

BUKU PETUNJUK PRAKTIKUM
KULTUR JARINGAN TUMBUHAN



Oleh:
Dr. Dra. Tri Mulyaningsih, M.Si
Dra. Aida Muspiah, M.Si



PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS MATARAM

PRAKATA

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan pujian bagi Allah SWT, berkat segala bantuanNya buku Petunjuk Praktikum Kultur Jaringan Tumbuhan dapat terselesaikan. Buku Petunjuk Praktikum ini diperuntukkan untuk mahasiswa/wi Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Mataram. Buku ini dimaksudkan untuk memandu mahasiswa dalam melakukan praktikum Kultur Jaringan Tumbuhan di Laboratorium.

Dengan melakukan praktikum kultur jaringan tumbuhan diharapkan para mahasiswa dapat melakukan sterilisasi alat, ruang kultur, dan bahan tanam (eksplan) dengan benar; mahasiswa juga akan menjadi trampil membuat berbagai macam media kultur jaringan tumbuhan dan cara mensterilkannya; mahasiswa juga akan menjadi trampil dalam menanam eksplan dari berbagai macam organ yang berasal dari beragam jenis tanaman.

Para praktikan diharapkan dapat menggunakan kesempatan praktikum kultur jaringan tumbuhan dengan sebaik-baiknya, sebagai bekal ketrampilan di hari kemudian. Oleh karena itu, apabila para pratikan mengalami kesulitan dalam memahani materi ataupun prosedur kerja yang dipraktikumkan, jangan segan-segan untuk langsung menanyakan kepada co-asisten.

Mataram, April 2021

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
PRAKATA	ii
DAFTAR ISI	iii
TATA TERTIB PRAKTIKUM	iv
ACARA I : Pengenalan Tata Ruang dan Alat Kultur Jaringan	1
ACARA II : Sterilisasi Alat	2
ACARA III : Pembuatan Media	4
ACARA IV : Menabur biji Anggrek Muda (<i>Embryo Resque</i>)	13
ACARA V : Kultur Jaringan Untuk Menginduksi Kalus	16
ACARA VI : Kultur Organ (Multiplikasi/Organogenesis)	18
ACARA VII : Kultur Anther dan Polinia	20
ACARA VIII: Kultur Meristem Untuk Memperoleh Tanaman Bebas Virus	22
DAFTAR PUSTAKA	24

TATA TERTIB PRAKTIKUM

1. Praktikan harus datang sekurang-kurangnya 5 menit sebelum praktikum dimulai.
2. Di dalam ruang laboratorium, praktikan harus mengenakan jas praktikum berwarna putih dan sepatu, praktikan tidak diperkenankan mengenakan sandal, kecuali di dalam ruang steril (Ruang Transfer) dan Ruang Inkubator, alas kaki harus dilepas.
3. Setiap praktikan harus melakukan seluruh acara materi praktikum, dan menyerahkan seluruh laporan acara praktikum, bagi praktikan yang tidak dapat melengkapinya seluruh acara praktikum maka nilai praktikum Kultur Jaringan Tumbuhan tidak dapat diproses.
4. Praktikan dilarang merokok, makan dan minum di dalam laboratorium.
5. Sebelum praktikum dimulai, para praktikan akan dites terlebih dahulu mengenai materi praktikum yang akan dilakukan pada hari tersebut.
6. Barang siapa yang dengan sengaja membuat gaduh atau berbuat kecurangan-kecurangan akan dikeluarkan dari ruang praktikum.
7. Barang siapa yang merusak/ memecahkan bahan atau alat-alat praktikum harus menggantinya.
8. Hal-hal khusus yang belum tertulis dalam peraturan tata tertib ini akan ditentukan kemudian.
9. Laporan Praktikum diketik menggunakan huruf Time Roman ukuran 12pt, dalam format Word, Softcopy dikirim ke email co-ass.

ACARA I

PENGENALAN TATA RUANG, ALAT DAN BAHAN KULTUR JARINGAN

Tujuan: Mengenal tata ruang dan alat-alat yang digunakan di dalam kultur jaringan tanaman serta melatih mahasiswa untuk mendesign laboratorium kultur jaringan.

Hal-hal yang harus diamati dan dicatat di dalam laboratorium kultur jaringan adalah:

1. Ruangan yang ada di dalam laboratorium kultur jaringan tumbuhan?
2. Alat-alat yang digunakan dalam kultur jaringan.
3. Jenis tempat penyimpanan.
4. Alat-alat yang berada di dalam ruang steril.
5. Alat-alat yang berada di dalam ruang pertumbuhan.
6. Peralatan yang digunakan untuk pembuatan media.
7. Peralatan yang digunakan untuk membersihkan dan sterilisasi ruangan kultur.
8. Peralatan yang digunakan dalam sterilisasi eksplan.
9. Peralatan yang digunakan untuk mencuci alat-alat untuk membuat media kultur jaringan tumbuhan atau menanam eksplan.

Cara Kerja:

1. Gambarlah secara skematik tata ruang laboratorium kultur jaringan. Ruang apa saja yang mutlak harus ada dan bagaimana tata letaknya.
2. Tulislah alat-alat yang mutlak harus ada di dalam laboratorium kultur jaringan.
3. Tulislah jenis-jenis tempat penyimpanan.
4. Tulislah alat-alat yang berada di dalam ruang steril.
5. Tulislah alat-alat yang berada di dalam ruang pertumbuhan.
6. Tulislah peralatan yang digunakan untuk pembuatan media.
7. Tulislah peralatan yang digunakan untuk membersihkan dan sterilisasi ruangan kultur.
8. Tulislah peralatan yang digunakan dalam sterilisasi eksplan.

9. Tulislah peralatan yang digunakan untuk mencuci alat-alat untuk membuat media kultur jaringan tumbuhan atau menanam eksplan.

ACARA II STERILISASI ALAT

- Tujuan:**
1. Mengetahui dan dapat melakukan cara mencuci peralatan kultur jaringan tanaman dengan benar.
 2. Mengetahui, memahami dan dapat melakukan sendiri proses sterilisasi botol kultur dan alat yang akan digunakan untuk menanam eksplan.

