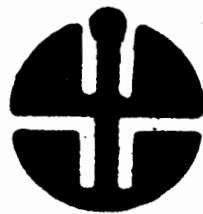


LAPORAN TEKNIK
PENELITIAN BIOTEKNOLOGI UNTUK
MENUNJANG INDUSTRI KEHUTANAN

1992/1993



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN BIOTEKNOLOGI
Jalan Raya Bogor Km. 46, P.O. Box 422 Cibinong 16004

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR ISI	i
KATA PENGANTAR	ii
PENDAHULUAN	iii
Tolok Ukur 01.02. Bioteknologi Penyediaan Benih Kehutanan ..	1
Tolok Ukur 01.03. Bioteknologi Pelestarian Plasma Nutfah....	9
Tolok Ukur 01.04. Biokonversi Limbah Hasil Hutan Tanaman ... Industri	16
Tolok Ukur 01.05. Teknologi Transfer Embrio	26

KATA PENGANTAR

Seperti halnya tahun-tahun sebelumnya seluruh kegiatan penelitian yang dilaksanakan oleh Puslitbang Bioteknologi-LIPI yang dibiayai sebagian atau seluruhnya dari dana DIP (Daftar Isian Proyek) tahun anggaran 1992/1993 disampaikan dalam bentuk laporan teknik ini. Laporan ini disusun berdasarkan urutan tolok ukur yang tercantum dalam Proyek Penelitian Bioteknologi yaitu sebagai berikut:

- T.U. 01.02. Bioteknologi Penyediaan Benih Kehutanan
- T.U. 01.03. Bioteknologi Pelestarian Plasma Nutfah
- T.U. 01.04. Biokonversi Limbah Hasil Hutan Tanaman Industri
- T.U. 01.05. Teknologi Transfer Embrio

Masing-masing kelompok penelitian tersebut di atas dibagi lagi menjadi beberapa sub kelompok namun tetap merupakan satu kesatuan program yang merupakan lanjutan dari program penelitian tahun sebelumnya. Khusus T.U. 01.02 dan 01.03 merupakan bagian dari penelitian bioteknologi kehutanan untuk menunjang program Hutan Tanaman Industri (HTI) yang memperoleh bantuan dana dari UNESCO/UNDP.

Semoga laporan ini dapat dimanfaatkan berbagai pihak, walaupun masih terdapat kekurangsempurnaan.

Bogor, April 1993

Puslitbang Bioteknologi-LIPI
Kepala,

DR. Made Sri Prana

NIP. 320001208

PENDAHULUAN

Dalam tahun anggaran 1992/1993 Puslitbang Bioteknologi-LIPI memperoleh dana pembangunan (DIP) sebesar Rp. 4.999.409.000,- yang dianggarkan untuk melaksanakan berbagai kegiatan, antara lain : penelitian bioteknologi untuk menunjang industri kehutanan, pembangunan sarana dan prasarana fisik.

Kegiatan penelitian dikelompokkan ke dalam 4 (empat) kelompok, meliputi Bioteknologi Penyediaan Benih Kehutanan, Bioteknologi Pelestarian Plasma Nutfah, Biokonversi Limbah Hasil Hutan Tanaman Industri dan Teknologi Transfer Embrio. Dari hasil penelitian telah diperoleh beberapa produk yang merupakan hasil kegiatan tahun ini seperti 78.685 bibit berbagai jenis tanaman, 113 embrio sapi hasil pengembangan teknologi transfer embrio, 96 nomor koleksi isolat Rhizobium terpilih, dan 26 nomor koleksi Algae (mikroalga). Produk-produk tersebut diharapkan menjadi hasil antara untuk menghasilkan produk serupa berikutnya yang lebih unggul.

Diharapkan kegiatan penelitian yang akan datang dapat lebih terpacu oleh hasil-hasil sebelumnya.

Bogor, April 1993

Pemimpin Proyek Penelitian Bioteknologi
Puslitbang Bioteknologi-LIPI

Dr. Usep Soetisna

NIP. 320001404

TOLOK UKUR 01.02

**BIOTEKNOLOGI PENYEDIAAN BENIH KEHUTANAN
(1 Laporan)**

BIOTEKNOLOGI PENYEDIAAN BENIH KEHUTANAN

Koordinator : Maria Imelda
Anggota : D. Priadi
 E.R. Rasmadi
 E.S. Mulyaningsih
 E. Sudarmonowati
 Lydia
 M.S. Prana
 N. Artanti
 N. Sumiasri
 P. Deswina
 P. Lisdiyanti
 Ramlanto
 S. Adisunarto
 S. Atmowidjojo
 S. Sastrapradja
 T. Kuswara
 U. Soetisna

PENDAHULUAN

Untuk mendukung terlaksananya program Hutan Tanaman Industri yang sedang giat digalakkan pemerintah, diperlukan bibit tanaman HTI yang berkualitas tinggi, relatif seragam dan berjumlah banyak. Mengingat keunggulan bioteknologi dalam penyediaan bibit tanaman hortikultura, pangan, perkebunan sudah banyak terbukti, metoda tersebut juga perlu diterapkan pada tanaman kehutanan.

Dalam proyek ini dipilih 4 jenis tanaman HTI meliputi mangium (*Acacia mangium*), sengon (*Paraserianthes falcataria*), sungkai (*Peronema canescens*) dan matoa (*Pometia pinnata*) untuk diteliti perbanyakannya melalui pendekatan bioteknologi khususnya teknik biak sel dan jaringan serta secara konvensional (biji dan stek). Keempat jenis tersebut dipilih mengingat semuanya memiliki nilai komersial, tumbuh cepat, merupakan tumbuhan asli Indonesia dan bagi sungkai dan matoa, belum banyak mendapat perhatian. Namun sebelum sampai ke tahap perbanyak massal, telah dilakukan seleksi varietas melalui kerakterisasi morfologi dan pengujian benih yang merupakan hasil pengumpulan dari berbagai daerah di Indonesia. Selain itu, plasma nutfah yang terkumpul juga sekaligus dikonservasikan baik di kebun plasma nutfah Cibinong maupun secara *in vitro*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan teknologi perbanyak dan pelestarian *ex vitro* dan *in vitro* serta menghasilkan bibit bermutu tinggi dari keempat jenis tanaman tersebut.

BAHAN DAN CARA KERJA

Dalam kelompok ini dilakukan beberapa kegiatan utama, meliputi :

1. Pra Pembiakan

Kegiatan melakukan eksplorasi dan koleksi tanaman untuk tahun 1992/1993 ini dilaksanakan ke daerah Jawa, Riau, Bengkulu, Sumatera Selatan, Kalimantan Barat, dan Kalimantan Timur. Di samping itu dilakukan karakterisasi morfologi (daun, batang, bunga dan buah) serta ketahanannya terhadap hama dan penyakit. Koleksi terpilih yang dianggap bermutu baik selanjutnya diperbanyak. Kegiatan lainnya adalah membuat peta silvoekologi yang mencakup data jenis tanah, tipe iklim dan ketinggian tanah bagi keempat jenis tanaman tersebut, berdasarkan pustaka dan pengamatan langsung di beberapa propinsi yang dikunjungi.

2. Pengujian Benih

Benih hasil eksplorasi diuji di laboratorium dengan mengukur kadar air, bobot 1000 butir benih dan daya kecambahnya dengan memakai metode yang sudah umum digunakan.

$$\text{* kadar air benih} = \frac{B_0 - B_1}{B_0} \times 100 \%$$

B_0 = bobot benih sebelum dikeringkan
 B_1 = bobot benih setelah dikeringkan pada suhu oven 105°C selama 24 jam atau suhu 130°C selama 60 menit

$$\text{* Bobot 1000 butir benih (gram)} = \frac{a_1 + a_2}{2} \times 10$$

a_1 = bobot 100 butir benih (ulangan 1)
 a_2 = bobot 100 butir benih (ulangan 2)

$$\text{* Daya Kecambah (\%)} = \frac{\text{Jumlah benih tumbuh normal}}{\text{Jumlah benih yang diuji}} \times 100 \%$$

3. Elektroforesis Isozim

Kegiatan penelitian meliputi isolasi isozim dan elektroforesisnya. Bahan yang digunakan adalah daun muda mangium, sengon, sungkai; biji mangium, auriculiformis dan hibridanya serta biji sungkai dari Bengkulu (5 nomor). Untuk isolasi isoenzim daun muda/biji digerus, diekstrak dengan buffer fosfat dan disentrifugasi. Supernatannya diambil dan dielektroforesiskan pada gel. Setelah itu gel direndam dalam larutan fiksasi dan larutan perwarna (Comasie blue) selama 1 malam. Selanjutnya gel didestaining dalam larutan destaining kemudian diamati pola pita yang terdeteksi.

4. Perbanyak Konvensional

Kegiatan penelitian meliputi pengaruh dosis pupuk serbuk kayu sengon pada sengon dan sabut kelapa pada mangium. Di samping itu juga dilakukan perbanyak massal sengon, mangium, sungkai dan matoa baik dengan biji maupun stek (sungkai). Pengamatan penelitian pengaruh dosis pupuk dilakukan terhadap daya kecambah, pertumbuhan tanaman dan jumlah daun rata-rata. Penelitian ini didasari pada hasil penelusuran pustaka mengenai media tumbuh yang telah banyak dipakai untuk sengon dan mangium. Sebagai pra perlakuan, biji direndam dalam air panas (180° C) yang mengandung larutan fungisida Antracol (2%) selama 5 menit.

