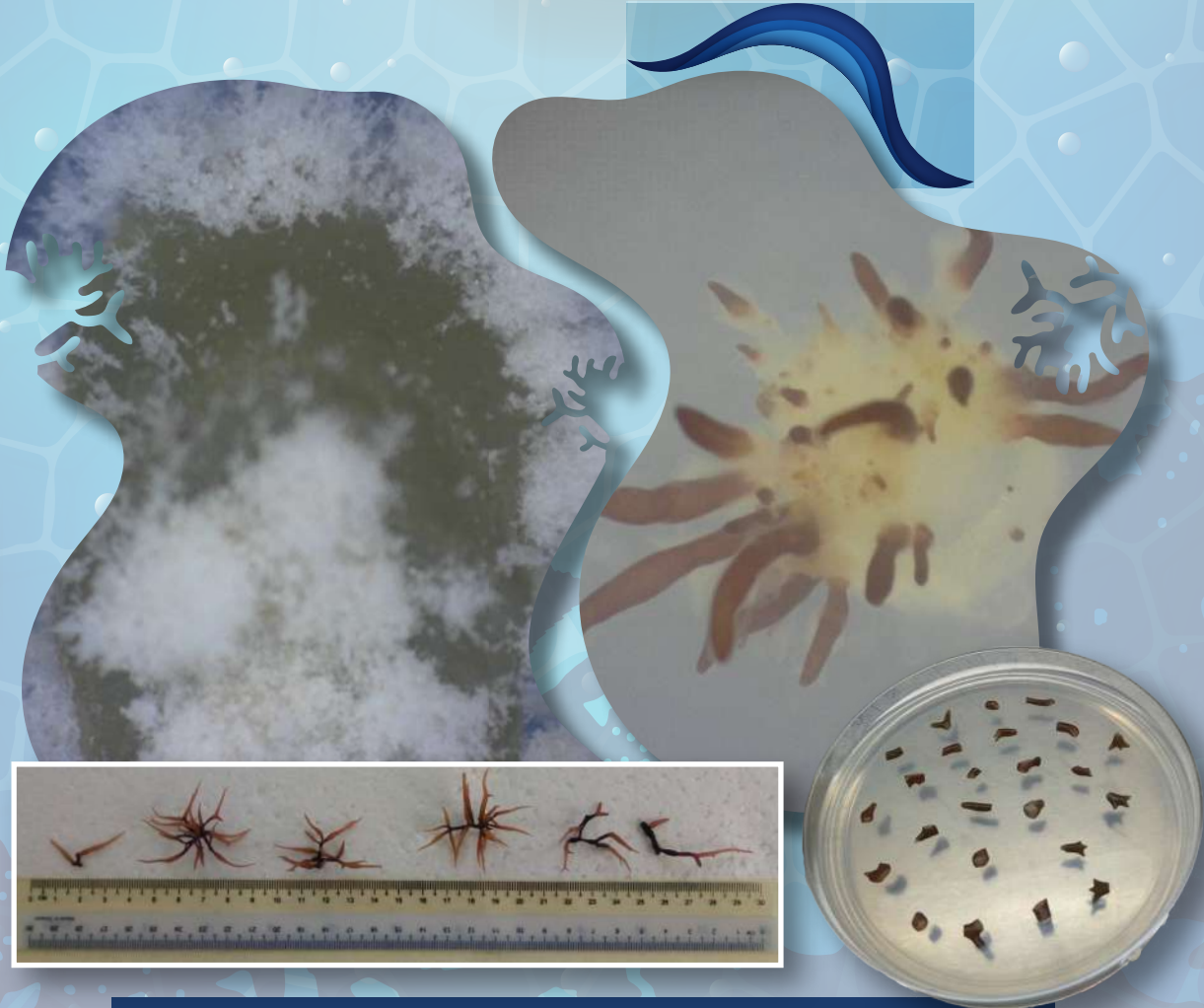




KEMENTERIAN PERTANIAN
DAN KETERJAMINAN MAKANAN
JABATAN PERIKANAN MALAYSIA

MANUAL KULTUR TISU RUMPAL LAUT

(*Kappaphycus alvarezii* dan *Kappaphycus striatus*)



PUSAT PENYELIDIKAN LANGKAWI

MANUAL KULTUR TISU RUMPAI LAUT

(Kappaphycus alvarezii dan Kappaphycus striatus)

Muhammad Asyraf Abd Latip

Nik Nazli Effendy Ramli

Siti Noor Ain Hamzah

Nik Daud Nik Sin

PUSAT PENYELIDIKAN LANGKAWI

07000 LANGKAWI

KEDAH



Cetakan 2025

© Institut Penyelidikan Perikanan (FRI) Malaysia

Hak Cipta Terpelihara. Tidak dibenarkan mengeluarkan mana-mana bahagian artikel, ilustrasi, dan isi kandungan buku ini dalam apa jua bentuk dan dengan apa jua sama ada cara elektronik, fotografi, mekanik, rakaman, atau cara lain sebelum mendapat izin daripada Ketua Pengarah Jabatan Perikanan Malaysia. Perundingan tertakluk kepada pengiraan royalti dan honorarium.

All right reserved. No part of the articles, illustration and contents of this publication may be reproduced in any form and by any means, electronic, photocopying, mechanical, recording or otherwise without prior permission of the Director General of Fisheries Malaysia. Negotiations are subject to the calculation of royalty and honorarium.

MANUAL KULTUR TISU RUMPAI LAUT

(*Kappaphycus alvarezii* dan *Kappaphycus striatus*)

Muhammad Asyraf Abd Latip, Nik Nazli Effendy Ramli, Siti Noor Ain Hamzah & Nik Daud Nik Sin

Diterbitkan oleh:

Institut Penyelidikan Perikanan (IPP)

