakan timbangan analitik
2. Masukkan satu persatu bahan-bahan tersebut ke dalam erlemeyer yang telah berisi akuades sebanyak 50 ml sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*.
3. Setelah semua bahan terlarut sempurna, dilakukan peneraan volume vitamin menjadi 100 ml menggunakan labu ukur.
4. Larutan stok vitamin harus disimpan di dalam lemari pendingin (kulkas).

PENANAMAN EKSPLAN

Penanaman eksplan adalah proses mengkulturkan/menanam eksplan temulawak ke dalam media tumbuh. Proses ini dilakukan setelah media disterilisasi dan diinkubasi selama 1 - 2 minggu. Kegiatan penanaman dilakukan di *laminar air flow* yang kondisinya steril. Sebelum aktivitas penanaman dimulai, *laminar air flow* disinari dengan lampu ultra violet selama 1-2 jam agar terhindar dari kontaminan yang akan mengurangi keberhasilan kultur.

Alat dan bahan yang diperlukan dalam kegiatan ini adalah: 1) *laminar air flow*, 2) cawan petri, 3) sumber eksplan, 4) lampu spiritus, 5) botol berisi alkohol 96% untuk sterilisasi pinset, pisau dan gunting, 6) sprayer berisi alkohol 70% untuk menyemprot tangan dan bagian dalam *laminar air flow*, dan 7) media yang akan digunakan (Gambar 3).



Gambar 3. Alat-alat yang diperlukan untuk penanaman *in vitro*

Cara penanaman eksplan

1. Masker mulut sebaiknya dipakai sebelum melakukan kegiatan penanaman.
2. Penananan dimulai dengan menyemprot alat dan bahan yang akan digunakan dengan alkohol 70 %, lalu dimasukkan ke dalam *laminar air flow*. Selanjutnya ke dua tangan yang akan melakukan penanaman juga disemprot dengan alkohol 70 %.

3. Menyalakan lampu spiritus yang terdapat dalam *laminar air flow*.
4. Eksplan yang sudah steril diletakkan di dalam cawan petri steril. Tutup botol kultur dibuka di dekat spiritus dan bibir botol dipanaskan sebentar.
5. Eksplan yang sudah berada dalam cawan petri dimasukkan ke dalam botol media menggunakan pinset steril (Gambar 4).
6. Botol ditutup rapat dengan *aluminium foil* dan diikat dengan karet. Kemudian dilapisi dengan *cling wrap* supaya lebih rapat untuk menghindari masuknya kontaminan ke dalam botol media (Gambar 5).
7. Botol kultur diberi label dan diberi tanggal saat penanaman.
8. Botol-botol kultur yang telah tertanami disimpan/diinkubasi pada rak rak kultur di dalam ruang kultur yang memiliki suhu 25 - 27°C dengan intensitas penyinaran sebesar 1000 lux selama 16 jam dalam sehari.



Gambar 4. Penanaman di *laminar airflow*



Gambar 5. Tunas temulawak di media MS+BA 1,5 mg/l.

INISIASI DAN MULTIPLIKASI TUNAS

Tunas-tunas steril temulawak yang sudah ditanam pada media MS yang diperkaya BA 1,5 mg/l mulai memperlihatkan inisiasi pertumbuhan satu minggu setelah tanam. Inisiasi ditandai dengan berubahnya warna ujung tunas menjadi hijau muda (Gambar 6). Bertambahnya umur tanaman, tunas menjadi semakin membesar dan akhirnya terbentuk tunas-tunas baru.



Gambar 6. Inisiasi tunas temulawak *in vitro* umur 1 minggu

Jumlah tunas dapat ditingkatkan dengan melakukan sub kultur ke media yang sama dengan media awal. Semakin tinggi frekuensi sub kultur semakin banyak multiplikasi tunas yang dihasilkan (Gambar 7). Dari hasil penelitian diperoleh multiplikasi tunas temulawak dalam media MS + BA 1,5 mg/l dalam waktu delapan minggu sekitar 3,65 tunas (Hadipoentyanti dan Syahid, 2010).



Gambar 7. Multiplikasi tunas temulawak *in vitro*

PEMELIHARAAN BIAKAN DAN LINGKUNGAN KULTUR

Pemeliharaan kultur meliputi kegiatan pemindahan kultur/sub kultur ke media tumbuh baru yang komposisinya sama atau berbeda dengan media awal. Kegiatan pemeliharaan kultur tergantung kepada tujuan. Seringkali kultur harus dipindahkan ke media yang sama dalam jangka waktu tertentu ataupun ke media lain dengan perlakuan yang berbeda. Selama proses pengkulturan, dilakukan pemantauan terhadap kondisi lingkungan kultur diantaranya: 1) suhu ruangan, 2) kelembapan udara dalam ruangan, dan 3) pencahayaan kultur. Semua kondisi lingkungan harus sesuai dengan kebutuhan tanaman yang akan dikulturkan.