5. Perbanyak *in vitro*

Kegiatan ini meliputi pengembangan teknik perbanyak *in vitro* bagi ke 4 jenis tersebut dan teknik aklimatisasi untuk jenis yang telah berhasil diperbanyak. Metoda yang dipakai dimulai dengan memilih bahan tanaman (tunas, akar, daun dan benih) yang kemudian disterilisasi dengan alkohol, fungisida, klorox/HgCl₂ dengan berbagai kadar dan waktu. Setelah itu diinokulasikan dalam media MS atau WP padat maupun cair yang mengandung berbagai kadar hormon (2,4 D, NAA, IBA, BAP, Kinetin) untuk diinduksi tunas majemuk ataupun kalusnya. Inkubasi dilakukan pada ruangan bersuhu $\pm 25^{\circ}$ C yang diberi penerangan dari lampu TL (40 W) selama 16 jam/hari. Planlet yang baik perakarannya diaklimatisasikan dengan lingkungan luar secara bertahap. Sebagai media tumbuhnya digunakan pasir, tanah + pasir atau tanah + kompos yang telah disterilkan pada autoklaf selama 20 menit pada suhu 120° C. Sebagai perlakuan akar planlet diberi rootone atau seluruh planlet dicelupkan dalam larutan fungisida difolatan/antracol.

6. Preservasi *in vitro*

Preservasi *in vitro* ini baru dilakukan pada planlet mangium. Metoda yang digunakan adalah menghambat pertumbuhan dengan penambahan zat penghambat (ABA 0,4 - 1 % maleic hidrazida (10 mg/l), sukrosa (6 %), manitol (4 %), fruktosa

(4 %, 6 %), pemiskinan media (1/2 atau 1/4 konsentrasi hara), pemadatan media (agar 0,8% atau 1%) dan penurunan suhu (0° C atau 10° C).

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Pra Pemiakan

Eksplorasi yang dilakukan selama tahun 1992/1993 ke propinsi Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Riau, Bengkulu, Sumatera Selatan, Kalimantan Barat dan Kalimantan Timur menghasilkan 127 nomor koleksi meliputi 49 nomor mangium, 8 nomor sengon, 61 nomor sungkai dan 9 nomor matoa (Tabel 1).

Tabel 1 : Hasil eksplorasi 4 jenis tanaman HTI dari 9 propinsi

No.	Daerah Jenis	Jawa (B,I,Ta)	Riau	Bengkulu	Sunsel	Kalbar	Kaltim	Jumlah
1.	mangium	5	8	20	3	-	6	49
2.	sengon	2	-	3/3+	-	-	-	8
3.	sungkai	2+	5/17+	10/20+	-	3+	4+	61
4.	matoa	3	2+	2+	-	2+	-	9
	jumlah	12	32	58	3	12	10	127

Keterangan : + = stek/anakan

Karakterisasi menunjukkan bahwa pada mangium ada 2 variasi yaitu yang berbatang majemuk (2-5 batang) dan berbatang tunggal, matoa memiliki 4 macam variasi berdasarkan warna buah, daun muda dan semainya. Pada sungkai tampak 2 macam variasi daun yaitu yang anak daunnya sempit halus, percabangan jarang dan yang anak daunnya lebar, tidak kaku dan percabangannya banyak. Namun pada sengon belum ada variasi yang ditemukan.

Hama utama sungkai telah berhasil diidentifikasi yaitu *Zeuzera* sp. Stadium perusak adalah larvanya, yang melakukan pengeboran pada bagian dalam batang sungkai sepanjang 20 - 30 cm sehingga kayunya menjadi tidak bernilai lagi. Parasitoid hama tersebut telah diketahui, namun perlu diteliti lebih lanjut waktu dan jumlah parasitoid yang perlu dilepaskan.

Dari penelusuran pustaka dan pengamatan langsung di propinsi Irian Jaya, Riau, Sumatera Selatan, Bengkulu dan

Kalimantan Barat dapat disimpulkan silvoekologi untuk keempat jenis tanaman tersebut (Tabel 2).

Tabel 2 : Silvoekologi untuk 4 jenis tanaman HTI

Jenis	Tanah	Iklm	Ketinggian	Vegetasi
mangium	APKLP	AB1C1C2	5-400	monokultur tepi jalan
sengon	A	AB1C1C2	5-900	monokultur pelindung, sela
sungkai	PKLA	AB1C1C2	10-600	monokultur, buah-buahan, sela, pagar
matoa	APKLLi AN	AB1	0-1200	campuran gambut tipis

keterangan :

A	= Aluvial	Li	= Litosol
An	= Andosol	P	= Podsol
L	= Latosol	Pk	= Podsolik

2. Pengujian benih

Pengujian benih yang meliputi pengukuran kadar air, daya kecambah dan bobot 1000 butir benih telah dilakukan pada 52 nomor benih mangium, 18 nomor benih sengon, 19 nomor benih sungkai, 4 nomor benih matoa dan 2 nomor benih hibrid *A. mangium* x *A. auriculiformis* seperti pada (Tabel 3).

Pengamatan nilai perkecambahan benih sungkai masih berlangsung. Ternyata perendaman benih dalam larutan 1000 ppm GA3 selama 3 hari dapat meningkatkan daya kecambahnya menjadi 15 % perendaman dalam KNO₃ 2 M selama 3 hari menghasilkan daya kecambah 6,7 % sedangkan tanpa perlakuan daya kecambahnya hanya 4,4 %.

3. Elektroforesis Isozim

Elektroforesis isozim dari daun muda keempat jenis tersebut belum jelas hasilnya. Diperlukan buffer pengekstrak untuk mengidentifikasi pita yang terdeteksi. Elektroforesis isozim dari biji mangium yang berasal dari tempat berbeda, ternyata pola pita proteinnya juga berlainan. Pola pita protein biji mangium dan biji auriculiformis memiliki persamaan dan perbedaan sedangkan biji hibridanya mempunyai pola pita gabungan. Elektroforesis pola pita protein biji sungkai belum dapat dideteksi.

Tabel 3 : Hasil pengujian benih 4 jenis tanaman HTI

No.	Jenis	Tempat Asal	Jumlah (no)	Kadar air (%)	Daya kecambah (%)	Bobot 1000 butir (gr)
1.	mangium	Jawa Barat	15	2,8 - 11,8	64 - 87	0,4 - 7,6
		Yogyakarta	2	11,1 - 12,1	70 - 87	10,1 - 10,4
		Bengkulu	18	15,0 - 40,0	40 - 75	8,5 - 14,2
		Riau	8	14,4 - 18,7	34 - 78	7,1 - 12,7
		Maluku	9	9,6 - 20,9	10 - 86	4,5 - 12,1
		Jumlah	52			
2.	Sengon	Jawa Barat	10	2,9 - 10,1	72 - 90	20,5 - 22,9
		Jawa Tengah	1	7,9	72	22,9
		Jawa Timur	1	4,5	78	22,4
		Maluku	1	19,7	80	22,4
		Yogyakarta	1	11,2	78	24,9
		Bengkulu	3	8,5 - 12,3	60 - 80	21,4 - 24,5
		Irian Jaya	1	7,9	92	22,2
		Jumlah	18			
3.	Sungkai	Bengkulu	13	8,5 - 12,2	‡	3,3 - 4,9
		Palembang	1	8,5	‡	8,2
		Riau	5	5,3 - 10,8	‡	7,8 - 11,4
		Jumlah	19			
4.	Matoa	Jawa Barat	3	14,6 - 43,3	TT - 96	3280 - 3890
		Irian Jaya	1	-	TT	-
		Jumlah	4			
5.	hibrid (Am x Aa)	Yogyakarta	1	12,72	63	22,9
		Bengkulu	1	10,72	70	21,3
		Jumlah	2			

Keterangan : TT = tidak tumbuh ‡ = sedang berlangsung

4. Perbanyak Konvensional

Penelitian pengaruh dosis pupuk pada sengon menunjukkan bahwa daya kecambah tertinggi (91,33%) dicapai pada media tanah : pupuk = 1 : 1, pertumbuhan paling cepat ($t = 5,83$) sampai umur 1 bulan pada media tanah : pupuk = 1 : 3 sedangkan jumlah daun rata-rata tidak berbeda nyata pada semua perlakuan.

Pada mangium, daya kecambah tertinggi (95,33 %) diperoleh pada media tanah : pupuk = 1 : 1, pertumbuhan paling cepat ($t = 4,83$ cm) sampai umur 1 bulan pada media tanah : pupuk = 1 : 2 sedangkan jumlah daun rata-ratanya juga tidak berbeda nyata.

Pembibitan massal yang dilakukan secara generatif (biji) dan vegetatif (stek) telah menghasilkan 78.685 bibit, meliputi 29.400 bibit sengon, 22.295 bibit mangium, 15.000 bibit sungkai dan 12.000 bibit matao.

5. Perbanyak in vitro

Mangium telah berhasil diperbanyak dari kultur tunas nodus. Media yang digunakan adalah MS + BAP (0,1 - 3 gr/l) untuk induksi tunas dan MS + BAP (2 - 3 gr/l) untuk multiplikasi tunas dan MS + IBA (0,1 - 2 gr/l) untuk pengakaran. Dari 1 nodus dalam waktu 1 bulan akan dihasilkan 7 tunas yang selanjutnya bisa membentuk sampai 80 tunas setelah 3 bulan, pengakaran juga tidak merupakan masalah, 8 akar utama terbentuk dengan mudah pada media yang mengandung IBA.