Cara Kerja:

- A. Mencuci peralatan yang akan digunakan untuk tempat media kultur dan peralatan untuk menanam eksplan.
 1. Botol kultur yang akan dicuci sangat kotor, maka harus direndam terlebih dahulu menggunakan deterjen, selama semalam. Apabila berisi media yang terkontaminasi, terlebih dahulu botol tersebut disterilkan untuk mematikan mikrobia yang tumbuh pada media kultur.
 2. Media kultur terkontaminasi yang telah disterilkan dituang di dalam Waskom, plastik wrap dan aluminium foil dibuka dan dibuang ditempat sampah.
 3. Bilas botol kultur dengan air mengalir hingga sisa media di dalam botol hilang.
 4. Rendam botol kultur, *petri dish*, erlenmeyer, pinset dan scalpel menggunakan larutan deterjen selama 10 menit.
 5. Gosok peralatan yang telah direndam di dalam larutan deterjen menggunakan spon.
 6. Apabila masih terdapat noda coklat membandel, noda tersebut ditetesi asam kromat, biarkan beberapa saat hingga noda tersebut hilang (penetesan asam kromat harus dilakukan di dalam ruang asam). Setelah noda hilang bilas dengan air mengalir dengan cara botol diletakkan pada lantai *sink* di bawah kran hingga semua asam larut dengan air dan hilang. Baru botol tersebut digosok dengan spon yang telah dibasahi dengan larutan deterjen lalu dibilas dengan air mengalir sebanyak 10 kali.

7. Untuk scalpel sebelum dicuci hendaknya diasah menggunakan batu asah hingga tajam, sedangkan untuk gagang scalpel dan pinset noda hitam atau coklat pada ujungnya juga harus dibersihkan terlebih dahulu dengan menggosoknya menggunakan batuasah.
8. Scalpel yang telah tajam, gagang scalpel dan pinset yang telah terbebas dari noda digosok dengan spon yang telah direndam didalam larutan deterjen kemudian peralatan tersebut dibilas dengan air mengalir sebanyak 10 kali.
9. Peralatan yang telah dicuci bersih, diletakan tengkurep di atas bak keranjang plastik, jangan diletakkan di atas meja porselin.

B. Cara sterilisasi alat:

1. Botol kultur yang akan disterilkan dimasukkan ke dalam kantong plastik, kemudian kantong disteples dan aluminium foil untuk penutup botol kultur juga dimasukkan dalam kantong plastik yang terpisah dengan botol dan disteples juga.
2. Penset, gagang scalpel, scalpel dan *petridish* dibungkus menggunakan kertas dan ditulisi isi dari bungkus tersebut.
3. Bungkus peralatan pada poin 2 dengan kantong plastik.
4. Siapkan Autoklaf, bersihkan air autoklaf, isi dengan air yang bersih sampai sebatas di bawah sedikit dari permukaan angsang.
5. Masukkan semua peralatan ke dalam dandang autoklaf, tutup autoklaf dan pastikan autoklaf tertutup kencang dan benar.
6. Atur program yang sudah ada di dalam autoklaf untuk sterilisasi alat, atur tekanan 1 atm (15 psi), suhu 121°C, waktu 30 menit setelah pada suhu dan tekanan yang telah ditentukan.
7. Setelah autoklaf mencapai suhu dan tekanan serta waktu yang telah ditentukan akan mati secara otomatis dan tekanan serta suhu akan turun perlahan.
8. Apabila tekanan di dalam autoklaf telah mencapai nol, tutup autoklaf baru boleh dibuka untuk mengambil peralatan yang telah disterilkan.
9. Buatlah laporan yang singkat dan jelas cara membersihkan peralatan yang digunakan untuk kultur jaringan serta cara-cara mensterilkan peralatan tersebut.

ACARA III PEMBUATAN MEDIA

- Tujuan:**
1. Mengenal bahan-bahan/ senyawa kimia yang digunakan untuk pembuatan media kultur jaringan tumbuhan.
 2. Mengenal macam-macam formula media yang digunakan di dalam kultur jaringan.
 3. Mengetahui dan memahami serta dapat melakukan sendiri proses pembuatan media kultur jaringan tanaman secara tepat dan benar.

Cara Pembuatan Media:

Di dalam media kultur jaringan paling tidak mengandung lima komponen penting, yaitu: 1. Senyawa makronutrien; 2. Mikronutrien; 3. Senyawa hara penyusun inti klorofil; 4. Senyawa buffer dan 5. Vitamin. Untuk memudahkan pekerjaan dalam pembuatan media Kultur Jaringan Tumbuhan, ke lima komponen senyawa tersebut dibuat larutan stok, sehingga penimbangan tidak berulang kali.

Larutan stok 1.

Komposisi senyawa larutan stok 1 dan tahapan pembuatannya dapat dilihat pada table 3.1.
Tabel 3.1 Komposisi dan berat senyawa hara Larutan Stok 1 serta cara pembuatannya

No	Nama Senyawa	Volume atau Berat MS <small>(Anonim, 2021d; Chandra, 2011; Sharma, 2016)</small>	Volume atau Berat NP <small>(Anonim, 2021c; Chandra, 2011)</small>	Volume atau Berat VW <small>(Anonim, 2021a,b; Chandra, 2011)</small>	Cara membuat Larutan stok 1
1	NH ₄ NO ₂	33.0 g	1,640 g		<ul style="list-style-type: none"> ➤ Wadah yang akan digunakan disiapkan, seperti Erlenmeyer volume 500 ml, botol volume 25 ml. ➤ Reagen dilarutkan dalam 400 ml aquades, menggunakan magnetic stirrer, hingga homogen ➤ Larutan stok A1 disimpan pada
2	KNO ₃	38.0 g	12,752 g	10,50 g	
3	CaCL ₂ .2H ₂ O	8.8 g	8.480 g		
4	KH ₂ PO ₄	3.5 g	9,254 g	5,0 g	
5	H ₃ BO ₃	0.124 g	0,062 g		

6	MnSO ₄ .H ₂ O	0.446 g	0,224 g	0,114 g	tabung dengan volume 25 ml, diberi Label Stok 1: 20ml/L. ➤ Larutan stok 1 disimpan di dalam kulkas pada suhu 4°C ➤ Dengan menyimpan Larutan stok 1 dengan volume 20ml / botol (untuk 1 L media), maka sisa larutan stok 1, akan terhindar penambahan mikrobial kontaminan karena proses pengambilan 20 ml setiap pembuatan media baru.
7	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.172 g	0,086 g		
8	KI	0.017g	0,008 g		
9	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g	6.080 g	10,0 g	
10	Ca(NO ₃) ₂	0,4 g	8,861 g		
11	Ca ₃ (PO ₄) ₂			4,0 g	
12	MoO ₃ ·H ₂ O		0,003		

Larutan stok 2.