11960 Batu Maung

Pulau Pinang

No tel: 04-6263925/26

No faks: 04-6262210

Email: fri_helpdesk@dof.gov.my

Laman web: <https://fri.dof.gov.my>



Data Pengkatalogan-dalam-Penerbitan

Perpustakaan Negara Malaysia

Rekod katalog untuk buku ini boleh didapati
dari Perpustakaan Negara Malaysia

ISBN 978-967-2946-53-3

ISI KANDUNGAN

PRAKATA.....	v
KATA-KATA ALUAN.....	vi
Pengenalan.....	1
KULTUR TISU RUMPAI LAUT	4
1. PEMILIHAN BAKA RUMPAI LAUT DAN PROSES AKLIMITASI..	5
1.1 Perolehan Baka Rumpai Laut.....	5
1.2 Aklimitasi Baka Rumpai Laut	5
2. PENYEDIAAN STOK DAN MEDIA UNTUK PERTUMBUHAN KALUS.....	6
2.1 Pensterilan Air Laut.....	6
2.2 Penyediaan Larutan <i>Provasoli Enriched Seawater</i> (PES).....	8
2.3 Jenis-jenis Media untuk Kultur Tisu.....	11
3. PERINGKAT 1 – KULTUR TISU AGAR.....	13
3.1 Persediaan Awal.....	13
3.2 Persediaan Sampel Rumpai Laut.....	14
3.3 Proses Sterilisasi Tisu Rumpai Laut.....	15
4. PERINGKAT 2 – KULTUR TERBENAM (<i>EMBEDDED</i>)	17
4.1 Penyediaan Media dan Peralatan.....	17

4.2 Tatacara Kerja.....	19
5. PERINGKAT 3 – KULTUR CECAIR.....	20
5.1 Penyediaan Media dan Peralatan.....	21
6. PERINGKAT 4 - KULTUR CECAIR BERUDARA (<i>AERATED</i>)	23
6.1 Penyediaan Media dan Peralatan.....	24
7. PERINGKAT 5 - NURSERI (PELEPASAN BIBIT DI LUAR MAKMAL)	25
7.1 Tatacara Kerja.....	26
PENUTUP.....	29
LIMITASI KAEDAH	29
RUJUKAN.....	30
GLOSSARI.....	31

PRAKATA

Rumpal laut merupakan salah satu sumber yang bernilai tinggi dalam industri akuakultur Malaysia, khususnya dalam penghasilan karagenan yang digunakan secara meluas dalam industri makanan, farmaseutikal, dan kosmetik. Namun, cabaran dalam memastikan bekalan benih yang berkualiti dan mencukupi telah mendorong pelbagai inisiatif penyelidikan untuk meningkatkan pengeluaran rumpal laut secara mampan. Manual ini diterbitkan sebagai panduan komprehensif kepada penyelidik, penternak, dan pihak industri yang berminat untuk menerapkan teknik kultur tisu dalam pembenihan rumpal laut, khususnya bagi spesies *Kappaphycus alvarezii* dan *Kappaphycus striatus*. Buku ini merangkumi lima peringkat utama dalam proses pembenihan rumpal laut menggunakan kultur tisu, bermula dari pemilihan baka hingga pelepasan bibit di lapangan. Kami berharap manual ini dapat membantu memperkukuh industri rumpal laut negara dengan menyediakan teknik pembenihan yang lebih efektif, mengatasi masalah degradasi genetik akibat penggunaan benih secara berulang, serta membuka peluang untuk inovasi dalam bidang akuakultur. Setinggi-tinggi penghargaan diucapkan kepada semua pihak yang telah menyumbang dalam penyelidikan dan penerbitan manual ini. Semoga ia dapat dimanfaatkan sepenuhnya oleh para penyelidik, penternak, dan sesiapa sahaja yang berhasrat untuk mengembangkan potensi industri rumpal laut di Malaysia.

KATA-KATA ALUAN



السَّلَامُ عَلَيْكُمْ وَرَحْمَةُ اللَّهِ وَبَرَكَاتُهُ

dan salam sejahtera,

Saya ingin merakamkan setinggi-tinggi penghargaan kepada para penyelidik dan penulis yang telah menghasilkan MANUAL KULTUR TISU RUMPAI LAUT ini. Manual ini merupakan satu pencapaian

penting dalam usaha memperkasa industri rumpai laut negara, terutamanya dalam memperkenalkan teknik kultur tisu sebagai kaedah inovatif dalam pembenihan rumpai laut.

Seperti yang kita sedia maklum, industri akuakultur memainkan peranan penting dalam menjana ekonomi perikanan negara. Rumpai laut, khususnya spesies *Kappaphycus alvarezii* dan *Kappaphycus striatus*, mempunyai permintaan tinggi di peringkat domestik dan antarabangsa, terutamanya dalam pengeluaran karagenan. Namun, industri ini berdepan cabaran dari segi bekalan benih berkualiti akibat penggunaan baka yang sama secara berulang serta ancaman penyakit. Oleh itu, teknik kultur tisu yang dibincangkan dalam buku ini menawarkan penyelesaian yang mampan untuk memastikan pengeluaran benih yang lebih berkualiti, tahan penyakit, serta dalam kuantiti yang mencukupi.

Saya berharap manual ini dapat dimanfaatkan sepenuhnya dalam usaha untuk meningkatkan produktiviti serta kelestarian sektor akuakultur negara. Institut Penyelidikan Perikanan akan terus komited dalam menyokong penyelidikan dan inovasi demi pembangunan industri perikanan yang berdaya saing.

Sekali lagi, tahniah kepada semua yang terlibat dalam penyediaan manual ini. Diharap lebih banyak penerbitan manual seperti ini pada masa hadapan dan menjadi sumber rujukan yang bermanfaat.

YBRS DR. AZHAR BIN HAMZAH

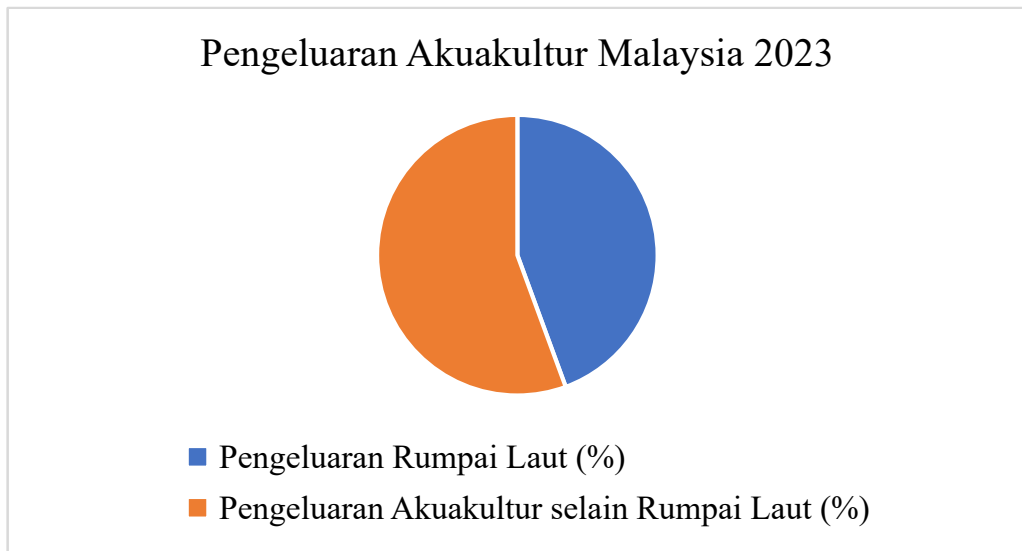
Pengarah Kanan

Institut Penyelidikan Perikanan (FRI)