Pada sengon tunas pucuk/samping bisa menghasilkan \pm 30 tunas dalam media MS yang kadar nitrogennya 1/4 normal dan mengandung BAP 1 mg/l. Pada media tersebut pembentukan kalus yang berlebihan masih terjadi walaupun sudah berkurang dibandingkan dengan yang kadar N-nya normal.

Masalah pencoklatan jaringan pada biak tunas sungkai belum bisa diatasi walaupun ke dalam medianya telah ditambahkan zat antioksidasi seperti (vitamin C, arang aktif ataupun PVP).

Demikian juga pada matao, masalah pencoklatan jaringan tersebut belum dapat dipecahkan. Namun, biak embrio mudanya bisa membentuk tunas dan daun mudanya sudah menghasilkan kalus. Penelitian masih perlu dilanjutkan untuk menginduksi kalusnya hingga membentuk embriosomatik.

Aklimatisasi planlet mangium, yang dilakukan pada media pasir, tanah + pasir atau tanah + kompos, hanya 29 yang berhasil hidup dari 147 planlet yang dikeluarkan. Umumnya mati pada umur 8 - 10 hari karena serangan penyakit damping off atau powdery mildew.

6. Preservasi in vitro

Pengamatan selama 7 bulan menunjukkan bahwa manitol (4 %) paling baik dalam menghambat pertumbuhan,

penambahan sukrosa (6 %) mengakibatkan planlet mati dalam 3 minggu. Pemiskinan hara media menjadi 1/4 konsentrasi normal lebih menghambat pertumbuhan dibandingkan dengan yang 1/2 konsentrasi. Penambahan fruktosa (4 dan 6 %) mengakibatkan matinya planlet apabila disimpan lebih dari 2,5 bulan. Pengaruh maleic hidrazida belum dapat dilaporkan karena penelitiannya masih berlangsung, sedangkan suhu 0° C mematikan semua planlet dalam 3-4 minggu. Pada suhu 10° C planlet yang mati mencapai 66,7 %.

DAFTAR PUSTAKA

- Duke, J.A. 1981. Hand Book of Legume of World Economic Importance. Plam Press, New York.
- IBPGR, 1986. IBPGR Advisory Committee on *in vitro* storage. Report of the third meeting, Valencia Spain, 4-6 June.
- Nas, 1983. Mangium and other fast growing acacias for the humid tropic. National Academy Press. Washington D.C. : 111-120.
- Umali-Garcia, M. (a.o.), 1992. Tissue Culture of *Paraserianthes falcataria* Its Relevance to tree Improvement. Bioterop Spec. popl. 49: 35-411.
- Vercourt, B.1979. A manual of New Guinea Legumes. Botany Bulletin no.11. Office of Forest "Division of Botany, Papua New Guinea" 24 pp.
-

TOLOK UKUR 01.03
BIOTEKNOLOGI PELESTARIAN PLASMA NUTFAH
(1 Laporan)

BIOTEKNOLOGI PELESTARIAN PLASMA NUTFAH

Koordinator : Harmastini
Anggota : H. Karsono
Kusmiati
R. Melliawati

PENDAHULUAN

Dalam upaya menunjang program Hutan Tanaman Industri telah dilaksanakan penelitian pelestarian plasma nutfah yang meliputi penelitian Rhizobium dan Mikoriza secara hayati dengan serangkaian kegiatan eksplorasi lapangan ke berbagai lokasi di Indonesia guna mengumpulkan material penelitian. Tujuan penelitian ini adalah untuk :

1. mendapatkan isolat Rhizobium unggul yang mampu hidup bersimbiosa dan menambat N_2 udara secara optimal dengan tanaman hutan terpilih, *Paraserianthes falcataria* dan *Acacia mangium*. Dari isolat terpilih dipelajari produksi biomasnya dengan menggunakan fermentor berkapasitas 15 liter.
2. mendapatkan isolat cendawan ektomikoriza dari akar *Pinus merkusii* dan
3. inokulasi VAM pada *A. mangium*.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan berupa bintil akar diperoleh sebagai hasil eksplorasi lapangan ke daerah Jawa Barat, Riau, Bengkulu, dan Kalimantan Timur (Samarinda dan Kabupaten Kutai). Akar *P. merkusii* diperoleh dari daerah Aceh.

ISOLASI

Isolasi bakteri Rhizobium dari sampel bintil akar dilakukan dengan cara yang dipertelakan oleh Somasegaran dan Hoben (1985). Isolat-isolat yang telah dimurnikan disimpan pada medium YEMA (Yeast Extract Mannitol Agar) (Vincent, 1970) dan pemeliharaannya dilakukan dengan pemindahan secara terus-menerus pada waktu-waktu tertentu.

Akar *P. merkusii* dicuci dengan air dan tween 20 untuk menghilangkan partikel tanah yang menempel. Akar yang sudah

bersih dipotong-potong berukuran 1 cm, disterilkan dengan larutan H₂O₂ dan dibilas dengan akuades 5-6 kali. Kemudian akar dikeringkan pada kertas tisu steril dan diletakkan pada plate Melin-Norkrans (MMN) serta diinkubasi pada suhu kamar.

KARAKTERISASI

Untuk menguji kepastian bahwa isolat hasil isolasi tersebut benar biak Rhizobium, terhadap isolat-isolat tersebut dilakukan uji pertumbuhan pada beberapa media selektif, yakni media YEMA dengan penambahan indikator Congo Red, Brom Thymol Blue dan Brilliant Green. Selain itu isolat-isolat tersebut juga ditumbuhkan pada media Pepton Glukosa Agar guna melihat kemampuannya dalam menggunakan sumber N Pepton. (Somasegaran, 1984).

Pengelompokan isolat-isolat Rhizobium dilakukan dengan cara melihat pola ketahanannya terhadap beberapa antibiotika. Dalam hal ini dipakai 3 jenis antibiotika dengan dua taraf konsentrasi. Pola ketahanan tersebut dibandingkan dengan pola yang ditampilkan oleh biak referensi, USDA 110 dan CB 756.

AUTENTIKASI

Uji autentikasi terhadap isolat-isolat hasil isolasi dalam kemampuannya membentuk bintil akar pada tanaman penguji siratro (*Macroptilium atropurpureum*) dilakukan dengan metoda tabung tegak (Saono dkk. 1975). Biji Siratro setelah disterilisasi permukaan dengan menggunakan chlorox% dikecambahkan selama 2 malam. Kemudian kecambah siratro steril ditanam dalam tabung yang berisi medium semi solid steril. Suspensi isolat Rhizobium dengan kepadatan 10^9 sel/ml diinokulasikan pada kecambah tersebut. Perlakuan juga disertai tanaman kontrol yaitu kecambah yang tidak ditetesi dengan suspensi bakteri. Selain itu dibuat pula perlakuan pertabung kecambah siratro pada media semi solid yang mengandung unsur N dalam jumlah cukup. Tiap perlakuan dibuat dengan 3 ulangan dan lama percobaan adalah satu bulan. Pengamatan pembentukan bintil akar dapat dilihat mulai tanaman berumur 2 minggu sampai saat dipanen.

Pengujian autentikasi dilanjutkan pada tanaman inangnya yakni *A. mangium* dan *P. falcataria* dengan menggunakan "Leonard

Jar". Bagian atas dari Leonard Jar diisi dengan pasir laut steril dan bagian bawahnya diisi dengan larutan hara tanaman (Saono dkk, 1975). Penanaman kecambah dan inokulasi bakteri dilakukan dengan cara seperti telah diuraikan di atas. Masing-masing Leonard Jar ditanam dengan 3 kecambah, kemudian diinokulasi dengan suspensi bakteri (10^9 sel/ml). Setelah tanaman berumur 2 minggu. Satu dari tiga kecambah yang ditanam, satu tanaman dicabut dan dua ditinggalkan. Tiap perlakuan dibuat dengan 3 ulangan dan lama percobaan adalah tiga bulan. Pengamatan dilakukan dengan melihat pembentukan dan jumlah bintil akar, kandungan N tanaman yang ditunjukkan oleh biomasa tanaman bagian atas dan bagian bawah.

PRODUKSI BIOMASA

Produksi biomasa bakteri dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri pada media hidrolisat pati singkong. Media tersebut dihasilkan dari proses hidrolisa pati singkong oleh kapang amilolitik terpilih, *Aspergillus awamori*. Pengamatan dilakukan dengan melihat pertumbuhan bakteri pada interval waktu tertentu. Pertumbuhan tersebut diamati dengan metoda Miles and Misra (Somasegaran, 1984) dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada medium YEMA + CR. Lama pertumbuhan dalam fermentor adalah 10 hari. Setelah itu suspensi bakteri siap dipakai sebagai inokulan untuk menunjang pertumbuhan tanaman. Isolat yang diujikan saat ini adalah isolat asal tanaman *P. falcataria* (AS-1). Evaluasi penggunaan inokulan hasil perbanyakan di dalam fermentor dilakukan terhadap tanaman *P. falcataria* pada medium pasir steril di rumah kaca.