Larutan stok 2 berisi komponen senyawa mikro, yang tersusun atas senyawa yang dapat dilihat dalam Table 3.2.

Tabel 3.2 Komposisi dan berat senyawa hara mikro dalam Larutan Stok 2 serta cara pembuatannya.

No	Nama Senyawa	Volume atau Berat MS (Anonim, 2021d; Chandra, 2011; Sharma, 2016)	Volume atau Berat NP (Anonim, 2021c; Chandra, 2011)	Cara membuat Larutan stok 2
1	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,005 g	0,003 g	➤ Wadah yang akan digunakan disiapkan, seperti Erlenmeyer volume 250 ml, botol volume 25 ml. ➤ Reagen dilarutkan dalam 200 ml aquades, menggunakan magnetic stirrer, hingga homogen ➤ Larutan stok 2 disimpan, diberi Label Stok 1: 1 ml/L. ➤ Larutan stok 2 disimpan di dalam kulkas pada suhu 4°C.
2	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,005 g	0,003 g	

Larutan stok 3.

Larutan stok 3 berisi komponen senyawa magnesium merupakan penyusun inti klorofil, yang tersusun atas senyawa yang dapat dilihat dalam Table 3.3.

Tabel 3.3 Komposisi dan berat senyawa magnesium Larutan Stok 3 serta cara pembuatannya.

No	Nama Senyawa	Volume atau Berat MS (Anonim, 2021d; Chandra, 2011; Sharma, 2016)	Volume atau Berat NP (Anonim, 2021c; Chandra, 2011)	Volume atau Berat VW (Anonim, 2021a,b; Chandra, 2011)	Cara membuat Larutan stok 3
1	MgSO ₄ .7H ₂ O Mg (NO ₃) ₂ . 6(H ₂ O)	3,7 g	5,128g	2,44 g	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Wadah yang akan digunakan disiapkan, seperti Erlenmeyer volume 100 ml, botol volume 25 ml. ➤ Reagen dilarutkan dalam 100 ml aquades, menggunakan magnetic stirrer, hingga homogen ➤ Larutan stok 3 disimpan dan diberi Label Stok 3: 10ml/L. ➤ Larutan stok 3 disimpan di dalam kulkas pada suhu 4°C.

Larutan stok 4.

Larutan stok 4 berisi komponen senyawa penyangga (buffer), yang tersusun atas senyawa yang dapat dilihat dalam Table 3.4.

Tabel 3.4 Komposisi dan berat senyawa penyangga (buffer) Larutan Stok 4 serta cara pembuatannya.

No	Nama Senyawa	Volume atau Berat MS (Anonim, 2021d; Chandra, 2011; Sharma, 2016)	Volume atau Berat NP (Anonim, 2021c; Chandra, 2011)	Volume atau Berat VW (Anonim, 2021a,b; Chandra, 2011)	Cara membuat Larutan stok 4
1	Na ₂ EDTA	1,492 g	1,492 g		<ul style="list-style-type: none"> ➤ Wadah yang akan digunakan disiapkan, seperti Erlenmeyer volume 250 ml bersih ➤ Reagen dilarutkan dalam 200 ml aquades, menggunakan magnetic stirrer, hingga homogen ➤ Larutan stok 4 disimpan, diberi Label Stok 4: 5 ml/L. ➤ Larutan stok 4 disimpan di dalam kulkas pada suhu 4°C.
2	FeSO ₄ .7H ₂ O	1,112 g	1,112 g	0,463 g	

Larutan stok 5.

Larutan stok 5 berisi komponen senyawa vitamin, yang tersusun atas senyawa yang dapat dilihat dalam Table 3.5.

Tabel 3.5 Komposisi dan berat senyawa vitamin Larutan Stok 5 serta cara pembuatannya.

No	Nama Senyawa	Volume atau Berat MS (Anonim, 2021d; Chandra, 2011; Sharma, 2016)	Volume atau Berat NP (Anonim, 2021c; Chandra, 2011)	Cara membuat Larutan stok 5
1	Thyamine HCl	0,01 g	0,01 g	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Wadah yang akan digunakan disiapkan, seperti Erlenmeyer volume 100 ml. ➤ Reagen dilarutkan dalam 200 ml aquades, menggunakan magnetic stirrer, hingga homogen ➤ Larutan stok A5 disimpan, diberi Label Stok 5: 1ml/L. ➤ Larutan stok 1 disimpan di dalam kulkas pada suhu 4°C.
2	Glycine	0,200 g	0,200 g	
3	Nicotinic acid	0,05 g	0,05 g	
4	Pyridoxine HCl	0,05 g	0,05 g	

Pembuatan media MS dan NP (New Phalaenopsis) Basal satu liter:

Pembuatan media MS dan NP Basal satu liter yang berasal dari larutan stok.

Tabel 3.6 Pembuatan media MS Basal satu liter

No	Nama Senyawa	Volume atau Berat MS (Anonim, 2021d; Chandra, 2011; Sharma, 2016)	Volume atau Berat NP (Anonim, 2021c; Chandra, 2011)	Volume atau Berat VW (Anonim, 2021a,b; Chandra, 2011)	Cara membuat media Basal dalam satu liter
1	Larutan Stok 1	20 ml	20 ml	20 ml	<ol style="list-style-type: none"> 1. Erlenmeyer volume 1000 ml diisi aquadest 500 ml dan batang magnet lalu ditumpangkan di atas magnetic stirrer, tombol on dipencet hingga batang magnet memutar. 2. Tambahkan larutan stok 1, 2, 3, 4, 5,
2	Larutan Stok 2	1 ml	1 ml		
3	Larutan Stok 3	10 ml		10 ml	