Ruang inkubasi memerlukan cahaya yang cukup. Cahaya ini penting untuk memacu perkembangan eksplan. Unsur-unsur yang penting adalah: 1) kualitas cahaya, 2) panjang penyinaran dan 3) intensitas cahaya. Temperatur ruang kultur juga menentukan respon fisiologi kultur. Lampu floresen dapat digunakan sebagai sumber cahaya karena sangat efisien di dalam penggunaan energi dibandingkan dengan lampu pijar. Intensitas cahaya yang baik dari lampu floresen yang umum digunakan dalam ruang kultur adalah 1000 lux. Intensitas cahaya diatur dengan menempatkan beberapa lampu dengan kekuatan tertentu pada jarak 40 - 50 cm dari tabung kultur. Panjang penyinaran yang biasa digunakan dan dapat memberikan pertumbuhan kultur optimal adalah selama 14 - 16 jam pada kondisi terang dan 8 jam pada kondisi gelap. Pengaturan kondisi gelap terang dilakukan menggunakan timer yang dipasang pada rak-rak kultur. Temperatur di dalam ruang kultur ditetapkan sekitar 25 - 27°C. Pada kisaran temperatur tersebut pertumbuhan kultur berlangsung optimal. Kondisi ruang kultur sangat penting untuk diperhatikan karena perubahan

temperatur secara mendadak, akibat tidak berfungsinya alat pendingin ruangan, akan berpengaruh negatif terhadap pertumbuhan kultur.

PENGAMATAN

Pengamatan kultur temulawak dilakukan mulai umur satu minggu setelah tanam. Inisiasi tunas temulawak biasanya mulai terlihat satu minggu setelah eksplan dikulturkan pada media tumbuh. Inisiasi eksplan ditandai dengan berubahnya warna tunas menjadi hijau muda. Pengamatan selama periode *in vitro* meliputi waktu inisiasi tunas, jumlah tunas yang terbentuk, panjang tunas, jumlah akar, panjang akar dan visual kultur. Pengamatan dapat dilakukan setelah perlakuan dengan jangka waktu setiap satu minggu.

AKLIMATISASI

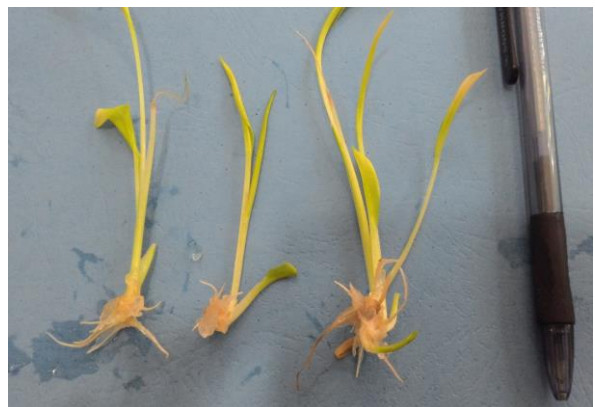
Aklimatisasi adalah proses adaptasi tanaman yang berasal dari kultur *in vitro* yang aseptik ke lingkungan *in vivo* yang septik. Aklimatisasi dilakukan dengan mengkondisikan akar tanaman asal kultur *in vitro* agar segera berfungsi, namun penguapan dari daun diupayakan seminimal mungkin.

Tahapan aklimatisasi temulawak dapat dilakukan sebagai berikut:

1. Plantlet dikeluarkan dari botol kultur, kemudian dicuci dengan air mengalir sampai bersih terutama bagian akarnya (Gambar 8). Pencucian plantlet harus dilakukan sampai bersih karena sisa agar yang masih menempel pada akar dapat menyebabkan kontaminasi jamur sehingga tanaman mati.



Gambar 8. Plantlet temulawak siap diaklimatisasi



Gambar 9. Pemisahan anakan temulawak sebelum proses aklimatisasi

2. Pemisahan anakan temulawak dilakukan secara hati-hati agar akar tanaman tidak putus (Gambar 9).
3. Media tanam disiapkan yaitu terdiri dari campuran tanah dan sekam dengan perbandingan 1 : 1.
4. Media dimasukkan ke dalam gelas plastik atau polibag ukuran 15 x 10 cm yang telah dilubangi bagian bawahnya (Gambar 10).
5. Penanaman benih temulawak dilakukan dengan memasukkan benih ke dalam media yang telah disiapkan sebanyak 1 tunas per gelas plastik atau polibag kecil (Gambar 11).
6. Media tanam disiram dengan air lalu diberi sungkup kantong plastik bening (Gambar 12), dan diberi label pada gelas plastik berupa tanggal aklimatisasi. Penyungkupan dengan kantong plastik bertujuan untuk menjaga kelembaban di sekitar tanaman yang diaklimatisasi, karena plantlet asal *in vitro* harus beradaptasi dari kondisi lingkungan heterotrof ke lingkungan autotrof. Penyungkupan dilakukan selama 6 - 8 minggu sampai tanaman cukup kuat. Selama proses aklimatisasi, kelembaban dikurangi secara bertahap dengan cara membuka sungkup



