

LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi larutan stok media kultur MS (Murashige & Skoog, 1962)

NO	Nama Komponen	Formula Kimia	Konsentrasi Standar (mg/L)
		Makronutrien	
1	Ammonium nitrat	NH_4NO_3	1650,00
2	Kalium nitrat	KNO_3	1900,00
3	Kalsium klorida dihidrat	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440,00
4	Magnesium sulfat heptahidrat	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370,00
5	Kalium dihidrogen fosfat	KH_2PO_4	170,00
		Mikronutrien	
6	Asam borat	H_3BO_3	6,20
7	Mangan sulfat tetrahidrat	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,30
8	Seng sulfat heptahidrat	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,60
9	Kalium iodida	KI	0,83
10	Natrium molibdat dihidrat	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
11	Tembaga sulfat pentahidrat	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
12	Kobalt klorida heksahidrat	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
		Stok Besi (Iron Stock)	

13	Besi(II) sulfat heptahidrat	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,80
14	Disodium EDTA	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,30
		Vitamin dan Bahan Organik	
15	myo-Inositol	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	100,00
16	Nikotinat (Asam nikotinat)	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	0,50
17	Piridoksin-HCl	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$	0,50
18	Tiamin-HCl	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$	0,10
19	Glisin	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	2,00

Sumber komposisi media MS: Murashige, T., & Skoog, F. (1962). *A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures*. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.

Dalam pembuatan media MS utuh (100%), sumber karbon umum yang ditambahkan adalah Sukrosa sebanyak 30.000 mg/L (30 g/L) dengan pH media diatur pada kisaran 5,6–5,8 sebelum diautoklaf.

Lampiran 2. Dokumentasi kegiatan penelitian

Gambar X.1 Persiapan Explan Awal



Menampilkan kumpulan biji bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) varietas Mammoth yang masih utuh di dalam wadah kaca (cawan petri). Biji-biji tersebut berukuran besar dengan garis abu-abu keputihan khas varietas Mammoth.

Tahap ini menunjukkan bahan eksplan sebelum dilakukan proses sterilisasi. Kulit biji (pericarp/hull) yang tebal, keras, dan mengandung lapisan lipid masih terpasang utuh untuk melindungi embrio di dalamnya.

Gambar X.2 Proses Pra-Sterilisasi (Diluar LAFC)



Tahap 1. Proses pencucian ekplan dengan detergen cair

Botol kaca berisi larutan detergen cair berwarna hijau yang digunakan untuk merendam dan mencuci biji guna menghilangkan kotoran serta debu permukaan.



Tahap 2. Proses pencucian ekplan dengan Dithane (anti jamur)

Botol-botol kultur berisi larutan keruh kekuningan (Dithane) untuk membunuh atau menekan spora cendawan yang menempel pada kulit luar biji.



Tahap 3. Proses pencucian ekplan dengan betadine

Botol berisi larutan berwarna kemerahan/cokelat bersama botol Betadine, digunakan sebagai antiseptik permukaan tambahan sebelum masuk ke ruang kerja steril.

Gambar X.3 Proses Sterilisasi Utama (Di Dalam LAFC



Kondisi di dalam Laminar Air Flow Cabinet saat kamu melakukan sterilisasi bertahap (double disinfection), seperti saat merendam biji ke dalam variasi konsentrasi alkohol (10%, 20%, 30%) dan larutan Bayclin, hingga proses inokulasi eksplan ke dalam botol kultur.