4	Larutan Stok 4	5 ml	5 ml	5 ml	<p>6, dan 7 sesuai table 3.6., untuk media NP tidak ada larutan stok 1, 2, 3, 4, 5, 6,7, 9 dan 10 sesuai table 3.6; untuk media VW larutan stok 1, 3, 4, dan 7 sesuai table 3.6.</p> <p>3. Sambil diaduk menggunakan magnetic stirrer, hingga larutan homogen.</p> <p>4. Larutan ditambah aquadest hingga volume 996 ml, larutan diaduk hingga homogen, lalu diukur pH-nya 5,5-5,8.</p> <p>5. Untuk mengepaskan pH larutan, jika larutan terlalu tinggi ditambahkan HCl 1 N, bila pH terlalu rendah ditambahkan NaOH atau KOH tetes demi tetes hingga larutan mencapai pH 5,5-5,8.</p> <p>6. Larutan ditambah no 9, selanjutnya media dimasak di atas <i>hot plate</i> hingga mendidih. Selanjutnya media telah siap dituang ke dalam botol kultur sebanyak kurang lebih 1/5 volume botol kultur dan botol kultur ditutup menggunakan aluminium foil serta botol tersebut dilabeli sesuai dengan jenis medianya.</p>
5	Larutan Stok 5	1 ml	1 ml		
6	Myo Inositol	100 mg	100 mg		
7	Sukrosa	20 g	20 g	20 g	
8	Agar Yeast extract Charcoal	6,5 g	6 g	8 g	
9			2 g		
10			1 g		
11				1 g	

Larutan stok GIBBERELIC ACID (GA3)

Cara membuat larutan stok asam giberelat: I, 000 ppm.

- Timbang 0,2 p asam giberelat dan larut dengan baik dengan beberapa tetes alkohol.
- Tambahkan 200 ml air suling 2.
- Simpan dalam botol berlabel simpan pada suhu 0 ° C.
- Asam giberelin dapat disterilkan bersama dengan media kultur: namun, dimungkinkan akan hilang beberapa aktivitas.
- Satu ml larutan konsentrat (1.000 ppm) mengandung 1 mg asam giberelin.

Larutan stok NAFTALENACETIC ACID (NAA)

Cara membuat larutan stok NAA: I, 000 ppm.

- Timbang 0,2 g NAA dan larut dengan baik dengan beberapa tetes NaOH 1N.
- Tambahkan 200 ml air suling.

impan dalam botol berlabel NAA: 1 ml=1 mg, simpan pada suhu 0 ° C.

- Satu ml larutan stok (1.000 ppm) mengandung 1 mg NAA.

Larutan stok BENCYLAMINOPURINE (BAP)

Cara membuat larutan stok **BAP**: 1, 000 ppm.

- Timbang 0. 2 g BAP dan larutkan dengan baik dengan beberapa tetes NaOH 1N.
- Tambahkan 200 ml air suling.
- Simpan dalam botol berlabel BAP 1000ppm, pada suhu 0 ° C.
- BAP dapat disterilkan bersama dengan media kultur, Namun, dapat menyebabkan hilangnya beberapa aktivitas.
- Satu ml larutan stok (1.000 ppm) berisi 1 mg

Larutan stok INDOLEACETIC ACID (IAA)

Cara membuat larutan stok **IAA**: 1, 000 ppm.

- Timbang 0. 2 g BAP dan larutkan dengan beberapa tetes NaOH 1N.
- Tambahkan 200 ml air suling.
- Simpan dalam botol berlabel IAA, pada suhu 0 ° C.
- BAP dapat disterilkan bersama dengan media kultur; Namun, beberapa aktivitas dapat hilang.
- Satu ml larutan stok (1.000 ppm) berisi 1 mg

Larutan stok KINETINE (KIN)

Cara membuat larutan stok **KIN**: 1, 000 ppm.

- Timbang 0,2 g KIN dan dilarutkan dengan beberapa tetes NaOH 1N.
- Tambahkan 200 ml air suling.
- Simpan dalam botol berlabel KIN, pada suhu 0 ° C.
- KIN dapat disterilkan bersama dengan media kultur; Namun aktivitasnya, dapat hilang.
- Satu ml larutan stok (1.000 ppm) mengandung 1 mg KIN. 2, 4-D Solusi stok

Larutan stok 2,4 D

Cara membuat larutan stok **2,4 D**: I, 000 ppm.

- Timbang 0,2 g 2,4-D dan larutkan dengan beberapa tetes alkohol.
- Tambahkan 200 ml air suling.
- Simpan dalam botol berlabel D, pada suhu 0 ° C.
- 2,4-D dapat disterilkan bersama dengan media kultur; Namun, dapat kehilangan aktivitasnya.
- Satu ml larutan stok (1000 ppm) mengandung 1 mg 2,4.

Preparasi antibiotic

1. Rifampicin (Rimactan 300)

1. Potong kertas saring kotak kecil (10 mm x 10 mm).
2. Tempatkan dalam cawan petri dan sterilkan.
3. (Dalam ruang aliran) Letakkan kotak dengan hati-hati di atas cawan petri yang sudah disterilkan, yang agak terpisah dari yang lain.
4. Larutkan satu kapsul Pimactan (300 mg) dalam 150 ml air suling. Sterilkan dengan filter 0,22 µm.
5. Tempatkan 3 tetes larutan antibiotik, kira-kira 0,09 ml, pada setiap bujur sangkar.
6. Biarkan antibiotik mengering di ruang aliran.
7. Simpan semua kotak di cawan petri, tertutup dan disegel dengan parafilm.
8. Jaga suhu pada 4 ° C, sampai cawan petri siap digunakan. Saat siap digunakan: dengan forcep, ambil kotak berisi antibiotik di satu sisi, dan masukkan ke dalam tabung. tekan di atas media dekat dengan tempat simpul akan ditanam. Antibiotik akan menyebar dan menutupi area tanam termasuk ruas.

2. Sodic Cefotaxim (Claforan)

1. Potong kotak kecil kertas saring (5 mm x 5 mm).
2. Tempatkan dalam cawan petri dan sterilkan.
3. (Dalam ruang aliran) Tempatkan kotak dengan sangat hati-hati dengan penjepit, pada permukaan yang telah disterilkan cawan petri, agak terpisah satu sama lain.