Batu Maung, Pulau Pinang

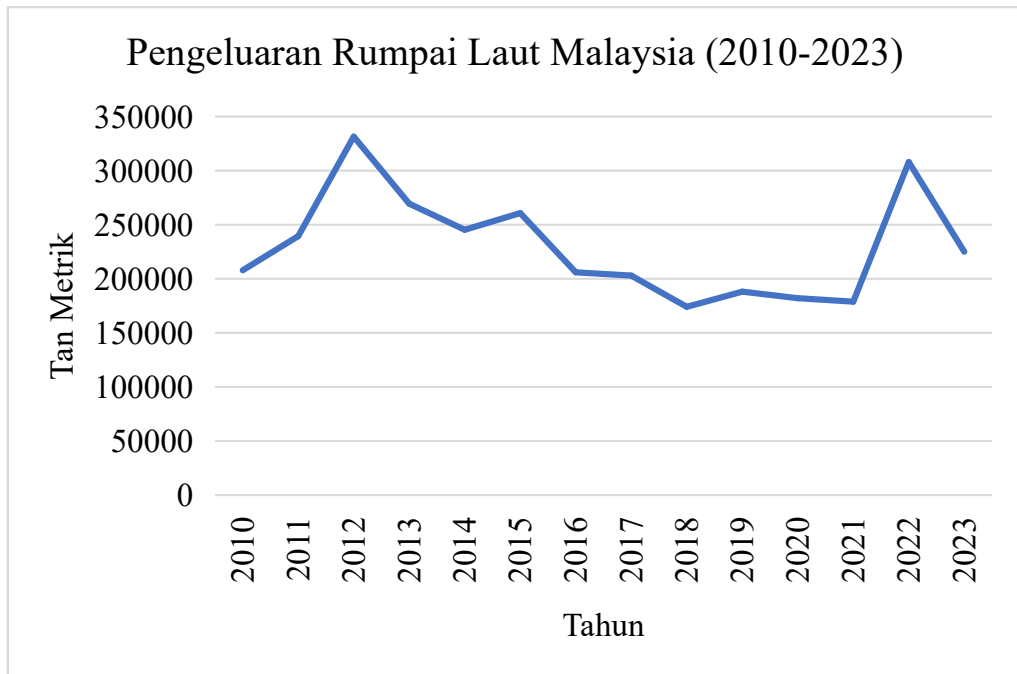
PENGENALAN

Rumpai laut merupakan penyumbang terbesar dalam pengeluaran sektor akuakultur negara. Pada tahun 2023, pengeluaran rumpai laut berjumlah 225,040 metrik tan. Pengeluaran ini adalah 44.4% daripada jumlah keseluruhan pengeluaran akuakultur dalam negara. Di Malaysia, negeri yang paling banyak menghasilkan pengeluaran rumpai laut adalah Sabah. Negeri lain yang turut menyumbang dalam pengeluaran rumpai laut ini adalah Perak, Kedah, Sarawak dan Johor. Senario semasa trend pengeluaran rumpai laut telah menunjukkan penurunan bermula dari tahun 2012 sehingga 2021. Situasi ini turut menjejaskan pengeluaran akuakultur negara.



Gambar 1: Peratus pengeluaran rumpai laut sebanyak 44.4% daripada jumlah keseluruhan pengeluaran akuakultur Malaysia pada tahun 2023.

(Sumber: Perangkaan Perikanan Tahun 2023)



Gambar 2: Trend pengeluaran rumpai laut Malaysia

Pelbagai usaha telah dilakukan oleh pihak Jabatan Perikanan Malaysia untuk meningkatkan hasil pengeluaran rumpai laut. Salah satu daripadanya ialah kajian pembenihan rumpai laut secara kultur tisu yang sedang giat dijalankan di Pusat Penyelidikan Langkawi, Kedah. Spesies rumpai yang digunakan dalam kajian ini adalah *Kappaphycus alvarezii* atau dikenali dengan nama *Giant Tambalang*. Spesies rumpai laut ini merupakan salah satu spesies yang dikultur secara meluas di Malaysia, terutamanya di Sabah. Pembenihan rumpai laut melalui teknik kultur tisu dapat mengatasi masalah kekurangan kuantiti dan kualiti benih. Teknik pengkulturan tradisional iaitu secara *micropropagation*

telah menyebabkan kualiti benih semakin berkurangan, kerana penggunaan baka rumpai yang sama secara berulang-ulang. Manakala, pembenihan secara kultur tisu dapat mengekalkan kualiti benih serta menghasilkan benih dalam kuantiti yang banyak dalam satu-masa. Rumpai laut *Kappaphycus* sp. digunakan untuk menghasilkan karagenan iaitu sejenis polisakarida yang penting dalam pelbagai industri sebagai bahan pemekat dan penstabil.

KULTUR TISU RUMPAI LAUT

Teknik pembenihan rumpai laut kultur tisu ini melibatkan lima (5) peringkat:

- Peringkat pertama: Kultur Agar
- Peringkat kedua: Kultur Terbenam (*Embedded*)
- Peringkat ketiga: Kultur Cecair
- Peringkat keempat: Kultur Cecair Berudara (*Aerated*)
- Peringkat kelima: Nurseri

Setiap peringkat ini mengambil masa antara 3 – 4 bulan bergantung pada kualiti eksplan yang digunakan.



Gambar 3: *Kappaphycus alvarezii* (Giant Tambalang)

1. PEMILIHAN BAKA RUMPAI LAUT DAN PROSES AKLIMITASI

1.1 Perolehan Baka Rumpai Laut

Kappaphycus alvarezii (*Giant Tambalang*) dan *Kappaphycus striatus* mudah diperolehi di negeri Sabah dengan harga yang murah, terutamanya di kawasan Lahad Datu, Kunak, Semporna dan Tawau. Rumpai laut segar akan dibawa secara lembab di dalam kotak polisterin ke Pusat Penyelidikan Langkawi (PPL). Setelah tiba di PPL, rumpai laut tersebut akan ditempatkan di dalam tangki gentian kaca (*fiberglass*) atau kanvas bulat yang telah diisi dengan air laut bersih. Baka rumpai laut akan dibiarkan dengan pengaliran air laut yang berterusan, sumber cahaya semulajadi dan pengudaraan.