Gambar 10. Media tanam temulawak untuk aklimatisasi



Gambar 11. Penanaman plantlet temulawak ke dalam media tumbuh



Gambar 12. Aklimatisasi temulawak di rumah



Gambar 13. Benih temulawak umur 2 bulan, siap dipindah ke polibag

apabila tanaman sudah mulai tampak tegar dan kuat. Pada umur dua bulan, tanaman sudah cukup kuat untuk segera dipindah ke polybag (Gambar 13). Selanjutnya tanaman dipelihara di rumah kaca selama 2 bulan sebelum dipindahkan pada kondisi lapang.

PENUTUP

Perbanyakan benih temulawak dapat dilakukan melalui kultur *in vitro*. Serangkaian tahapan dilakukan diawali dengan pemilihan sumber eksplan, sterilisasi eksplan, pembuatan media kultur, penanaman, pemeliharaan dan aklimatisasi. Media kultur yang digunakan untuk perbanyakan temulawak *in vitro* adalah media Murashige dan Skoog (MS) yang diperkaya dengan zat pengatur tumbuh Benzil Adenin 1,5 mg/l. Aklimatisasi temulawak dilakukan dengan menggunakan media tumbuh tanah + sekam padi bakar (1:1), sampai tanaman berumur dua bulan dan siap dipindah ke polibag.

DAFTAR PUSTAKA

- Darusman, L.K ., B.P. Priosoeryanto., M. Hasanah., M. Rahardjo dan E.D. Purwakusumah, 2007. Potensi temulawak terstandar untuk menanggulangi flu burung. Laporan Hasil penelitian, Institut Pertanian Bogor bekerja sama dengan Badan Litbang Pertanian. 46 hlm.
- George.E.F., M.A. hall and G.J. de Klerk, 2008. Plant tissue culture procedure- background: *In Plant propagation by tissue culture*. George,E.F., M.A. Hall and G.J. de Klerk (eds). Springer : 1-28.
- George, E.F and P. D. Sherington, 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics Ltd, England, 709p.
- Hadipoentyanti, E dan S.F. Syahid, 2010. Progress research of temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) to provide healthy planting material by *in vitro* culture. Proceeding International Conference and Talkshow on Medicinal Plant. Jakarta, 19th-21st of October 2010: 128-143.
- Hwang, J.K.,J.S. Shim and Y.R. Pyun, 2000. Antibacterial activity of xanthorrhizol from *Curcuma xanthorrhiza* against oral pathogens. *Fitoterapia*. 71:321-323.
- Hwang, J. K. 2006. Xanthorrhizol: A New Bioactivity Natural Compound. Yonsei. Orat Departement of Biotechnology. Yonsei University.

- Lestari, E.G, 2008. Kultur jaringan: Menjawab persoalan pemenuhan kebutuhan akan peningkatan kualitas bibit unggul dan perbanyakannya seraca besar-besaran. Penerbit Akademia, Bojong Gede, Bogor. 60 hlm.
- Masuda, T., I. Junko., A. Jitoe and N. Nakatani, 1992. Antioxidative curcuminoide from rhizome of *Curcuma xanthorrhiza*. *Phytochemistry* . 31(10): 3645-3647.
- Jantan, I., F.C. Saputri., M.N. Qaisar and F. Buang, 2012. Correlation between chemical composition of *Curcuma domestica* and *Curcuma xanthorrhiza* and their antioxidant effect on human low-density lipoprotein oxidation. *Evidence-Based complementary and Alternative Medicine*. Vol 2012, Article ID 438356 10p.
- Ozaki, Y. 1991. Antiinflammatory effect of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. And its active principle. *Chemical Pharmaceutical Buletin* 38(4):1045-1048.
- Peschel, P.A., R. Koerting and N. Nass. 2006. Curcumin induces changes in expression of genes in volved in cholesterol homeostasis. *J. Nutr. Biochem.* 18: 113-119.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publisher. London. 344p.
- Purwakusumah, E.D., Y. Lestari., M. Rahminiwati., M. Ghulamahdi., B. Barus dan M. Machmud. M.T. 2008. Menjadikan temulawak sebagai bahan baku utama industri berbasis kreatif yang berdaya saing. Pusat Studi Biofarmaka LPPM-IPB. *E-mail:bfarmaka@gmail.com*, 24hlm.
- Raharjo, M dan O. Rostiana. 2003. Standar prosedur operasional budidaya temulawak. Circular No. 8: 33-38.
- Rukayadi., Y.D. Yong and J.K. Hwang, 2006. *In vitro* anticandidal activity of xanthorrhizol isolated from *Curcuma xanthorrhiza*. *J. Antimicrob Chemother*, 132: 1-4.
- Seswita, D. 2010. Penggunaan air kelapa sebagai zat pengatur tumbuh pada multiplikasi tunas temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) *in vitro*. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri* Vol 16(4): 135-140.
- Syahid, S.F dan E. Hadipoentyanti. 2001. Pertumbuhan dan produksi rimpang temulawak di polibag yang benihnya hasil kultur *in vitro*. *Jurnal Biologi Indonesia* . Vol III (2): 118-125.