4. Siapkan larutan antibiotik, larutkan 1 g Claforan dalam 25 ml air suling steril Sterilkan dengan filter pukul 0.22 siang.
5. (Dalam ruang aliran) Teteskan sekitar 0,03 ml pada setiap kotak.
6. Biarkan antibiotik mengering di flow chamber. Simpan semua kotak di cawan petri, tertutup dan disegel dengan parafilm.
7. Simpan pada suhu 4 ° C, sampai cawan petri siap digunakan.
8. Saat siap digunakan: dengan forsep, ambil kotak dengan antibiotik di satu sisi dan masukkan ke dalam tabung.
 3. Tekan di atas medium dekat dengan tempat node akan ditanam. Antibiotik akan menyebar dan menutupi area yang ditanami termasuk node.

Sterilisasi Media

1. Media yang telah dituang ke dalam botol kultur harus segera disterilkan, jangan sampai menginap.
2. Autoklaf disiapkan dengan cara air yang ada di dalam autoklaf dibersihkan kemudian diisi dengan air PDAM hingga batas persis di bawah anggang.
3. Botol kultur dimasukkan ke dalam autoklaf dan botol kultur diatur dengan susunan berdiri tegak, jangan sampai miring atau posisi tidur.
4. Autoklaf ditutup rapat selanjutnya diatur suhu 121°C, tekanan 1 atm dan waktu 30 menit setelah mencapai suhu dan tekanan tersebut.
5. Setelah 30 menit pada suhu dan tekanan tersebut autoklaf akan secara otomatis mati dan tekanan akan berangsur-angsur turun ke angka nol, bila tekanan menunjuk ke angka nol, segera tutup autoklaf dibuka dan botol kultur segera diangkat untuk menghindari media terjadi karamelisasi.

Tugas:

Buatlah urutan cara membuat media yang telah anda praktekan hingga cara sterilisasinya.

ACARA IV
MENABUR BIJI ANGGREK MUDA
(EMBRYO RESQUE)

- Tujuan:** 1. Latihan mensterilkan buah anggrek secara khemis maupun secara fisik.
2. Mengamati pertumbuhan dan perkembangan biji anggrek (tidak memiliki endosperm sehingga sering disebut protokorm, oleh karena itu biji anggrek sangat sulit tumbuh secara alami. Oleh karena itu perlu diselamatkan, sehingga dikenal dengan istilah embryo rescue) ditanam pada media Vacin & Went (VW) yang ditambah dengan charcoal.

Bahan yang digunakan:

- | | |
|----------------------------------|---|
| 1. Buah anggrek yang masih utuh | 7. Spiritus |
| 2. Media kultur VW+1g/L charcoal | 8. Alkohol 70% |
| 3. label | 9. Detergen cair |
| 4. plastic wrap | 10. Aquadest steril |
| 5. Bayclin atau Soklin | 11. Air PDAM/ air sumur bor |
| 6. Tween 80 | 12. Larutan desifektan pembersih lantai |

Alat yang digunakan:

- | | |
|--|------------------------|
| 1. Erlenmeyer volume 250 ml | 6. Lampu Bunsen |
| 2. Gelas ukur | 7. Botol Jam |
| 3. Pinset steril | 8. <i>Hand sprayer</i> |
| 4. Skalpel atau gagang skalpel dan matanya yang steril | 9. Lap pel |
| 5. <i>Petridish</i> steril | 10. Ember |

Cara Kerja:

Proses penaburan biji anggrek meliputi 6 tahapan, yakni

1. Membersihkan lantai:

Sebelum melakukan penaburan, sebaiknya ruang penabur maupun ruang pertumbuhan dalam keadaan steril dan bersih untuk menghindari kontaminasi dari udara sekitar. Oleh

karena itu lantai, dinding dan meja keramik harus dipel menggunakan kain pel yang telah direndam dengan larutan pembersih lantai yang mengandung desinfektan.

2. Mensterilkan Laminar Air Flow (LAF):

Setelah ruangan bebas debu dan mikrobia, meja dan dinding LAF bagian depan disterilkan dengan cara menyemprot spiritus/ alcohol 70% menggunakan *hand sprayer* dan dilanjutkan dengan menekan 2 tombol untuk menyalakan LAF dan lampu yang berada di dalam LAF.

3. Menyiapkan Botol kultur dan peralatan di dalam LAF:

Botol kultur yang berisi media, pinset, scalpel atau gagang scalpel beserta matanya, petridish dan aquadest steril masing-masing disterilkan dengan cara menyemprot spiritus pada seluruh permukaan botol kultur, kemudian dimasukkan ke dalam LAF. Selanjutnya pintu ruang steril ditutup dan lampu UV dinyalakan, dibiarkan sekitar 15-30 menit.

4. Mensterilkan eksplan:

Eksplan dicuci dengan air PDAM yang mengalir, bilas sampai bersih dari noda dan kotoran. Eksplan dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang telah terisi air 100 ml dan 3 tetes tween. Erlenmeyer tersebut digoyang selama 5 menit, lalu dibilas menggunakan air hingga busanya hilang dan dilanjutkan dengan pembilasan menggunakan aquadest.

Eksplan dipindahkan ke dalam erlenmeyer yang telah terisi larutan soklin 15%, digoyang selama 15 menit (dilakukan di dalam LAF setelah UV dimatikan). Bilas 2 kali menggunakan aquadest steril dengan cara menggoyang selama masing-masing 5 menit.

5. Cara menabur biji.

- a. Eksplan diambil, tiriskan airnya kemudian dicelupkan ke dalam alkohol 70% selama kurang dari 1 menit lalu dibakar. Selanjutnya buah anggrek diletakkan di atas *petridish*.
- b. Ambil pinset dan skalpel dari rendaman alkohol 70%, dan disterilkan dengan cara membakarnya di atas lampu Bunsen.
- c. Kulit buah anggrek dibuka dengan skalpel dan pinset steril. Biji yang seperti serbuk telah siap untuk ditabur.
- d. Kembalikan pinset dan skalpel ke rendaman alkohol 70%.