1.2 Aklimitasi Baka Rumpai Laut

Proses aklimitasi baka rumpai laut mengambil masa selama dua minggu di dalam tangki dengan pemerhatian berkala. Baka rumpai laut yang berkualiti dan bebas penyakit akan dipilih untuk dibuat kultur tisu. Antara faktor yang diambil kira sabagai calon baka rumpai laut adalah:

1. Pertumbuhan pucuk/tunas baru pada batang baka rumpai laut.
2. Bebas penyakit tumbuhan epifit dan penyakit *ice-ice*.
 - Epifit adalah sejenis organisma yang melekat pada badan rumpai laut.

- Penyakit *ice-ice* menyebabkan berlakunya perubahan warna fizikal rumpai laut kepada warna keputihan seperti ais.



Gambar 4: Proses aklimitasi baka rumpai laut di dalam tangki.

2. PENYEDIAAN STOK DAN MEDIA UNTUK PERTUMBUHAN KALUS

1.1 Pensterilan Air Laut

Kemasan air laut yang optimum untuk digunakan bagi proses kultur tisu rumpai laut adalah antara 30 - 34 ppt. Air laut perlu disterilkan terlebih dahulu melalui kaedah penapisan untuk penyediaan larutan stok dan media. Proses ini penting supaya mikroorganisma atau kotoran yang terkandung di dalam air tidak

mencemarkan kultur rumpai laut di setiap peringkat. Air laut disedut dengan menggunakan Pam Vakum Mini Microsart (Sartorius) dan melalui penapis cakera gentian mikro (Bioflow) yang berdiameter 47mm dan bersaiz liang 1.2 mikrometer (μm). Air laut tersebut dikumpulkan kedalam balang yang telah disterilkan melalui autoklaf. Setiap satu cakera gentian mikro boleh menapis sehingga 2 L air laut. Balang tapisan air laut dilabel tarikh dan saliniti dan disimpan pada suhu bilik.



Gambar 5: Air laut disterilkan menggunakan Pam Vakum Mini Microsart (Sartorius) dan melalui penapis cakera kaca gentian mikro (Bioflow).

2.2 Penyediaan Larutan *Provasoli Enriched Seawater* (PES)

Larutan PES adalah medium asas air laut yang mengandungi pelbagai campuran nutrien sebagai media kultur untuk membantu dan menyokong pertumbuhan mikroalga. Penghasilan kalus yang banyak dan berkualiti dalam kultur tisu rumpai laut sangat bergantung kepada media yang dihasilkan. Bagi memastikan penghasilan media yang berkualiti dan tidak tercemar, pastikan kaedah penyediaan dijalankan dalam keadaan steril. Kod etika penyediaan media kultur di makmal perlu dipatuhi seperti memakai sarung tangan, baju makmal dan penutup mulut. Perlu diingatkan dan ambil langkah keselamatan dengan memakai penutup muka semasa menggunakan bahan kimia untuk penyediaan media dan larutan stok kerana ianya bersifat menghakis. Sebelum larutan media PES disediakan, beberapa larutan stok perlu disediakan terlebih dahulu. Berikut adalah cara penyediaan larutan stok bagi setiap 1 L air suling:

2.2.1 Bahan bagi larutan stok Fe untuk 1 L air suling

Jadual 1: Bahan kimia untuk penyediaan larutan stok Fe.

No	Kod bahan	Nama bahan	Jumlah berat
1	215406	Ammonium iron (II) sulphate hexahydrate, Sigma $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.702 g
2	E0511	Ethylenediaminetetraacetate (EDTA) disodium dihydrate, Duchefa Biochemie $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_{10}$	1.600 g

2.2.2 Bahan bagi larutan stok PII metal untuk 1 L air suling

Jadual 2: Bahan kimia untuk penyediaan larutan stok PII metal.

No	Kod bahan	Nama bahan	Jumlah berat
1	E0511	Ethylenediaminetetraacetate (EDTA) disodium dihydrate, Duchefa Biochemie $C_{10}H_{18}N_2Na_2O_{10}$	1.000 g
2	B0503	Asid boric, Duchefa Biochemie H_3BO_3	1.140 g
3	IR415-90	Iron (III) chloride (anhydrous), System Chemicals $FeCl_3$	49.00 mg
4	M0514	Manganese sulfate monohydrate, Duchefa Biochemie $MnSO_4 \cdot H_2O$	0.164 g
5	Z0526	Zinc sulphate - heptahydrate, Duchefa Biochemie $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.022 g
6	C6768	Cobalt (II) sulphate heptahydrate, Sigma $CoCl_2 \cdot 6H_2O$	4.800 mg

2.2.3 Bahan bagi larutan stok 50x PES untuk 1 L air suling

Jadual 3: Bahan kimia untuk penyediaan larutan stok 50x PES.

No	Kod bahan	Nama bahan	Jumlah berat
1	S0524	Sodium nitrate, Duchefa Biochemie NaNO_3	7.00 g
2	G6501	Glycerol phosphate disodium salt hydrate, Sigma $\text{C}_3\text{H}_7\text{Na}_2\text{O}_6\text{P}_x\text{H}_2\text{O}$	1.00 g
3	Jadual 1	(I) Larutan Fe	500 ml
4	Jadual 2	(II) Larutan PII metal	500 ml
5	C0726	Cyanocobalamin (Vitamin B_{12}), Duchefa Biochemie $\text{C}_{63}\text{H}_{88}\text{CoN}_{14}\text{O}_{14}\text{P}$	0.20 mg
6	T0614	Thiamine hydrochloride (Vitamin B_1), Duchefa Biochemie $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS.HCl}$	10.00 mg
7	B0603	D(+)-biotin (Vitamin B_7) Duchefa Biochemie $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	0.10 mg
8	T1503	Tris buffer (Trizma® base), Sigma $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	25.0 g

1. Kesemua larutan stok ini perlu dilaraskan kepada pH 7.8, kemudian air suling akan ditambah bagi mencapai sukatan akhir 1 L keseluruhannya.
2. Botol stok media dilabel (nama media dan tarikh) dan dibalut dengan kertas aluminium untuk mengelakkan daripada teroksida akibat terdedah kepada cahaya.
3. Setiap stok diletakkan di dalam peti sejuk bersuhu 4°C.