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN BALAI PENELITIAN TANAMAN REMPAH DAN OBAT

UNIT PENGELOLAAN BENIH SUMBER TANAMAN REMPAH, OBAT DAN ATSIRI



SCIENCE.INNOVATION.NETWORKS
www.litbang.pertanian.go.id

UPBS Tanaman Rempah, Obat dan Atsiri
Kampus Penelitian Pertanian Cimanggu
Jl. Tentara Pelajar No. 3 Bogor 16111

TELEPON : 0251-832879; FAKSIMILE : 0251-8327010
E-MAIL : balitro@telkom.net, balitro@litbang.deptan.go.id
WEBSITE : <http://balitro.litbang.deptan.go.id>

PRODUKSI BENIH SUMBER TANAMAN REMPAH, OBAT DAN ATSIRI

Benih merupakan tanaman atau bagiannya yang dipergunakan untuk memperbanyak dan/atau mengembangbiakkan tanaman.



Tanaman	Nama varietas
Lada	Petaling 1, Petaling 2, Natar 1, Natar 2, Chunuk, LDK, Bengkayang
Vanili	Vania 1 dan Vania 2
Pala	Banda, Ternate 1, Tobelo 1, Tidore 1
Cengkeh	Zanzibar Karo, AFO, Zanzibar Gorontalo, Tuni bursel.
Jambu Mete	Meteor YK, Gunung gangsir1 (GG-1), B02, SM 09 (Segayung Muktiharjo), Muna, PK36, Flotim 1, Ende 1, MR 851

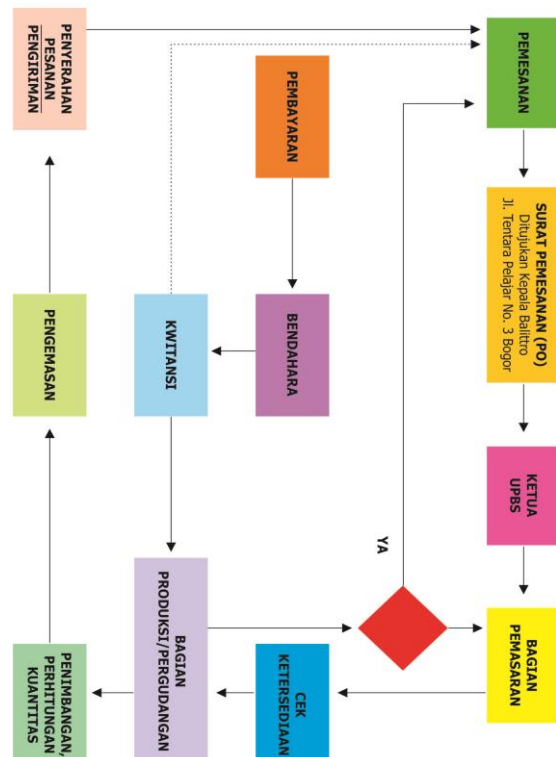


Sebutir Benih Sejuta Harapan



Tanaman	Nama varietas
Jahe Putih Besar	Cimanggu 1
Jahe Putih Kecil	Halina 1, Halina 2, Halina 3, Halina 4
Jahe Merah	Jahira 1, Jahira 2
Kencur	Galesia 1, Galesia 2, Galesia 3
Kunyit	Turina 1, Turina 2, Turina 3, Curdonia 1.
Temulawak	Cursina 1, Cursina 2, Cursina 3
Pegagan	Castina 1 dan Castina 3
Sambilo	Sambina 1
Purwoceng	Pruacan 1
Nilam	Tapaktuan, Sidikalang, Lhokseumawe, Patchoulina 1 dan 2
Serai wangi	G1
Mentha	Mearsia 1
Akar wangi	Verina 1, Verina 2

DIAGRAM ALUR PEMESANAN BIBIT UPBS





Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan
Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat

Jl. Tentara Pelajar No. 3 Cimanggu Bogor 16111

Telp. (0251) 8321879 ; Fax. (0251) 8327010

Email : balitro@litbang.deptan.go.id ; balitro@telkom.net

Website : www.balitro.litbang.deptan.go.id