Gambar X.4 Eksplan Steril dan Keberhasilan Perkecambahan Optimal



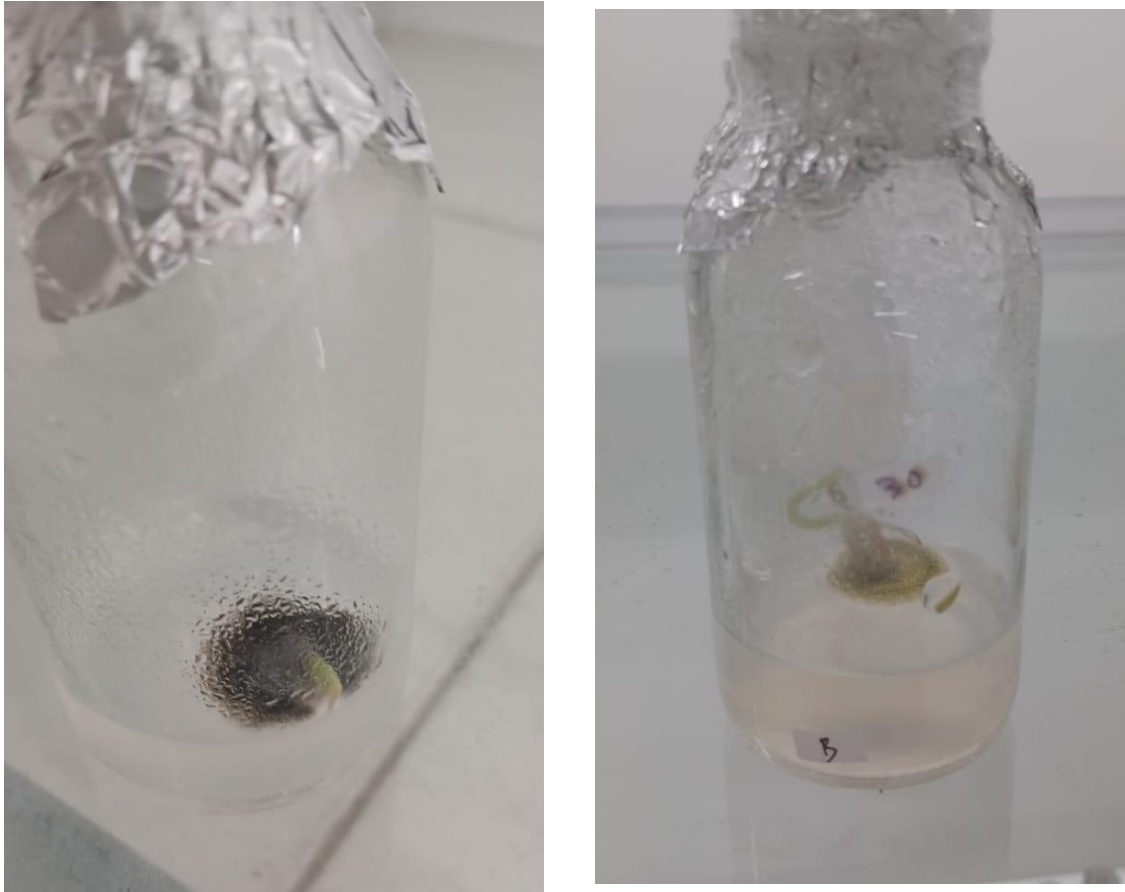
Foto hasil positif kultur jaringan. Menunjukkan eksplan biji bunga matahari di dalam botol kultur yang dalam kondisi 100% steril (bebas dari jamur dan bakteri) serta berhasil memecah kulit biji dan memunculkan tunas/kecambah hijau yang sehat.

Gambar X.5 Bukti Visual Kontaminasi Bakteri



Dokumentasi hasil kegagalan/terkontaminasi oleh bakteri. Cirinya berupa lapisan lendir basah, eksudat keruh, atau cairan kental berwarna putih/krem di sekeliling biji atau permukaan media. Gejala ini sangat dominan muncul pada perlakuan kontrol (0% alkohol / P0).

Gambar X.6 Bukti Visual Kontaminasi Cendawan/Jamur



Menampilkan pertumbuhan miselium berbentuk serabut halus, benang-benang seperti kapas, atau bulu-bulu halus. Warna jamur bisa bervariasi tergantung jenis spora, mulai dari putih (seperti kapas/serabut), hijau, hitam, hingga abu-abu.



(Menampilkan pertumbuhan miselium jamur berbulu pada periode akhir pengamatan 9-12 HSI, terutama pada taraf P3)

Gambar X.7 Hasil Pertumbuhan dari pengamatan 1 - 4



Pengamatan I (3 Hari Setelah Inokulasi / 3 HSI)

Pada pengamatan hari ke-3, sebagian besar media kultur masih terlihat bening dan bersih dari kontaminan, terutama pada perlakuan dengan sterilisasi alkohol (P1, P2, dan P3).

Eksplan biji bunga matahari mulai menyerap air dari media (imbibisi), ditandai dengan pembengkakan ukuran biji dan peretakan kulit luar (pericarp). Pada beberapa botol kultur yang steril, struktur radikula (calon akar) mulai mendobrak kulit biji dan muncul keluar sepanjang 1–2 mm



Pengamatan II (6 Hari Setelah Inokulasi / 6 HSI)

Proses morfogenesis berjalan pesat pada eksplan yang bebas kontaminasi. Radikula memanjang dengan jelas dan mulai mengarah ke bawah menembus media, disusul oleh pemanjangan hipokotil yang menembus kulit biji. Tunas muda mulai tampak berwarna hijau muda/kuning pucat.



Pengamatan III (9 Hari Setelah Inokulasi / 9 HSI)

Pada eksplan steril di perlakuan P2 (alkohol 20%), kecambah tumbuh sangat responsif. Tunas berkembang pesat, kotiledon (daun lembaga) mulai terbuka sempurna, serta menunjukkan warna hijau segar yang menandakan proses fotosintesis dan pembentukan klorofil berlangsung normal di bawah pencahayaan ruang kultur.



Pengamatan IV (12 Hari Setelah Inokulasi / 12 HSI - Evaluasi Final)

Eksplan steril pada perlakuan optimal telah berkembang menjadi plantlet/kecambah utuh yang kokoh. Terlihat struktur tanaman muda yang lengkap mencakup akar primer yang bercabang, batang hipokotil yang tegak memanjang, serta daun kotiledon yang mekar sempurna. Eksplan ini dinyatakan berhasil tumbuh secara aseptik dan siap untuk dinilai tingkat efisiensinya dalam prosedur sterilisasi jaringan.