2.2.4 Penyediaan larutan 1x PES

Larutan PES adalah larutan baja yang akan digunakan ketika penyediaan media agar untuk kultur tisu rumpai laut. Untuk mendapatkan kepekatan 1x, pencairan perlu dibuat dengan nisbah 1:50 daripada larutan stok 50x PES. Bagi menyediakan 500 mL larutan 1x PES, 10 mL larutan stok 50x PES akan ditambah 490 mL air masin yang telah disterilkan melalui tapisan. Larutan 1x PES ini akan disimpan di dalam botol Schott dan dilabel tarikh disediakan dan saliniti larutan.

2.3 Jenis-jenis Media untuk Kultur Tisu

Terdapat pelbagai jenis media yang boleh digunakan dalam kultur tisu rumpai laut ini. Antara media komersial yang boleh digunakan adalah:

1. Plant agar P1001 (Duchefa Biochemie)
2. Phyto agar P1003 (Duchefa Biochemie)
3. Bacto agar 214010 (BD)

Media komersial ini boleh disediakan mengikut panduan yang dikeluarkan oleh syarikat pengeluar. Disamping itu, terdapat juga media yang dirumus khas untuk kegunaan kultur tisu rumpai laut iaitu menggunakan serbuk agarose dan larutan baja PES.

2.3.1 Penyediaan media menggunakan Agarose dan PES

Kiraan larutan agar mengikut sukatan:

Jadual 4: Bahan kimia untuk penyediaan larutan agar (1.5%) PES.

No	Kod Bahan	Nama Bahan	Larutan agar (1.5%) 1 L
1	A1203	Agarose SPI, Duchefa Biochemie	15.0 g
2	Jadual 3	Larutan 50x PES	20 mL
3	Para 2.1	Air masin steril	980 mL

1. Serbuk agarose yang telah ditimbang 15.0 g dilarutkan dengan 1000 mL larutan 1x PES di dalam botol Schott dan dilabelkan.
2. Proses larutan boleh dipercepatkan dengan menggunakan pengacau magnet plat panas (*magnetic hotplate stirrer*).
3. Larutan agarose disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 minit.
4. Alat aliran udara laminar (*laminar air flow*) dihidupkan dan lampu UV dibuka selama 30 minit. *Laminar air flow* adalah sebuah alat makmal yang digunakan untuk mengalirkan udara bersih secara terus-menerus.

5. Kawasan kerja di dalam *laminar air flow* disterilkan dengan menggunakan 70% (v/v) Ethanol dan penunu Bunsen dihidupkan.
6. Plastik berisi piring petri disteril dengan disembur 70% (v/v) Ethanol.
7. Anggaran 25 ml larutan agar dituang ke dalam piring petri dan dibiarkan sejuk serta mengeras sebelum dibalut menggunakan Parafilm.
8. Piring agar tersebut dilabelkan dan disimpan di dalam peti sejuk (4°C).

3. PERINGKAT 1 – KULTUR TISU AGAR

3.1 Persediaan Awal

1. Semua peralatan yang diperlukan semasa kerja kultur tisu seperti forsep, pisau bedah, bikar, botol Schott, piring petri kaca dan kertas tisu disteril menggunakan autoklaf terlebih dahulu pada suhu 121°C selama 15 minit.
2. Lampu UV *laminar air flow* dihidupkan selama 30 minit dan kawasan kerja disterilkan dengan 70% (v/v) Ethanol. Penunu Bunsen dihidupkan.
3. Terdapat tiga jenis larutan yang digunakan iaitu 70% Ethanol, air suling dan air masin. Air suling dan air masin perlu disterilkan menggunakan autoklaf terlebih dahulu.
4. Ketiga-tiga larutan ini diisi ke dalam botol Schott steril dalam sukatan sesuai.
5. Pastikan piring agar dalam keadaan suhu bilik sebelum digunakan.

3.2 Persediaan Sampel Rumpai Laut

1. Sampel rumpai laut dipilih dari tangki hatceri untuk kultur tisu. Ianya mestilah sihat, bebas penyakit *ice-ice*, dan mempunyai pucuk baru.
2. Sampel tersebut dibilas dengan air masin dan dibersihkan menggunakan berus lukisan lembut untuk membuang kotoran yang melekat pada badan induk rumpai.
3. Sampel rumpai yang bersih ditempatkan di dalam bikar berisi air masin steril dan dibawa ke *laminar air flow*.



Gambar 6: Sampel rumpai yang sihat, bebas penyakit *ice-ice*, berpucuk baru dan telah dibersihkan.

3.3 Proses Sterilisasi Tisu Rumpai Laut

Cabang atau batang induk rumpai yang sesuai digunakan untuk proses sterilisasi tisu rumpai adalah dari batang kedua sehingga ke pucuk baru tumbuh. Langkah-langkah kerja adalah seperti berikut:

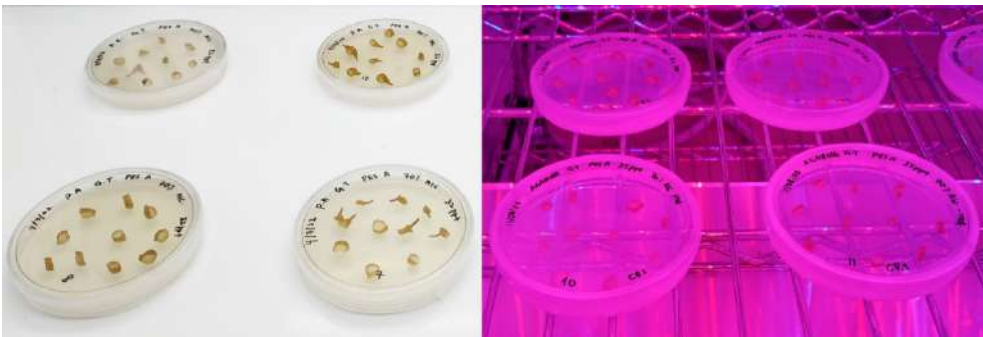
1. Eksplan rumpai laut dipotong dalam anggaran saiz 0.3 - 0.6 cm dengan menggunakan pisau bedah (*scalpel*).



Gambar 7: Eksplan dipotong dalam anggaran saiz 0.3 - 0.6 cm menggunakan pisau bedah (*scalpel*).