INOKULASI VAM PADA *A. mangium*

Biji *A. mangium* yang telah berkecambah diinokulasikan dengan spora *Gigaspora margarita* sebanyak 30 spora per 350 gram medium. Medium yang digunakan adalah Zeolit, pasir dan campuran tanah dan pasir (1:1). Percobaan diulangi sebanyak 5 kali. Parameter yang diamati adalah tinggi tanaman (cm), bobot kering daun (gram), dan persentase infeksi VAM pada akar serta jumlah spora per gram medium.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Jumlah koleksi isolat *Rhizobium* yang terkumpul sampai saat ini adalah 46 isolat asal tanaman *A. mangium* dan 50 isolat asal tanaman *P. falcataria* (Tabel 1). Sedangkan jumlah koleksi bintil akar yang berhasil dikumpulkan dari berbagai lokasi di Indonesia adalah 27 nomor asal *P. falcataria* dan 31 nomor asal tanaman *A. mangium* (Tabel 2).

Karakterisasi isolat *Rhizobium* yang telah dilakukan adalah pertumbuhan isolat tersebut pada medium selektif (4 macam) dan resistensinya terhadap 3 jenis antibiotika. Jumlah isolat yang telah diuji dari tanaman akasia adalah 17 isolat. Sedangkan dari tanaman albisia adalah 10 isolat.

Hasil yang didapat menunjukkan bahwa pertumbuhan 17 isolat *Rhizobium* asal tanaman akasia dan 10 isolat asal tanaman albisia semua tumbuh subur dan tidak menyerap warna merah dari Congo Red. Delapan isolat *Rhizobium* asal tanaman akasia termasuk kelompok tumbuh cepat yang ditunjukkan oleh adanya reaksi asam (warna kuning) pada medium YEMA + BTB. Sembilan isolat *Rhizobium* tanaman akasia dan 10 isolat *Rhizobium* tanaman albisia termasuk kelompok tumbuh lambat yang ditunjukkan oleh adanya reaksi basa (warna biru) (Tabel 3).

Pertumbuhan isolat *Rhizobium* asal tanaman akasia dan 9 isolat asal tanaman albisia pada medium Peptone Glukosa Agar, merana yang berarti bahwa isolat-isolat tersebut tidak mampu tumbuh dengan pepton sebagai sumber N nya. Sedangkan 6 isolat tanaman akasia dan 1 isolat tanaman albisia tumbuh subur pada medium dengan sumber N, peptone.

Pola ketahanan isolat-isolat tersebut terhadap 3 jenis antibiotika dengan 2 taraf konsentrasi memberikan adanya 3 pola ketahanan yang berbeda-beda dari isolat tanaman akasia dan 6 pola ketahanan dari isolat tanaman albisia (Tabel 4).

Autentikasi ke 27 isolat *Rhizobium* yang diuji terhadap tanaman penguji siratro dengan metoda tabung tegak, semua isolat mampu membentuk bintil akar. Sedangkan pengujian terhadap tanaman inangnya sampai saat ini baru selesai dengan 17 isolat *Rhizobium* terhadap tanaman akasia. Hasil sementara menunjukkan bahwa ke 17 isolat yang diuji, mampu bersimbiosa dan membentuk bintil akar

dengan tanaman akasia, hal ini ditunjang pula dengan jumlah bintil akar pertanaman (Tabel 5).

Sedangkan pengujian terhadap tanaman albisia sampai saat ini masih berlangsung.

Pertumbuhan isolat Rhizobium (AS-1) dalam medium hidrolisat pati pada fermentor berkapasitas 15 liter menunjukkan bahwa pada umur 10 hari jumlah bakteri yang tumbuh dapat mencapai 1.5×10^8 sel per ml.

Dari penelitian Mikoriza dapat dilaporkan hasil isolasi 1 isolat cendawan dari akar *P. merkusii* tetapi perbanyakkan isolat ini pada medium MMN cair belum berhasil walaupun telah dilakukan inkubasi hingga 6 minggu dalam shaker inkubator. Kendala mengenai perbanyakkan cendawan ini masih dipelajari. Sedangkan percobaan inokulasi VAM pada *A. mangium* masih terus dilakukan dan hasilnya akan dilaporkan kemudian.

Tabel 1. Isolat Rhizobium asal tanaman *Acacia mangium* dan *Paraserianthes falcataria*

Tanaman	Asal daerah	Jumlah isolat
<i>Paraserianthes falcataria</i>	Depok	5
	Bojong	2
	Situ Sari	2
	Pandeglang	9
	Purwakarta (Cikampek)	11
	Bandung Selatan	10
	Sukabumi (Parung Kuda)	6
	Cibinong	5
<i>Acacia mangium</i>	Depok	7
	Karawang	4
	Purwakarta	2
	Cikampek	6
	Serpong	3
	Serang	3
Riau	4	

Tabel 2. Koleksi bintil akar asal tanaman *Acacia mangium* dan *Paraserianthes falcataria* dari berbagai lokasi

Tanaman	Asal daerah	Jumlah isolat
<i>Paraserianthes falcataria</i>	Bengkulu	8
	Kaltim (Kutai)	8
	Kaltim (Samarinda)	1
	Kaltim	10
<i>Acacia mangium</i>	Bengkulu	7
	Kaltim (Kutai)	6
	Kaltim (samarinda)	8
	Kaltim	10
	Serang	3
	Raiu	4

Tabel 3. Pertumbuhan isolat Rhizobium asal tanaman akasia pada media selektif antibiotika

No.	Kode isolat	YEMA	YEMA+BTB	YEMA+CR	YEMA+PGA
1.	AMCB I 1	+	biru	merah muda	++
2.	AMCB I 2	++	biru	merah muda	++
3.	AMCB I 3	++	biru	merah muda	+
4.	AMCB I 4	++	biru	merah muda	+
5.	AMCB II 1	+	biru	merah muda	+
6.	AMCB III 1	++++	kuning	merah muda	+++
7.	AMCB III 2	+++	kuning	merah muda	+
8.	AMCB III 3	+	biru	merah muda	+
9.	AMCB III 4	+	biru	merah muda	+
10.	AMCB IV 1	+++	biru	merah muda	+
11.	AMCB V 1	+++	kuning	kuning muda	++
12.	AMCB V 2	+++	biru	putih kotor	++
13.	AMCB VI 1	++	kuning	merah muda	+
14.	AMCB VI 2	++	kuning	merah muda	+
15.	AMCB VI 3	+++	kuning	merah muda	+
16.	AMCB VI 4	+++	kuning	merah muda	+
17.	AMCB VI 5	+++	kuning	merah muda	+

Tabel 4. Hasil pengujian isolat Rhizobium asal akasia dengan antibiotik

Kode isolat	Spectomycin				Rifamycin				Streptomycin			
	100 µg/ml		250 µg/ml		100 µg/ml		250 µg/ml		125 µg/ml		312,5 µg/ml	
1. AMCB I1	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-
2. AMCB I2	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
3. AMCB I3	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
4. AMCB I4	+	+	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
5. AMCB III1	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
6. AMCB III1	++	++	+	+	++++	++++	++++	++++	-	-	-	-
7. AMCB III2	++	-	+	+	++++	++++	++++	++++	+	-	-	-
8. AMCB III3	++	+	+	++	++	++	++	++	+	+	-	-
9. AMCB III4	++	++	+	+	++	++	++	++	+	+	-	-
10. AMCB IV 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11. AMCB V 1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12. AMCB V 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13. AMCB VI1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14. AMCB VI2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
15. AMCB VI3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16. AMCB VI4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17. AMCB VI5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18. USDA 110	+	-	+	-	++++	++++	++++	++	-	-	-	-

Tabel 5. Autentikasi isolat Rhizobium asal tanaman akasia pada tanaman Macroptilium

No.	Kode isolat	Pembentukan bintil			
		Pot I		Pot II	
1.	AMCB I 1	+	+	+	+
2.	AMCB I 2	+	-	+	+
3.	AMCB I 3	+	+	+	-
4.	AMCB I 4	-	-	+	+
5.	AMCB II 1	+	+	+	+
6.	AMCB III 1	+	+	-	-
7.	AMCB III 2	+	-	+	-
8.	AMCB III 3	+	+	+	+
9.	AMCB III 4	+	+	+	+
10.	AMCB IV 1	-	-	-	+
11.	AMCB V 1	+	+	+	+
12.	AMCB V 2	+	+	+	+
13.	AMCB VI 1	-	-	+	-
14.	AMCB VI 2	-	-	-	-
15.	AMCB VI 3	+	-	+	-
16.	AMCB VI 4	-	-	-	-
17.	AMCB VI 5	+	-	-	-
18.	KO	-	-	-	-
19.	KNO	-	-	-	-
20.	USDA 110	+	+	+	+

BAFTAR PUSTAKA

Bomasegaran, P. and H.J. Hoben, 1985. Methods in Legumes. Rhizobium Technology. University of Hawaii Niftal.

Saono, S., H. Karsono and S. Abdulkadir, 1975. Notes on the nodulation of Some Edible Legumes of Indonesia. Annales Bogoriences, VI(1) : 27-41

Vincent, J.M. 1970. A manual for the Practical. Study of Root Nodule Bacteria. IBP Handbook No.15. Black well Scient.Publ., Oxford and Edinburgh.