- e. Ambil botol kultur yang telah terisi media, ambil karet gelangya, sterilkan penutup botol tersebut dengan membakarnya di atas lampu bunsen.
- f. Ambil pinset dari rendaman alkohol 70%, dan disterilkan dengan cara membakarnya di atas lampu Bunsen.
- g. Ambil penutup botol tersebut (aluminium foil) dengan hati-hati agar tidak sobek dengan pinset steril.
- h. Kembalikan lagi pinset ke dalam tempat yang berisi alkohol 70%.
- i. Sterilkan bibir botol kultur dengan membakar bagian tersebut pada lampu Bunsen.
- j. Ambil pinset dari rendaman alkohol 70%, disterilkan dengan cara membakarnya di atas lampu Bunsen. Pinset seteril tersebut untuk mengambil biji anggrek lalu ditaburkan di atas media dalam botol kultur.
- k. Botol kultur ditutup kembali dan tutup aluminium foilnya dilapisi menggunakan plastic wrap dan dilabeli dengan menuliskan nama eksplan dan tanggal penaburan.
- l. Ambil kertas aluminium foil dan disterilkan dengan cara membakarnya di atas lampu Bunsen selanjutnya botol kultur ditutup kembali menggunakan aluminium foil yang telah disterilkan.
- m. Botol kultur ditemplei dengan label yang telah ditulisi No kelompok, no mhs, nama eksplan dan tanggal penanaman.
- n. Ikat tutup aluminium foil dengan plastik wrap.

6. Cara mengamati

- a. Tulis tujuan praktikum, nama eksplan, tanggal penanaman pada buku kerja praktikum.
- b. Untuk minggu berikutnya tuliskan tanggal pengamatan dan minggu keberapa setelah penanaman.
- c. Isilah tabel pengamatan perkembangan dan pertumbuhan eksplan yang terjadi seperti: pembengakan, kalus, embrioid, plantula dan perubahan warna eksplan.
- d. Buatlah pembahansan dan kesimpulan dari hasil pengamatam tersebut.
- e. Amati setiap minggu dan buatlah laporannya pada lembar buku kerja.

ACARA V KULTUR JARINGAN UNTUK MENGINDUKSI KALUS

Tujuan: Melatih ketrampilan mahasiswa untuk menanam eksplan dari jaringan tanaman daun *Gyrinops verteegii* dan mengamati pertumbuhan, perkembangan pada kemampuan berbagai jaringan tanaman untuk mengadakan proliferasi sel (somatik embriogenetik) yang ditanam pada media MS

Bahan yang digunakan:

- | | |
|---|---|
| 1. Daun gaharu muda, | 7. Spiritus |
| 2. Media kultur: MS + 1 mg/L BAP + 2 mg/L IBA
(Listiana, <i>et al.</i> , 2021) | 8. Alkohol 70% |
| 3. label | 9. Detergen |
| 4. plastic wrap | 10. Aquadest steril |
| 5. Bayclin atau Soklin | 11. Air PDAM/ air sumur bor |
| 6. Teepol | 12. Larutan desifektan pembersih lantai |

Alat yang digunakan:

- | | |
|---|------------------------|
| 1. Erlenmeyer volume 250 ml | 6. Lampu Bunsen |
| 2. Gelas ukur | 7. Petridish steril |
| 3. Pinset steril | 8. <i>Hand sprayer</i> |
| 4. Skalpel atau gagang skalpel dan matanya
yang steril | 9. Lap pel |
| 5. Petridish untuk tempat kultur | 10. Ember |

Cara Kerja:

Proses penanaman eksplan meliputi 6 tahapan, yakni

1. Membersihkan lantai: prosedur kerjanya seperti pada Acara Praktikum IV
2. Mensterilkan Laminar Air Flow (LAF): prosedur kerjanya seperti pada Acara Praktikum IV.

3. Menyiapkan Botol kultur dan peralatan di dalam LAF: prosedur kerjanya seperti pada Acara Praktikum IV.
4. Mensterilkan eksplan: prosedur kerjanya sama seperti pada Acara Praktikum IV, namun eksplan tidak perlu dicelup ke dalam alcohol 70% dan dibakar.
5. Menanam eksplan: Untuk eksplan daun gaharu, eksplan tidak perlu dibakar terlebih dahulu, langsung dipotong-potong dengan ukuran panjang x lebar: 1cm x 0,5cm, pilih daun bagian midrib.
6. Cara mengamati: sama seperti pada Acara Praktikum IV.

Cara mengamati

- a. Tulis tujuan praktikum, nama eksplan, tanggal penanaman pada buku kerja praktikum.
- b. Untuk minggu berikutnya tuliskan tanggal pengamatan dan minggu keberapa setelah penanaman.
- c. Isilah tabel pengamatan perkembangan dan pertumbuhan eksplan yang terjadi seperti: pembengakan, kalus, embrioid, plantula dan perubahan warna eksplan.
- d. Buatlah pembahansan dan kesimpulan dari hasil pengamatam tersebut.

Amati setiap minggu dan buatlah laporannya pada lembar buku kerja.

ACARA VI
KULTUR ORGAN
(MULTIPLIKASI/ ORGANOGENESIS)

- Tujuan:** 1) Melatih ketrampilan mahasiswa untuk menanam eksplan rhizome jahe dan katak porang.
- 2) Mengamati pertumbuhan, perkembangan dan kemampuan berbagai organ kormus rhizome Jahe dan katak porang dalam membentuk tunas-tunas baru, yang ditanam pada media MS.

Bahan yang digunakan:

- | | |
|--|---|
| 1. Kultur rhizome Jahe dan katak porang | 7. Spiritus |
| 2. Media kultur organogenesis pucuk: MS + 0,2 mg/L TDZ + 0,5 mg/L BAP (porang; Ibrahim, 2019) | 8. Alkohol 70% |
| Media kultur organogenesis tuber: MS + 5 mg/L BAP + 500 mg/L CCC (chlorocholine chloride) +8% sucrose di suhu 20-22oC di ruang gelap (Anonim, 2021d) | |
| 3. label | 9. Detergen |
| 4. plastic wrap | 10. Aquadest steril |
| 5. Bayclin atau Soklin | 11. Air sumur bor/ PDAM |
| 6. Tween 20 | 12. Larutan desifektan pembersih lantai |

Alat yang digunakan:

- | | |
|--|-------------------------|
| 1. Erlenmeyer volume 250 ml | 6. Lampu Bunsen |
| 2. Gelas ukur | 7. Botol Jam/ petridish |
| 3. Pinset steril | 8. <i>Hand sprayer</i> |
| 4. Skalpel atau gagang skalpel dan matanya yang steril | 9. Lap pel |
| 5. <i>Petridish</i> steril | 10. Ember |