2. Eksplan dipindahkan ke piring agar dengan berhati-hati supaya agar tidak rosak.

3. Satu piring agar boleh dimuatkan dengan jumlah maksimum 10 eksplan.
4. Label piring agar dengan maklumat seperti berikut:
 - Tarikh eksplan dikultur.
 - Nama spesies
 - Peratus alkohol (ethanol) yang digunakan
 - Bilik kultur yang akan disimpan
 - Saliniti, jenis dan peratus agar
 - Bilangan eksplan
 - Nombor petri
5. Piring agar tersebut diletakkan di atas rak dalam bilik kultur pada suhu 23°C, kitaran lampu dipasang dan ditutup selama 12:12 jam di bawah sinaran 1000 – 2000 lux (lampu putih) atau 100 – 300 lux (lampu LED biru merah).



Gambar 8: Piring agar diletakkan di dalam bilik kultur pada suhu 23°C, kitaran lampu dipasang dan ditutup selama 12:12 jam di bawah sinaran 1000 – 2000 lux (lampu putih) atau 100 – 300 lux (lampu LED biru merah).

4. PERINGKAT 2 – KULTUR TERBENAM (*EMBEDDED*)

4.1 Penyediaan Media dan Peralatan

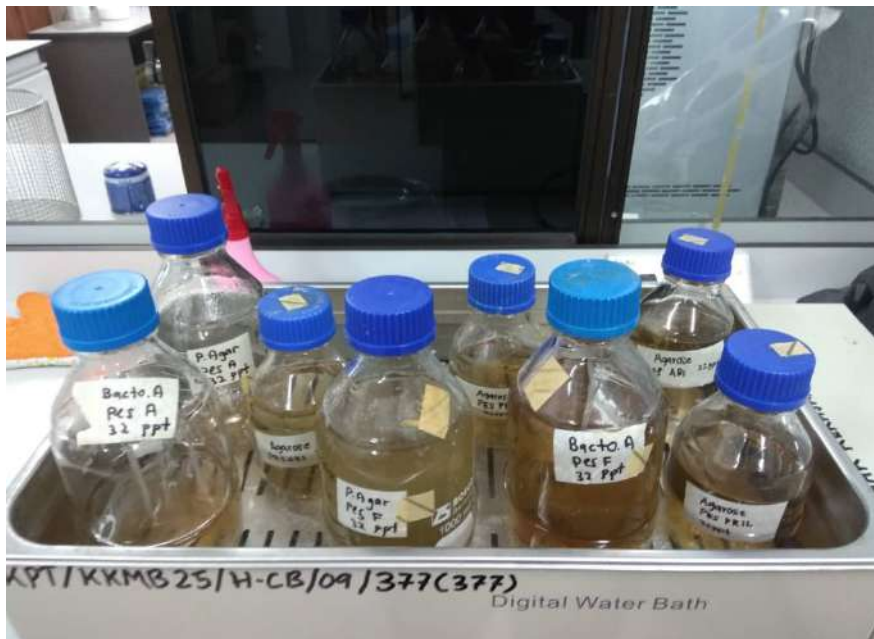
Bagi peringkat ini, larutan agar boleh disediakan kepada 0.4 - 0.6% kepekatan mengikut kesesuaian teknik masing-masing. Pengiraan larutan agar (0.4 - 0.6%) untuk kultur terbenam adalah seperti berikut:

Jadual 5: Bahan kimia untuk penyediaan larutan agar (0.4-0.6%) PES

No	Kod Bahan	Nama Bahan	Larutan agar 1L		
			0.4%	0.5%	0.6%
1	A1203	Agarose SPI, Duchefa Biochemie	4.0 g	5.0 g	6.0 g
2	Jadual 3	Larutan 50x PES	980 mL		
3	Para 2.1	Air masin steril	20 mL		

1. Larutan agar ini perlu dibuat pada hari yang sama proses kultur terbenam dijalankan.
2. Larutan 1x PES 1000 mL dimasukkan ke dalam botol Schott.
3. Serbuk agarose yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam botol Schott dan dilabelkan.
4. Serbuk agarose dilarutkan dengan menggunakan *magnetic hotplate stirrer*.
5. Larutan agarose disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada 121 °C selama 15 minit.

6. Lampu UV *laminar air flow* dihidupkan selama 30 menit dan kawasan kerja disterilkan dengan 70% (v/v) Ethanol. Penunu Bunsen dihidupkan.
7. *Water bath* dihidupkan dan ditetapkan suhu di antara 40 – 50°C.
8. Apabila larutan agar telah selesai disterilkan, botol berisi larutan agar diletakkan ke dalam *water bath* tersebut.



Gambar 9: Larutan agar diletakkan di dalam *water bath* pada suhu di antara 40 – 50°C



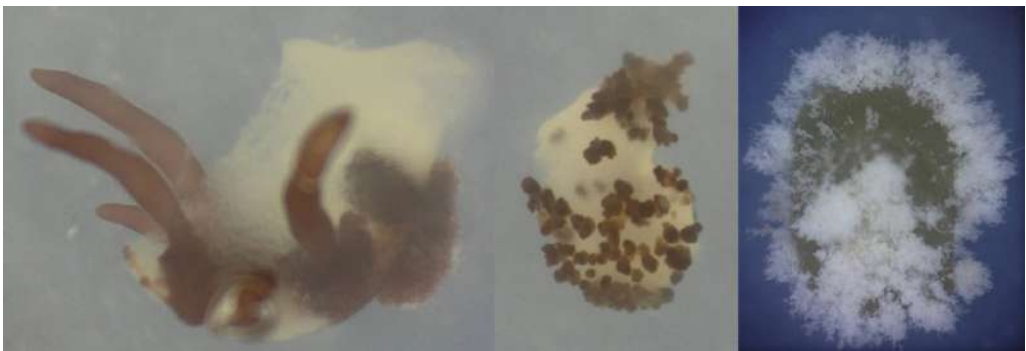
4.2 Tatacara Kerja

Sebelum memasuki peringkat kultur terbenam, semua eksplan berkalus yang hidup dan matang mestilah direkod terlebih dahulu. Langkah kerja adalah seperti berikut:

1. Semua peralatan yang diperlukan untuk peringkat ini disterilkan terlebih dahulu dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 minit.
2. Larutan agar dituang penuh ke dalam piring petri tetapi tidak mengenai penutup piring petri. Agar dibiarkan dalam keadaan separuh keras dan suam.
3. Eksplan yang dipilih dibenamkan ke dalam agar dengan menggunakan forcep pada kedudukan separuh tenggelam dan tidak mengenai bahagian dasar piring petri.
4. Proses kultur terbenam ini dibuat secara berhati-hati untuk mengelakkan daripada tercemar (*contamination*).
5. Satu piring petri boleh dimuatkan dengan jumlah maksimum 5 eksplan.
6. Piring petri dilabelkan seperti maklumat pada piring petri di peringkat kalus.
7. Piring agar tersebut disimpan di atas rak dalam bilik kultur pada suhu 23°C, kitaran lampu dipasang dan ditutup selama 12:12 jam dibawah sinaran 1000 – 2000 lux (lampu putih) atau 100 – 300 lux (lampu LED biru merah).