TOLOK UKUR 01.04
BIOKONVERSI HASIL DAN LIMBAH CAIR
(1 Laporan)

BIOKONVERSI LIMBAH HASIL HUTAN TANAMAN INDUSTRI

Koordinator : Eddy Jusuf
Anggota : Djadjat Tisnadjaja
Djumhawan R. Permana
I Nyoman K. Kabinawa
Ni Wayan Sri Agustini
Padmono Citreksoko
Pudji Rahardjo
Susono Saono
Titik K. Prana

PENDAHULUAN

Suatu alternatif baru yang lebih efektif dan lebih ekonomis untuk menanggulangi limbah pabrik kertas dan pulp perlu dicari. Berbagai penelitian baik secara semi konvensional maupun yang lebih canggih telah banyak dilakukan di beberapa negara maju. Namun masalah yang dihadapi satu negara dengan negara atau satu pabrik dengan pabrik lain tidak selalu sama. Hal ini disebabkan karena banyaknya perbedaan baik dari keadaan iklim, tingkat kemampuan ekonomi dan teknologi negara tersebut, bahan baku yang dipakai dan tingkat kapasitas produksinya.

Alternatif yang dipilih untuk maksud tersebut adalah pengembangan teknologi biokonversi yaitu mengkonversi atau merubah berbagai senyawa organik yang terkandung didalam limbah cair tersebut menjadi senyawa lain yang mempunyai nilai ekonomi dengan bantuan berbagai sumber daya hayati. Berbagai jenis mikroba baik yang hidup secara aerob maupun anaerob telah diketahui mampu merombak dan mengkonversi senyawa-senyawa yang secara biasa sulit didegradasi seperti persenyawaan fenolik maupun persenyawaan lain yang bersifat toksik. Khamir *Candida utilis* digunakan untuk produksi protein sel tunggal dalam bentuk "yeast extract" dari lignosulfit, dan berbagai senyawa turunan gula yang terdapat dalam cairan limbah dibuat alkohol dengan bantuan biak khamir *Saccharomyces cerevisiae* (Alonso dkk., 1984). Selain itu bakteri *Lactobacillus pentosus* dilaporkan telah digunakan untuk membuat asam laktat dari limbah cair pabrik pulp secara anaerob. Dan berbagai jenis kapang seperti *Tinctopararia sp.*, *Phanaerochaeta chrysosporium* dan *Aspergillus spp.* diketahui mampu menghancurkan lignin dan menghilangkan warna coklat yang terdapat pada limbah pulp dan pabrik kertas (Fukuzumi, 1980).

Indonesia merupakan wilayah tropis yang kaya akan berbagai jenis mikroba yang berpotensi dan belum sepenuhnya digali dan dimanfaatkan untuk berbagai tujuan. Besar kemungkinannya bahwa banyak jenis bakteri, khamir, kapang yang bersifat aerob, anaerob maupun mikroalga yang bersifat fotosintetik ada dalam khasanah kekayaan hayati Indonesia dapat digunakan dalam mengkonversi berbagai persenyawaan organik didalam limbah pabrik kertas dengan memberikan produk yang mempunyai nilai ekonomi.

Cairan hasil biokonversi baik secara aerob maupun anaerob masih mengandung beberapa persenyawaan terutama bentuk garam dan asam mineral yang dapat digunakan oleh mikroorganisme fotosintetik. Beberapa jenis mikroalga telah diketahui mempunyai potensi, dapat dikembangkan untuk keperluan sumber pakan dan pangan. Salah satu jenis yang telah diketahui keunggulannya adalah *Chlorella pyrenoidosa*, karena dapat tumbuh dalam medium sintetik serta tingginya kandungan nutrisi. Untuk itu dilakukan penelitian produksi biomasa *Chlorella pyrenoidosa*, *Spirulina plantesis* dan *Scenedesmus sp.* sebagai suplementasi pangan dan pakan.

Dengan dasar ini, kelompok penelitian Tolok Ukur 01.04 mencoba mengembangkan suatu teknologi alternatif menanggulangi pencemaran oleh pabrik pulp dan kertas dengan mengkonversi persenyawaan-persenyawaan yang terkandung didalam limbahnya. Konversi ini dilakukan dengan melibatkan berbagai jenis mikroba potensial dan selektif baik yang bersifat aerob maupun yang bersifat anaerob dan berbagai jenis mikroalga pilihan yang dapat dijadikan sumber pakan maupun pangan. Maka kegiatan penelitian dan pengembangan teknologi biokonversi limbah hasil hutan tanaman industri ini dibagi dalam 3 sub kelompok dengan tujuan masing-masing:

1. Biokonversi secara aerob, bertujuan mengisolasi berbagai isolat mikroba aerob yang mampu merombak atau mengkonversi satu atau beberapa senyawa tertentu dalam cairan limbah dimaksud atau cairan hasil konversi secara anaerob serta mengembangkan model digester aerob konversi limbah pulp.
2. Biokonversi secara anaerob, bertujuan mengembangkan model digester anaerob, mengisolasi dan mengidentifikasi isolat

mikroba anaerob yang mampu mengkonversi satu atau beberapa senyawa tertentu dalam cairan limbah dimaksud atau cairan hasil konversi secara aerob.

3. Pengembangan kultur mikroalga bertujuan mengembangkan model dan optimasi pengkulturan berbagai jenis mikroalga yang mempunyai potensi untuk dijadikan pakan, pangan atau produk lain yang bernilai ekonomi dengan memanfaatkan air hasil biokonversi aerob dan anaerob yang masih mengandung unsur-unsur hara sebelum dilepas ke perairan bebas dan mendapatkan biomassa mikroalga yang mempunyai kandungan protein maksimal dalam waktu yang relatif singkat dalam medium yang murah.

BAHAN DAN CARA KERJA

A. Biokonversi secara aerob

1. Isolasi mikroba

Telah dilakukan eksplorasi ke tiga buah pabrik pulp masing-masing PT Indorayon Utama di Tapanuli Utara (SUMUT), PT Kertas Kraft Aceh di Lhokseumawe (D.I. ACEH) dan PT Basuki Rachmat di Banyuwangi (JATIM) serta dua pabrik kertas masing-masing PT Kimsari Paper Indonesia di Medan (SUMUT) dan PT Papyrus Lontar di Bayeun-Aceh Timur (D.I. ACEH) untuk memperoleh contoh limbah dan lumpur aktif dari digester atau kolam penampungan limbahnya. Dari lumpur ke lima pabrik tersebut dilakukan isolasi biak-biak mikroba yang mampu tumbuh pada medium yang mengandung 5% cairan hitam.

Sebanyak ekuivalen 0.5 gram kering lumpur aktif diinokulasikan dalam "broth" yang mengandung 5% cairan hitam, dari pabrik pulp Basuki Rachmat, ditambah sumber N dan C dari ammonium nitrat, glukosa, pepton dan yeast extract. Biakan ini diinkubasi selama 48 jam kemudian ditanam/diinokulasi pada nutrient agar pada cawan petri dan agar dengan 5% cairan hitam. Koloni yang tumbuh pada agar 5% cairan hitam ini diambil dan dikonservasi untuk pengujian lebih lanjut.

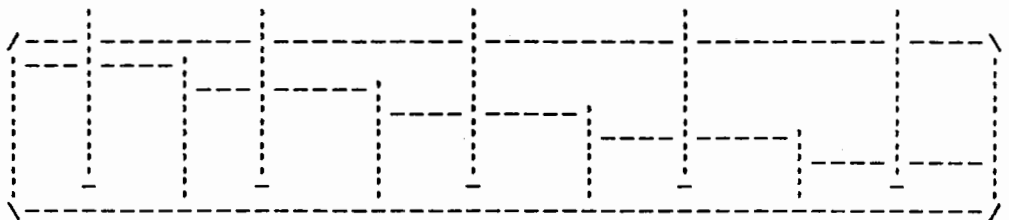
2. Pengujian potensi biak mikroba

Isolat mikroba baik yang berasal dari kultur koleksi Puslitbang Bioteknologi-LIPI, dari pembelian dari instansi lain yang menurut studi pustaka berpotensi dalam biokonversi maupun biak hasil isolasi, diuji potensinya untuk mengkonversi limbah pabrik pulp dengan melihat kemampuannya tumbuh dan menghilangkan warna coklat.

Biakan-biakan yang digunakan terdiri dari bakteri : *Alkaligenes faecalis*, *Bacillus cereus*, *chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. stutzeri* dengan khamir *Candida utilis* serta kapang *Aspergillus awamori*, *Aspergillus sp. KT-11*, *Rhizopus UQM 186F*, *Rhizopus UQM 145 F* dan *Rhizopus sp. IFO R* sebagai bahan perbandingan terhadap biak-biak mikroba hasil isolasi dari lumpur aktif pabrik pulp. Semua biak mikroba ini ditumbuhkan pada cairan limbah cair hitam yang telah diberi tambahan berbagai dosis ammonium sulfat sebagai sumber N dan variasi takaran pati atau glukosa sebagai sumber karbon. Inkubasi berlangsung dengan pengocokan selama 7 hari.

3. Pengembangan model digester aerob

Suatu model digester yang merupakan bentuk tiruan dari yang ada di Balai Besar Selulosa Bandung yang dimodifikasi telah dirancang dan dibuat sebagai berikut :



Dari tiap 5 tahapan akan diisi dengan lumpur aktif berisi berbagai populasi mikroba yang akan mengkonversi senyawa-senyawa kimia yang terdapat dalam cairan limbah menjadi bentuk senyawa lain menurut karakter dari mikroba. Lumpur aktif ini merupakan campuran lumpur yang diambil dari endapan tempat penumpukan atau pembuangan limbah pabrik kertas yang disurvei. Air limbah yang akan dikonversi dilalukan pada ke 5 tahapan pengolahan dimana dengan aerasi dan pengocokan

yang kuat memungkinkan mikroba aerob dapat melakukan peranannya dengan baik.