Cara Kerja:

Proses penanaman eksplan meliputi 6 tahapan, yakni

1. Membersihkan lantai: prosedur kerjanya seperti pada Acara Praktikum IV
2. Mensterilkan Laminar Air Flow (LAF): prosedur kerjanya seperti pada Acara Praktikum IV.
3. Menyiapkan Botol kultur dan peralatan di dalam LAF: prosedur kerjanya seperti pada Acara Praktikum IV.
4. Mensterilkan eksplan: prosedur kerjanya sama seperti pada Acara Praktikum IV.
5. Menanam eksplan: sama seperti pada Acara Praktikum IV, eksplan yang telah steril diletakkan di atas petri-dish. eksplan dihilangkan bagian sisik pelepah daunnya yang masih tertinggal.
6. Potong 1 cm dari ujung tunas, bagi 4 dengan cara mengirisnya dari pucuk ke arah bawah dan eksplan siap untuk ditanam. Setiap botol kultur berisi 1 potongan aksplan.

Cara mengamati

- a. Tulis tujuan praktikum, nama eksplan, tanggal penanaman pada buku kerja praktikum.
- b. Untuk minggu berikutnya tuliskan tanggal pengamatan dan minggu keberapa setelah penanaman.
- c. Isilah tabel pengamatan perkembangan dan pertumbuhan eksplan yang terjadi seperti: pembengakan, kalus, embrioid, plantula dan perubahan warna eksplan.
- d. Buatlah pembahansan dan kesimpulan dari hasil pengamatam tersebut.

Amati setiap minggu dan buatlah laporannya pada lembar buku kerja.

ACARA VII KULTUR ANTHER DAN POLINIA

- Tujuan:**
- 1) Melatih ketrampilan mahasiswa untuk menanam eksplan dari anther papaya atau polinia anggrek.
 - 2) Mengamati pertumbuhan, perkembangan dan kemampuan berbagai organ dari anther papaya atau polinia anggrek dalam membentuk kalus, yang ditanam pada media N6 atau NP.
 - 3) Untuk membuat tanaman papaya atau anggrek yang memiliki jumlah kromosom: n , $2n$ dan $3n$.
 - 4) Untuk memperoleh tanaman hybrid yang secara konvensional sulit dilakukan.

Bahan yang digunakan:

- | | |
|--|---|
| 1. Kuncup bunga anggrek bulan. | 7. Spiritus |
| 2. Media kultur: NP + 1,5 mg/L 2,4D
(Merthaningsih, <i>et al.</i> , 2018) | 8. Alkohol 70% |
| 3. label | 9. Detergen |
| 4. plastic wrap | 10. Aquadest steril |
| 5. Bayclin atau Soklin | 11. Air sumur |
| 6. Tween | 12. Larutan desifektan pembersih lantai |

Alat yang digunakan:

- | | |
|---|------------------------------------|
| 1. Erlenmeyer volume 250 ml | 6. Lampu Bunsen |
| 2. Gelas ukur | 7. Botol Jam atau petridish kultur |
| 3. Pinset steril | 8. <i>Hand sprayer</i> |
| 4. Skalpel atau gagang skalpel dan matanya
yang steril | 9. Lap pel |
| 5. <i>Petridish</i> steril | 10. Ember |

Proses penaburan biji anggrek meliputi 6 tahapan, yakni:

1. Membersihkan lantai: prosedur kerjanya seperti pada Acara Praktikum IV
2. Mensterilkan Laminar Air Flow (LAF): prosedur kerjanya seperti pada Acara Praktikum IV.
3. Menyiapkan petridish tempat kultur dan peralatan di dalam LAF: prosedur kerjanya seperti pada Acara Praktikum IV.
4. Mensterilkan eksplan: prosedur kerjanya sama seperti pada Acara Praktikum IV.
5. Menanam eksplan: sama seperti pada Acara Praktikum IV, eksplan yang telah steril, dicelupkan ke dalam alkohol 70% (selama 0,5-1 menit) selanjutnya dibakar dan diletakkan di atas petri-dish. Kuncup bunga banci pepaya atau kuncup bunga anggrek dibuka dan anthernya atau polinianya diambil untuk ditanam diatas media.

Cara mengamati

- a. Tulis tujuan praktikum, nama eksplan, tanggal penanaman pada buku kerja praktikum.
- b. Untuk minggu berikutnya tuliskan tanggal pengamatan dan minggu keberapa setelah penanaman.
- c. Isilah tabel pengamatan perkembangan dan pertumbuhan eksplan yang terjadi seperti: pembengakan, kalus, embrioid, plantula dan perubahan warna eksplan.
- d. Buatlah pembahansan dan kesimpulan dari hasil pengamatam tersebut.

Amati setiap minggu dan buatlah laporannya pada lembar buku kerja.

ACARA VIII

KULTUR MERISTEM UNTUK MEMPEROLEH TANAMAN BEBAS VIRUS

- Tujuan:** 1) Melatih ketrampilan mahasiswa untuk menanam eksplan dari jaringan meristem pucuk axillar (tunas nodus) tanaman *Coleus*.
- 2) Mengamati pertumbuhan, perkembangan dan kemampuan jaringan meristem pucuk axillar (tunas nodus) tanaman *Coleus* dalam membentuk plantlet baru yang ditanam pada media MS + 2mg/L BAP.
- 3) Untuk mendapatkan tanaman *Coleus* yang bebas virus (*virus free*), dengan cara memindahkan atau mesubkultur jaringan meristem plantlet *Coleus* yang telah terbentuk.