5. PERINGKAT 3 – KULTUR CECAIR

Fragmen atau eksplan yang telah matang perlu dipindahkan ke tempat ruang yang lebih besar. Ini kerana fragmen tersebut tidak lagi sesuai untuk berada di dalam agar. Terdapat 3 jenis pembentukan terhadap fragmen yang telah matang iaitu fragmen berpucuk (*organogenesis*), fragmen berembrio (*somatic embryo*) dan fragmen berkalus tebal. Ketiga - tiga pembentukan ini akan menghasilkan bibit rumpai baharu. Pembentukan ini boleh dilihat di bawah mikroskop. Fragmen ini direkodkan sebelum dipindahkan ke peringkat kultur cecair.



Gambar 10: Jenis fragmen yang telah matang hasil daripada kultur terbenam iaitu fragmen berpucuk (*organogenesis*), fragmen berembrio (*somatic embryo*) dan fragmen berkalus tebal.

5.1 Penyediaan Media dan Peralatan

1. Semua peralatan yang diperlukan semasa kerja pemindahan disterilkan terlebih dahulu dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 minit.
2. Larutan 1x PES untuk 500 ml disediakan dengan mencampurkan 10 ml larutan 50x PES dan 490 ml air masin steril ke dalam botol Schott dan digoncangkan.
3. Sebanyak 100 mL larutan 1x PES dituang ke dalam kelalang kon 250 mL steril.
4. Fragmen yang dipilih dipindahkan dengan menggunakan forcep ke dalam kelalang kon berisi 100 mL larutan 1x PES.
5. Kelalang kon dilabelkan dan ditutup dengan menggunakan kertas aluminium.
6. Kelalang kon diletakan di atas penggoncang orbit (*orbital shaker*) dengan kelajuan putaran 120 rpm dalam keadaan pada suhu 23°C. Kitaran lampu dipasang dan ditutup selama 12:12 jam dibawah sinaran 1000 – 2000 lux (lampu putih).
7. Larutan PES dalam kelalang kon ditukar selepas dua minggu atau jika larutan tersebut menjadi kotor atau tercemar.
8. Jika kelalang kon berisi larutan 1x PES ini tidak digunakan, boleh disimpan dalam peti sejuk bersuhu 4°C.

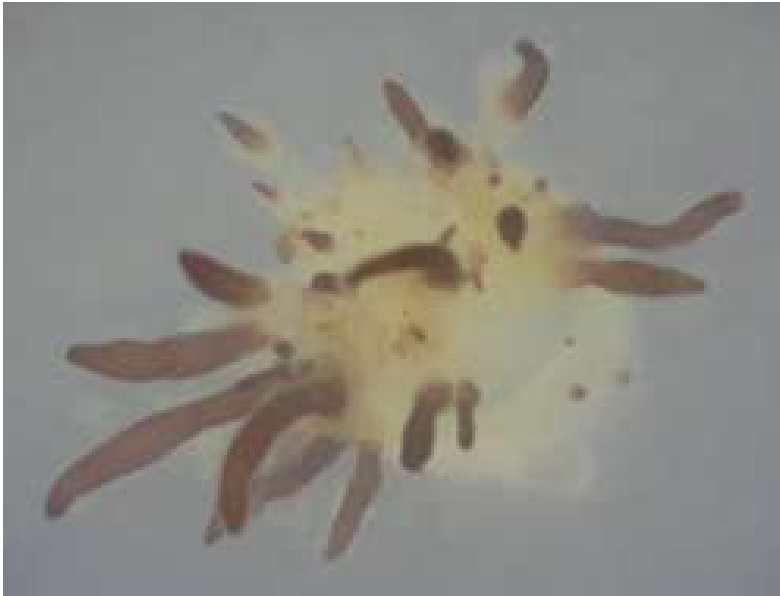


Gambar 11: Kelalang kon diletakkan di atas *orbital shaker* dengan kelajuan putaran 120 rpm dalam keadaan pada suhu 23°C. Kitaran lampu dipasang dan ditutup selama 12:12 jam dibawah sinaran 1000 – 2000 lux (lampu putih).



6. PERINGKAT 4 - KULTUR CECAIR BERUDARA (*AERATED*)

Apabila fragmen di peringkat kultur cecair telah terpisah daripada eksplan (perumah berwarna putih) atau fragmen menjadi saiz lebih besar (0.2 mm - 1.0 cm), ianya boleh dipindahkan ke kelalang kon 1 L dan diberikan pengudaraan. Fragmen ini direkodkan sebelum dipindahkan ke peringkat kultur cecair berudara.



Gambar 12: Fragmen akan terpisah daripada eksplan (perumah berwarna putih) dan setiap fragmen akan menjadi bibit rumpai baharu.

1.1 Penyediaan Media dan Peralatan

1. Semua peralatan yang diperlukan diperingkat ini disterilkan terlebih dahulu dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 minut.
2. Larutan 1x PES untuk 1000 ml disediakan dengan mencampurkan 20 ml larutan 50x PES dan 980 ml air masin ke dalam botol Schott dan digoncangkan.
3. Larutan 1x PES ini dilabel dan disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 minut.
4. Fragmen yang dipilih dipindahkan dengan menggunakan forcep ke dalam kelalang kon berisi 100 mL larutan 1x PES.
5. Kelalang kon dilabel dan ditutup dengan menggunakan kertas aluminium.
8. Kelalang kon diletakkan di atas rak dalam bilik kultur pada suhu 23°C, kitaran lampu dipasang dan ditutup selama 12:12 jam dibawah sinaran 1000 – 2000 lux (lampu putih).
6. Sistem pengudaraan (*aeration*) disediakan dan disalurkan ke dalam kelalang kon.
7. Larutan PES kelalang kon ditukar selepas dua minggu atau jika larutan tersebut menjadi kotor atau tercemar.



Gambar 13: Kelalang kon 1L diletakkan di atas rak dalam bilik kultur pada suhu 23°C, kitaran lampu dipasang dan ditutup selama 12:12 jam dibawah sinaran 1000 – 2000 lux (lampu putih).