B. Biokonversi secara anaerob

Rancangan model digester untuk biokonversi secara anaerob telah dibuat namun belum dapat direalisasikan sementara masih ada bagian dari digester itu yang belum selesai.

C. Pengembangan kultur mikroalga

Dalam melakukan pembiakan mikroalga dilakukan dalam bejana kultur dengan volume sampai ratusan liter. Untuk mendapatkan biomasa dari cairan pertumbuhannya yang dalam jumlah banyak, dengan cara filtrasi tidak mungkin dilakukan. Untuk itu dalam kegiatan penelitian pengembangan kultur mikroalga juga dilakukan berbagai percobaan proses pemanenan dengan pengendapan.

1. Isolasi dan identifikasi

Dari perjalanan eksplorasi ke Sumatera Utara dan D.I. Aceh dalam rangka kunjungan ke pabrik pulp dan kertas juga telah dilakukan eksplorasi mikroalga di perairan-perairan tawar di kedua daerah ini. Beberapa contoh air yang mengandung mikroalga telah diperoleh untuk diidentifikasi dengan cara observasi dibawah mikroskop.

2. Produksi biomassa

Dengan mengembangkan penggunaan berbagai medium yang disederhanakan, yaitu air kran dengan variasi penambahan Z.A., T.S.P. dan Urea untuk mendapatkan komposisi terbaik bagi pertumbuhan *Chlorella pyrenoidosa*. Untuk meningkatkan produk yang lebih tinggi, komposisi dari medium (urea, TSP & ZA) dicari alternatif lain seperti penggunaan pupuk Gandasil B yang diharapkan dapat meningkatkan produksi biomassa dan kandungan protein dalam waktu yang relatif lebih singkat. dari pada hanya menggunakan Urea, TSP atau ZA.

Untuk mendapatkan hasil yang lebih baik lagi dilakukan percobaan lanjutan dari tahap pertama yaitu pengaruh pengocokan terhadap pertumbuhan *Chlorella pyrenoidosa* dengan variasi lama pengocokan 0, 2, 4, 6, dan 8 jam di dalam bejana.

3. Pengembangan proses pemanenan

Untuk mendapatkan biomasa *Chlorella pyrenoidosa* dalam kuantitas besar. Cara yang dapat dipakai adalah dengan pengendapan, dalam kegiatan ini dicobakan 4 cara pengendapan untuk memilih cara terbaik akan diaplikasikan. Cara tersebut antara lain:

- a. dibiarkan selama 36 - 40 jam (bioflok)
- b. diamkan 6 - 8 jam kemudian ditambah 100 mg/L alum (bioflok + 1/2 alum)
- c. diberikan 250 mg/L alum (flokulasi)
- d. diberikan tepung kepala udang (pengganti chitin)

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Biokonversi secara aerob

1. Isolasi mikroba

Dari lumpur aktif kolam penampungan pabrik pulp PT Indorayon Utama berhasil diisolasi 10 macam isolat yang berbeda morfologi yang terdiri dari 4 jenis bakteri dan 6 jenis kapang. Sementara dari lumpur aktif digester pengolahan air limbah PT Kertas Kraft Aceh tidak diperoleh adanya koloni yang tumbuh pada agar dengan 5% black liquor. Dari lumpur aktif 3 pabrik lainnya masih berlangsung dimana hasilnya belum dapat dilaporkan disini.

2. Pengujian potensi biak mikroba

Kombinasi penambahan sumber N dan C menentukan dapat tumbuhnya kapang dalam medium limbah tersebut. *Aspergillus awamori* ternyata menunjukkan pertumbuhan yang terbaik diikuti oleh *Aspergillus sp. KT-11* ditempat kedua. Percobaan dengan biak yang terbaik tumbuhnya menunjukkan bahwa variasi sumber karbon erat hubungannya dengan tingkat penurunan intensitas

warna, dimana kepekatan terbaik adalah antara 0,4 % sampai 0,6 % ,dimana medium menjadi jernih setelah 7 hari dengan pengurangan warna hingga 98%. Percobaan konfirmasi dengan menggunakan biak *Aspergillus awamori* terhadap cairan hitam dari pabrik pulp PT Basuki Rachmat menunjukkan hasil yang sama setelah cairan tersebut diencerkan hingga 16 kali.

Percobaan juga dilakukan dengan menggunakan kapang *Aspergillus sp. KT-11* pada medium cairan limbah sama yang diencerkan 10 x, dengan menambahkan 0.1 % ammonium sulfat dan 0.8% glukosa dengan variasi macamnya inokulum yang dipakai. Penurunan intensitas warna terjadi pada biakan dengan inokulum spora (12 - 16%) dan biakan dengan inokulum miselium mati 23% setelah inkubasi selama 7 hari.

Uji potensi isolat bakteri hasil pengucilan dari lumpur aktif bersama dengan biak biak bakteri yang telah diketahui identitas tersebut di atas sampai saat ini masih berlangsung. Hasil percobaan belum dapat dilaporkan dalam laporan tahunan ini.

3. Pengembangan model digester aerob

Agitator dari digester ini belum dapat terpasang dengan baik dan sistim aerasi dengan menggunakan "air stone" kurang baik untuk memberikan oksigen yang cukup dalam lumpur aktif. Untuk sementara sedang dilakukan usaha pemasangan agitator dalam alat ini dan menggantikan sistim aerasi dengan bentuk lain yang dapat memberikan tekanan udara yang cukup. Disamping itu survey dan kunjungan ke beberapa pabrik pulp dan kertas untuk memperoleh jenis lumpur aktif dan sumber mikroba perlu segera dilakukan .

B. Biokonversi secara anaerob

Belum ada hasil yang dapat dilaporkan karena masih ada kendala dalam pengoperasian digestornya.

C. Pengembangan kultur mikroalga

1. Isolasi dan identifikasi

Hasil observasi dibawah mikroskop dari contoh air yang diambil dari kolam ikan didaerah Geudong -

Kecamatan Samudera, Aceh Utara menunjukkan adanya mikroalga dari jenis-jenis : *Skletonema*, *Phytocoria*, *Scenedesmus* , *Chroococcus* dan *Pamella*. Sedang dari perairan Danau Air Tawar di kota Takengon (Aceh Tengah) diperoleh mikroalga dari jenis-jenis : *Anabaena*, *Nitrosonia*, *Closterium*, *Haematococcus* dan *Scenedesmus*. Dan dari kolam yang ada di kota Lhokseumawe (Aceh Utara) berhasil diidentifikasi adanya mikroalga *Pediastrum*, *Closterium*, *Tabellaria*, *Nitrosenia*, *Scenedesmus*, *Cymbela* dan *Anabaena*. Jenis-jenis mikroalga ini sedang dicoba dimurnikan untuk dikembangkan lebih lanjut untuk memperoleh galur yang terbaik terutama 3 jenis yang sedang dikembangkan dalam penelitian ini.

2. Produksi biomassa

Dengan menggunakan medium kompleks (MBM + A₅) pada medium kultur 2 liter selama 6 hari kultur diperoleh biomasa 7.2 gram/L yang mengandung 55% protein dan 8,95 mg/gram/L klorofil, sedang bila menggunakan medium sederhana yang terdiri dari 0.3 gram/L TSP, 0.8 gram/L Z.A. dan 1.6 gram/L Urea diperoleh yang terbaik selama 6 hari kultur 1.2 gram/L biomasa dengan kandungan protein 52,5 % dan 1.09 mg/gram/L khlorofil. Sedangkan kandungan protein , khlorofil dan biomasa yang diperoleh pada media terbaik dengan penambahan Urea + TSP + ZA yang ditambah pupuk Gandasil B (1 g/L) menunjukkan adanya peningkatan masing-masing: untuk protein 54 %, khlorofil 3.2 mg/g/L dan untuk biomasa 1.85 g/L . Komposisi 0.3 g/L TSP + 0.8 g/L + 1.6 g/L Urea dan 1 g/L Gandasil B terus dikembangkan hingga 120 liter dengan hasil yang diperoleh 600 - 800 mg/L biomassa, protein 50 - 53% dan khlorofil 0.9 mg/g/L.

Dari pengembangan pengaruh pengocokan, diperoleh hasil produksi maksimum pada hari ke 5 dalam botol kultur dengan lama pengocokan 8 jam per hari yaitu: 2.51 g/L biomassa, 3.85 mg/g/L khlorofil, 55% protein dengan kuantitas sel 24×10^6 sel/ml. Sedang pada

media kontrol tanpa pengocokan produksi maksimum dicapai pada hari ke 6. Dari hasil yang diperoleh pada seluruh media dengan pengocokan ternyata ada sedikit peningkatan produksi biomassa, protein, khlorofil dan jumlah sel dibandingkan dengan biakan tanpa pengocokan.

3. Pengembangan proses pemanenan

Dari 3 cara a, b dan c diperoleh hasil sebagai tabel ini:

MEDIA Proses pemanenan	Urea+ TSP + ZA	Gandasil+Urea+ TSP+ZA
Flokulasi alum	hijau pucat	hijau muda
Bioflok + 1/2 alum	hijau pucat-muda	hijau
Bioflok	-	hijau tua

Kelemahan ke 3 cara ini adalah : bioflok terlalu lama prosesnya dapat menyebabkan pembusukan biomasa, sedang penambahan alum (mengandung alumunium) kurang baik terutama bila biomasa tersebut digunakan sebagai bahan pangan. Sementara percobaan cara d (penambahan substitusi chitin) sampai saat ini masih berlangsung.