Bahan yang digunakan:

- | | |
|---|---|
| 1. Kultur nodus dan meristem <i>Coleus</i> | 7. Spiritus |
| 2. Media kultu: MS + 2mg/L BAP (Kaul, <i>et al.</i> , 2015; Janarthanam and Sumathi, 2021). | 8. Alkohol 70% |
| 3. label | 9. Detergen |
| 4. plastic wrap | 10. Aquadest steril |
| 5. Bayclin atau Soklin | 11. Air sumur bor |
| 6. Tween 80 | 12. Larutan desifektan pembersih lantai |

Alat yang digunakan:

- | | |
|--|--|
| 1. Erlenmeyer volume 250 ml | 6. Lampu Bunsen |
| 2. Gelas ukur | 7. Botol jam atau petridish tempat kultur. |
| 3. Pinset steril | 8. <i>Hand sprayer</i> |
| 4. Skalpel atau gagang skalpel dan matanya yang steril | 9. Lap pel |
| 5. <i>Petridish</i> steril | 10. Ember |

Cara Kerja:

Proses penanaman eksplan meliputi 6 tahapan, yakni

1. Membersihkan lantai: prosedur kerjanya seperti pada acara praktikum V
2. Mensterilkan Laminar Air Flow (LAF): prosedur kerjanya seperti pada acara praktikum V.
3. Menyiapkan Botol kultur dan peralatan di dalam LAF: prosedur kerjanya seperti pada acara praktikum V.
4. Mensterilkan eksplan: prosedur kerjanya sama seperti pada acara praktikum V.
5. Menanam eksplan: sama seperti pada acara praktikum V, eksplan yang telah steril diletakkan di atas petri-dish. Eksplan diambil bagian jaringan meristem (jaringan yang terletak di paling ujung pucuk terminal ke bawah sejauh 2 mm).
6. Tanam eksplan tersebut pada setiap botol kultur berisi 1 potongan aksplan.

Cara mengamati

- a. Tulis tujuan praktikum, nama eksplan, tanggal penanaman pada buku kerja praktikum.
- b. Untuk minggu berikutnya tuliskan tanggal pengamatan dan minggu keberapa setelah penanaman.
- c. Isilah tabel pengamatan perkembangan dan pertumbuhan eksplan yang terjadi seperti: pembengakan, kalus, embrioid, plantlet (plantula) dan perubahan warna eksplan.
- d. Buatlah pembahansan dan kesimpulan dari hasil pengamatam tersebut.

Amati setiap minggu dan buatlah laporannya pada lembar buku kerja.

DARTAR PUSTAKA

- Anonim. 2021a. V0226. Vacin & Went Medium. Duchefa Biochemie.
<https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/V0226>, diakses 22 April 2021.
- Anonim. 2021b. TP 070 Vacin & Went Medium. Titan Biotech. [TP 002 \(tmmedia.in\)](http://tmmedia.in) diakses 22 April 2021.
- Anonim. 2021c. PT065 Ichihashi New Phalaenopsis (NP) Medium. Platigen HIMEDIA.
[PT065.pdf \(himedialabs.com\)](http://himedialabs.com), diakses 22 April 2021.
- Anonim. 2021d. 1. . Tissue Culture Laboratory. In Tissue Culture CIP Training Manual.
[Tissue.pdf \(cipotato.org\)](http://cipotato.org), diakses 22 April 2021.
- Bajaj, Y. P. S. (ed.), 1986. Biotechnology in agriculture and forestry 2 crops I. Springer-Verlag. Tokyo. 606p.
- Chandra, CPPA. 2011. Pengaruh Benzyl Adenin Dan Media Dasar Pada Perbanyakan Embrio Angrek Bulan (*Phalaenopsis amabilis*) Secara In Vitro [Skripsi]. JURUSAN Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang.
- Drew, R., Smith, M., Moisaner, J & James, J ., 1991. Plant tissue culture general principles and commercial applications. Queensland Department of Primary Industries. Brisbane. 31 p.
- Dixon, R.A., 1985. Plant cell culture a practical approach. IRL Press Limited. England. 236 p.
- Dodds, B., 1993. Plant tissue culture for horticulture. Queenslad University of Technology Printing Unit Garden's Point Campus. Queensland. 80p.
- Dodds, L.H., Roberts, L.W., 1982. Experiment in plant tissue culture. Cambridge University Press. London. 178 p.
- George, E.F. & PD. Sherrington. Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics Ltd., Basingstoke, U. K.
- Gunawan, L.W., 1988. Teknik kultur Jaringan tumbuhan. Laboratorium kultur jaringan tumbuhan, PAU Bioteknologi IPB. Bogor. 304 p.

- Ibrahim, MSD. 2019. Perbanyak Iles-Iles (*Amorphophallus* spp.) Secara Konvensional Dan Kultur In Vitro Serta Strategi Pengembangannya. *Perspektif* 18(1):67-78. DOI: <http://dx.doi.org/10.21082/psp.v18n1.2019.67-78>.
- Janarthanam, B. and Sumathi, E. 2020. In vitro Plant Regeneration from Nodal Explants of *Coleus forskohlii* Briq. - An Important Medicinal Plant. *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 30(1): 143-148
- Kaul T1, Malik MA., Yaqoob U. and Mehta J. 2015. High Frequency and Rapid in vitro Plant Regeneration of *Coleus forskohlii* Briq. *Med Aromat Plants* 4(3): 1-4. DOI: 10.4172/2167-0412.1000193.
- Baiq Erna Listiana, Bq.E., Sumarjan, Mulyaningsih, T., Roloff, M. and Ulrich Schurr, U. 2021. Induction of Agarwood Olfactory Sesquiterpenes from *Aquilaria filaria* Callus Culture. *ASM Sc. J.*, 14, Special Issue 2, 2021 for ICST2017, 125-133
- Merthaningsih, NP., Yuswanti, H. dan Astiningsih, AAM. 2018. Induksi Kalus pada Kultur Pollen *Phalaenopsis* dengan Menggunakan Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat. *Agrotrop*, 8 (1): 47 – 55.
- Peirek, R.L.M, 1989. In Vitro Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers. Netherlands. 1989. 344p.
- Sharma, GK. 2016. General Techniques of Plant Tissue Culture. <https://www.researchgate.net/publication/291056431>. diakses 22 April 2021.
- Sharp, W.R., Evans, D.A., Ammirato, P.V. & Yamada, Y. 1985. Handbook of plant cell culture. Vol. 2. Crop Species. Collier Macmillan Publisher. London.
- Street, H.E., 1974. Tissue culture and plant science. Academic Press. London. 502 p.
- Thorpe, T.A. (ed.), 1981. Plant tissue culture methods and application in Agriculture. Academic Press. London.
- Vasil, K. 1984. Cell culture and somatic cell genetics of plant. Vol. I. Laboratory procedures and their application. Academic Press. Inc. London.