KESIMPULAN

Percobaan biokonversi limbah secara aerob dengan menggunakan digester yang diberi stater lumpur aktif belum dapat dilakukan karena alat pengocok otomatis tidak dapat berfungsi. Dari lumpur aktif beberapa pabrik pulp berhasil diisolasi 10 isolat mikroba yang mampu tumbuh pada medium cairan hitam. Dalam realisasi biokonversi biak hasil isolasi bersama 10 biak yang telah diidentifikasi dicona ditumbuhkan pada air limbah dengan berbagai variasi suplementasi. Percobaan yang dilakukan dengan biak kapang *Aspergillus awamori* menunjukkan pertumbuhan yang terbaik pada air limbah pulp (black liquor) yang diencerkan sampai 16 kali yang telah diberi sumber karbon dan nitrogen. dan

mampu menurunkan intensitas warna sampai 98 %. Percobaan biokonversi dengan digester baik secara aerob maupun anaerob untuk sementara belum dapat dilakukan. Uji potensi biak bakteri dalam mengkonversi lignosulfit masih berlangsung.

Dalam pengembangan kultur mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* sedang dikembangkan medium kultur yang sederhana yang terdiri dari Urea, TSP dan ZA dengan penambahan pupuk Gandasil B. Untuk sementara kuantitas biomasa, protein dan khlorofil yang diperoleh dari biakan pada medium ini belum dapat melebihi kuantitas yang diperoleh bila menggunakan medium kompleks MBM+A₅. Dengan mengembangkan pengocokan pada pertumbuhan mikroalga ternyata dapat meningkatkan produksi pengkulturan. Dalam pemanenan biomasa tersebut cara yang efektif dan aman dengan pengendapan memakai substitusi chitin sedang dikembangkan.

DAFTAR PUSTAKA

- ALONSO, M.S; V. KARALI, P. MANGE & M. TROCME, 1984. Rapport sur la visite a la fabrique de Cellulose de Attisholz. Institute de Genie de l'Environement Ecole Polytechnique Federale de Lausanne (Swiss) 12 p
- BALAI BESAR SELULOSA, 1992. Laporan Perjalanan Kunjungan ke Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Industri Selulosa Bandung. Puslitbang Bioteknologi - LIPI pada tanggal 2 Juni 1992. 10 p.
- FUKUZUMI, T., 1980. Microbial Decoloration and Defoaming of Pulping Waste Liquors. in T. Ken Kirk, T. Higuchi & H. Cheng, Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Application Vol.II CRC Press.
- GUTTERSTAM, B. & J. TODD, 1990. Ecological Engineering for Waste Water Treatment and Its Application in New England and Sweden. AMBIO 19 (3) : 173 - 175
- HANSSON, S., 1987. Effect of Pulp and Paper Mill Effluent on Coastal Fish Communities in the Gulf of Bothnia, Baltic Sea. AMBIO 16 (6) : 344 - 348
- TONO, T., T. TANI & K. ONO, 1968. Microbial Treatment of Agricultural Industrial Waste. Part II: Adsorption of Lignin and Clarification of Lignin-Containing Liquor by Mould. J. Ferment. Technol. 46 : 569
-

TOLOK UKUR 01.05
BIOTEKNOLOGI TRANSFER EMBRIO
(1 Laporan)

TEKNOLOGI TRANSFER EMBRIO

Koordinator : B. Tappa
Anggota : A. Soeksmanto
E.M. Kaiin
E.T. Margawati

PENDAHULUAN

Kelompok penelitian teknologi transfer embrio pada tahun anggaran 1992/1993 mempunyai 3 kegiatan yaitu : 1) melanjutkan penelitian transfer embrio pada sapi di Unit peternakan Tapos, 2) Ujicoba aplikasi transfer embrio pada sapi peternak di 5 desa Kabupaten Rejang Lebong, Bengkulu dan 3) Mikromanipulasi embrio mencit.

Kegiatan transfer embrio (TE) dimulai tahun 1989/1990 dengan tekanan pada sapi potong di Unit Peternakan Tapos dengan persentase keberhasilan 42-57% (Tappa, dkk., 1992). Sedangkan aplikasi TE pada sapi perah dimulai tahun 1991 dengan menggunakan sapi perah jenis Hongarian.

Pada hewan percobaan telah dilakukan kultur embrio mencit sebagai persiapan untuk melakukan penelitian mikromanipulasi embrio.

Tujuan penelitian ini adalah : 1) Untuk mengetahui pengaruh pemberian hormon terhadap superovulasi dan kualitas embrio, 2) Mengetahui pengaruh tahap perkembangan embrio mencit, kondisi kultur dan media terhadap keberhasilan perkembangan embrio yang dikultur.

BAHAN DAN CARA KERJA

1. Transfer embrio sapi di Unit Peternakan Tapos

Sebanyak 6 ekor sapi Hongarian (umur \pm 5 tahun) dan 25 ekor resipien sapi Brangus yang dipelihara di Unit Peternakan Tapos, digunakan sebagai sapi donor dan resipien setelah melalui seleksi. Sapi-sapi donor disuperovulasi dengan penyuntikan hormon PMSG (Folligon, Intervet Holland) sebanyak 3000 IU secara intra muskular pada hari ke-10 siklus berahi. Dua hari setelah pemberian PMSG dilakukan penyuntikan Prostaglandin F 2 alpha (Prosolvin, Intervet Holland)

sebanyak 15 mg secara intra muskular. Donor yang memperlihatkan gejala-gejala berahi ("standing heat" = diam sewaktu dinaiki betina lainnya) dikawinkan dengan pejantan yang sama sebanyak 3 kali yaitu sewaktu "standing heat", 6 jam setelah "standing heat" dan 12 jam setelah "standing heat". Panen embrio dilakukan pada hari ke-7 setelah kawin dengan metode tanpa operasi dengan memakai kateter Foley dan larutan Dulbecco's Phospat Buffer Saline (DPBS) dengan menambahkan 1% Fetal Calf Serum (FCS). Embrio yang tertampung dari saringan diperiksa dan dievaluasi di bawah mikroskop berdasarkan bentuk morfologi : terbaik, baik, kurang baik dan jelek (Elsden *et al.*, 1978). Embrio kualitas terbaik dan baik dipindahkan ke larutan DPBS + 20% FCS dan disiapkan untuk ditransfer ke sapi-sapi resipien.

Transfer embrio ke sapi-sapi resipien dilakukan pada hari ke-7 setelah berahi dengan metode tanpa operasi menggunakan 0,25 ml "Cassou gun insemination". Setiap resipien menerima satu embrio kualitas terbaik atau baik dan ditanam pada posisi uterus yang mempunyai CL aktif.

Pemeriksaan pertama kebuntingan dilakukan pada hari ke-21 setelah transfer dengan melihat tanda-tanda berahi. Apabila tidak timbul berahi berarti bunting. Pemeriksaan kedua dilakukan setelah umur kebuntingan 2-3 bulan dengan palpasi rektal.

2. Uji coba aplikasi transfer embrio pada sapi peternak di Bengkulu

Cara kerja yang dilakukan sama dengan kegiatan transfer embrio di Unit Peternakan Tapos yaitu serangkaian kegiatan yang terdiri dari :

- a. Seleksi sapi donor dan resipien
- b. Penyerentakan berahi sapi donor dan sapi resipien
- c. Superovulasi
- d. Deteksi berahi dan inseminasi buatan/mengawinkan donor
- e. Koleksi dan transfer embrio
- f. Pemeriksaan kebuntingan

3. Mikromanipulasi embrio mencit

Penelitian ini menggunakan mencit strain Swiss Webster betina yang sudah dewasa seksual. Mencit dipelihara dalam kandang plastik dan ditempatkan di kandang hewan dengan pengaturan cahaya 12 jam terang (pukul 06.00-18.00) dan 12 jam gelap (pukul 18.00-06.00). Pakan dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

Superovulasi dilakukan terhadap mencit betina dengan penyuntikan hormon PMSG (Prosolvlin, Intervet Holland) sebanyak 5 IU/ekor secara intra peritoneal dan 48 jam kemudian disuntik dengan hormon hCG (Chorulon, Intervet Holland) dosis 5 IU/ekor secara intra peritoneal, kemudian disatukan dengan hewan jantan. Keesokan harinya adanya sumbat vagina, jika ada maka ditentukan sebagai hari kebuntingan ke-0. Koleksi embrio dilakukan pada hari ke-3 kebuntingan.

Embrio dikoleksi dengan cara pencucian uterus mencit yang telah dimatikan secara dislokasi leher. Pencucian uterus dilakukan menggunakan media M2 segar dengan syringe 1 ml. Pengamatan dan perhitungan jumlah embrio dilakukan di bawah mikroskop ste-reo. Sebelum dikultur, embrio dicuci sebanyak dua kali dalam media M16 kemudian dikultur dalam titik media M16 dalam cawan petri dan ditutup dengan minyak parafin. Cawan yang berisi media dan embrio dikultur dalam inkubator CO₂ (5% CO₂) dengan temperatur 37 ° C. Pengamatan dilakukan pada waktu 24 samapi dengan 72 jam sesudah dikultur.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Transfer embrio pada sapi

Penyerentakan berahi

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa dari 6 ekor yang disuntik hormon, semuanya respon dengan gejala berahi dapat dilihat secara jelas yaitu diam sewaktu dinaiki oleh betina lainnya, keluarnya lendir transparan melalui vulva dan terjadi pembengkakan vulva serta berwarna kemerahan dalam waktu yang bersamaan 70-96 jam setelah penyuntikan PGF 2

alpha. Penyuntikan PGF 2 alpha menunjukkan bahwa sapi Hongarian memberikan respon yang cukup baik terhadap penyerentakan berahi. Hasil ini hampir sama dengan yang dilakukan pada sapi daging jenis Brangus (Tappa, dkk., 1992).

Superovulasi

Hasil jumlah ovulasi dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan hasil pada tabel tersebut, terlihat bahwa dari 6 ekor yang disuntik hormon, 5 ekor respon terhadap superovulasi dengan rata-rata 3,6 CL per ekor (kisaran 2-5). Hasil ini lebih rendah dibandingkan dengan penelitian terdahulu dan pada sapi daging jenis Brangus rata-rata 12,3 CL per ekor (kisaran 9-40) (Tappa, dkk., 1992).

Koleksi dan evaluasi embrio

Jumlah embrio yang dikoleksi dari 5 ekor donor sebanyak 16 dengan tingkat perkembangan tahap morula dan blastosis (Tabel 2). Dari data tersebut terlihat bahwa dari 6 ekor donor, 3 ekor donor berhasil dikoleksi embrio dengan baik (75-200%), dari 1 ekor hanya dikoleksi 2 embrio, 1 ekor tidak ditemukan embrio dan 1 ekor tidak respon terhadap superovulasi. Kualitas embrio yang dikoleksi adalah terbaik dan baik. Tahap-tahap perkembangan embrio yang dikoleksi sesuai dengan yang diperkirakan karena embrio yang dikoleksi pada umur 7 hari setelah kawin sudah berada dalam saluran uterus.

Tabel 1. Jumlah ovulasi berdasarkan jumlah corpus luteum (CL)

No. Donor	Banyaknya CL		Jumlah
	ovarium kanan	ovarium kiri	
HG 0033	2	3	5
HG 0055	2	3	5
HG 0052	3	1	4
HG 101	2	0	2
HG 095	2	0	0
HG 044	Tidak respon		
Jumlah	11	7	18
Rata-rata	2,2	1,4	3,6

Tabel 2. Hasil koleksi dan perkembangan embrio

No. Donor	Jumlah CL	Jumlah embrio yang dikoleksi (%)	Perkembangan embrio		Kualitas Embrio
			Morula	Blastosis	
HG 0033	5	10 (200)	-	10	Terbaik
HG 0055	5	1 (20)	-	1	Baik
HG 0052	4	3 (75)	-	3	Baik
HG 101	2	2 (100)	2	-	Terbaik
HG 095	2	0 (0)	-	-	-

Transfer embrio

Transfer embrio ke resipien dilakukan pada umur 7 hari setelah berahi. Sebanyak 13 ekor resipien dari 25 ekor yang diserentakkan berahinya digunakan pada kegiatan transfer embrio kali ini. Embrio ditempatkan pada uterus yang mempunyai ovarium dalam keadaan CL aktif (Tabel 3.).

3. Mikromanipulasi embrio menci

Hasil koleksi embrio pada hari kebuntingan ke-3 dapat dilihat pada Tabel 4. Dari 4 ekor induk donor yang respon terhadap superovulasi, berhasil dikoleksi sebanyak 151 embrio. Jumlah embrio yang hidup sebanyak 113 dan yang mengalami degenerasi sebanyak 38 embrio. Dari tabel ini juga terlihat bahwa jumlah embrio hasil koleksi tidak terlalu penting tetapi kualitas embrio dan jumlah embrio hidup yang dapat terkoleksi lebih berperan untuk mendapatkan hasil kultur yang lebih baik.

Tahap perkembangan embrio hidup yang dikoleksi adalah kompak morula sampai hatched blastosis (Tabel 5.). Sebanyak 105 embrio dikultur dalam media M16 di dalam inkubator CO₂ (5% CO₂, 37^o C) selama 24 jam diperoleh hasil seperti terlihat pada Tabel 6. Embrio yang berhasil tumbuh sebanyak 87,6% dan sisanya mengalami degenerasi.

Tabel 3. Transfer embrio ke resipien

No. Resipien	Jumlah embrio yang di-transfer	Tahap perkembangan/ kualitas embrio	Posisi penempatan embrio di uterus		Keadaan bunting
			kanan	kiri	
BG 0064	1	Blastosis/Terbaik	1	-	-
BG 0396	1	Blastosis/Terbaik	-	1	+
BG 0441	1	Blastosis/Terbaik	1	-	+
BG 0398	1	Blastosis/Terbaik	-	1	+
BG 0358	1	Blastosis/Terbaik	-	1	-
BG 0053	2	Blastosis/Terbaik	-	2	-
BG 0198	1	Blastosis/Terbaik	-	1	-
BG 0032	1	Blastosis/Terbaik	1	-	-
BG 0036	1	Blastosis/Terbaik	-	1	+
BG 0013	1	Blastosis/Baik	1	-	-
BG 0312	1	Blastosis/Baik	1	-	+
BG 0353	1	Morula/Terbaik	1	-	-
BG 0235	1	Morula/Terbaik	1	-	-

Keterangan : Dari 5 ekor resipien yang bunting, sampai dengan Maret 1993 telah lahir 2 ekor anak

2. Uji aplikasi transfer embrio di Bengkulu

Sebanyak 5 ekor sapi bangsa Simental dipakai sebagai donor dan 25 ekor sapi Brahman Cross, Bali, peranakan Ongole sebagai resipien. Dari 5 ekor sapi donor, diperoleh 2 ekor sapi yang memberikan respon superovulasi dan 1 ekor berhasil dilakukan koleksi dengan memperoleh sebanyak 5 embrio tahap morula. Kelima embrio tersebut kemudian ditransfer ke 5 ekor resipien yang telah disinkronisasi berahi sebelumnya. Pada pemeriksaan kebuntingan pertama, diperoleh 2 ekor resipien bunting, tetapi setelah pemeriksaan kebuntingan kedua ternyata sapi-sapi tersebut mengalami aborsi.

Tabel 4. Embrio hasil koleksi dan evaluasi

No. induk	Jumlah embrio terkoleksi	Jumlah embrio hidup	Jumlah embrio degenerasi
1	31	31	0
2	24	24	0
3	65	33	32
4	31	25	6
Jumlah	151	113	38

Tabel 5. Tahap perkembangan embrio hasil koleksi

Tahap perkembangan	Jumlah
kompak morula dan blastosis awal	95
blastosis	7
expanded blastosis	6
hatched blastosis	5
Jumlah	113

Tabel 6. Pertumbuhan embrio hasil kultur selama 24 jam

Jumlah embrio yang dikultur	Embrio hasil kultur pada tahap perkembangan			
	blastosis	expanded bl.	hatched bl.	degenerasi
105	21(20%)	63(60%)	8(7,6%)	13(12,4%)

Keterangan : bl. : blastosis

KESIMPULAN

Ternak sapi perah jenis Hongarian memberikan respon yang cukup baik terhadap sinkronisasi berahi dan superovulasi setelah penyuntikan hormon. Jumlah corpora lutea diperkirakan hampir sama dengan jumlah embrio yang diperoleh, ada juga yang lebih banyak dari yang diperkirakan. Tahap perkembangan embrio yang ditemukan adalah morula dan blastosis dengan kualitas embrio terbaik dan baik.

Uji coba aplikasi transfer embrio pada sapi peternak di Bengkulu belum berhasil (sapi mengalami abortus) karena adanya berbagai kendala seperti kondisi sapi peternak yang kurang baik, pemeliharaan sesudah transfer/kebuntingan yang kurang sempurna, lokasi peternak yang berjauhan, dan lain-lain. Oleh karena itu diperlukan penyuluhan yang intensif untuk lebih memperkenalkan kegiatan transfer embrio.

Kultur embrio telah dapat dilakukan dengan menggunakan embrio mencit sehingga diperoleh embrio yang mengalami perkembangan dari tahap sebelumnya sebesar 87,6%. Hasil ini diharapkan dapat mendukung kegiatan selanjutnya menggunakan embrio sapi sebagai bahan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Elsden, R.P., L.D. Nelson dan G.E. Seidel. 1978. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenologi* 9 : 17.
- Elsden, R.P. dan G.E. Seidel. 1985. Procedures for Recovery, Bisection, Freezing and Transfer of Bovine Embryos. Animal Reproduction Laboratory, Colorado State Univ. Fort Collins, Colorado 80523.
- Hafez, E.S.E. 1970. Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Hogan, B., F. Costantini dan E. Lacy. 1986. Manipulating the Mouse Embryo : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- Steel, R.G.D. dan J.H. Torrie. 1984. Principle and Procedure of Statistics. 2nd Ed. Mc. Graw-Hill, Company, Inc. New York.
- Sudjana, M.A. 1985. Disain dan Analisis Eksperimen. Tarsito. Bandung.
- Tappa, B., E.T. Margawati, N. Mulyaningsih, A. Soeksmanto dan M. Suecha. 1992. Respon sinkronisasi, superovulasi dan transfer embrio segar dan embrio beku setelah kriopreservasi pada sapi daging. Proceeding Seminar Hasil Litbang Bioteknologi. Bogor 11-12 Pebruari 1992.
-