7. PERINGKAT 5 - NURSERY (PELEPASAN BIBIT DI LUAR MAKMAL)

Pada peringkat ini, fragmen akan berpecah-pecah dan menjadi kuantiti yang banyak. Setiap pecahan fragmen ini akan membesar dan membentuk struktur rumpai yang stabil. Hal ini menyebabkan, ruang di dalam kelalang kon menjadi terlalu padat dan perlu dipindahkan ke dalam tangki. Pada peringkat ini, fragmen dipanggil sebagai bibit. Saiz bibit yang sesuai untuk dipindahkan ke peringkat nursery mempunyai ukuran 4 - 5 cm panjang dan berat dalam 0.1 - 0.3 g.



Gambar 14: Fragmen yang terpisah membesar menjadi bibit rumputai menyebabkan ruang di dalam kelalang kon menjadi terlalu padat.

7.1 Tatacara Kerja

1. Bibit dibilas dengan air masin dan dibersihkan menggunakan berus lukisan lembut untuk membuang kotoran yang melekat pada badan bibit rumputai.
2. Bibit yang terpilih direkodkan berat dan panjang.
3. Bakul berbentuk bulat digunakan untuk pelepasan bibit. Bakul bulat mudah bergerak-gerak di dalam tangki untuk meningkatkan pengudaraan bagi bibit.
4. Jaring hapa dilapik dan digam di dalam bakul bulat untuk mengelakkan bibit terkeluar daripada bakul.
5. Bibit dipindahkan ke dalam bakul berbentuk bulat yang telah dilapik jaring hapa.

6. Bakul dilabel dan ditempatkan ke dalam tangki gentian kaca yang mengandungi air laut bersaliniti 30 ppt ke atas dengan sumber cahaya semulajadi.
7. Sistem pengudaraan disalurkan ke dalam tangki selama 24 jam.
8. Setiap bibit direkodkan berat dan panjang secara berkala.
9. Bibit yang telah mencapai saiz panjang 10 – 12 cm dan berat 50 – 100 g sesuai untuk dipindahkan ke lapangan.



Gambar 15: Jaring hapa dilapik dan digam di dalam bakul bulat dan ditempatkan ke dalam tangki air laut bersaliniti 30 ppt ke atas dengan sumber cahaya semulajadi bersama sistem pengudaraan 24 jam.



Gambar 16: Saiz bibit rumpai pada hari ke-0, ke-11 dan ke-55 yang diasuh di dalam tangki.



PENUTUP

Kultur tisu rumpai laut ini berpotensi untuk diaplikasikan bagi menjamin pengeluaran benih rumpai laut yang berkualiti dan mencukupi. Walaupun kaedah ini memerlukan tempoh masa yang panjang, kualiti benih rumpai yang dihasilkan boleh memberi impak yang besar kepada industri rumpai laut negara. Selain itu, kaedah kultur tisu ini dapat mengekalkan kualiti genetik berbanding kaedah pembenihan tradisional *micropropagation* yang menggunakan sumber baka yang sama berulang kali. Penggunaan berulang sumber yang sama menyebabkan pengurangan kualiti rumpai daripada segi rintangan penyakit, kadar pertumbuhan dan kandungan karagenan.

LIMITASI KAEDAH

Kaedah pembenihan rumpai laut secara kultur tisu ini mempunyai beberapa limitasi yang perlu untuk diatasi.

1. Kaedah ini memerlukan modal permulaan yang tinggi untuk tujuan penyediaan makmal dan peralatan yang diperlukan.
2. Memerlukan tenaga kerja mahir untuk melakukan kerja-kerja makmal dengan teliti dan berhati-hati untuk mengelak berlakunya pencemaran (*contamination*).
3. Proses yang mengambil daripada peringkat eksplan ke benih mengambil masa yang lama lebih kurang 2 tahun dan lebih.

RUJUKAN

- Bhatia, S. & Bera, T. 2015. Somatic embryogenesis and organogenesis. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, 6:209-230.
- Department of Fisheries Malaysia (DOF). 2023. *Annual Fisheries Statistics 2023*, 1.
- Liu, J. & Van Iersel, M. W. 2021. Photosynthetic physiology of blue, green, and red light: Light intensity effects and underlying mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 12:619987.
- Norhanizan, S. 2014. Establishment of axenic culture of *Kappaphycus alvarezii* and optimum culture system for germlings production. *Malaysian Fisheries Journal*, 13:33-38.
- Phang, S. M., Yeong, H. Y., Lim, P. E., Nor, A. R. M. & Gan, K. T. 2010. Commercial varieties of *Kappaphycus* and *Eucheuma* in Malaysia. *Malaysian Journal of Science*, 29(3):214-224.
- Provasoli, L., 1968. Media and prospects for the cultivation of marine algae. *Cultures and collections of algae*, 63-75.
- Yong, W. T. L., Ting, S. H., Yong, Y. S., Thien, V. Y., Wong, S. H., Chin, W. L., Rodrigues, K. F. & Anton, A. 2013. Optimization of culture conditions for the direct regeneration of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae). *Journal of Applied Phycology*, 26:1597-1606.

GLOSSARI

trend aliran arah

kultur tisu sel atau organ tumbuhan yang ditanam pada medium nutrien

micropropagation penghasilan beribu-ribu anak tumbuhan yang sama

sp. spesies

carrageenan karagenan

polisakarida karbohidrat kompleks yang dibentuk apabila banyak monosakarida

eksplan tisu yang kecil daripada haiwan atau tumbuhan

aklimitasi penyesuaian iklim

pensterilan proses pembasmian mikroorganisma melalui kaedah fizikal

ppt part per thousand atau satu bahagian per seribu

autoklaf alat pemanas tertutup yang digunakan untuk mensterilisasi suatu benda menggunakan wap bersuhu dan bertekanan tinggi

enriched dikayakan dengan nutrien

saliniti kemasinan

botol Schott jenama botol yang digunakan di dalam makmal

UV ultraviolet atau ultraungu

hotplate magnetic stirrer peranti makmal yang menggunakan medan magnet untuk mengacau dan mempercepatkan proses larutan serbuk

laminar air flow stesen kerja tertutup yang digunakan untuk mewujudkan persekitaran kerja yang bebas pencemaran

v/v isipadu per isipadu

forcep penyepit makmal

kalus tisu pelindung keras yang terbentuk pada bahagian tumbuhan berkayu yang luka

lux unit pencahayaan atau fluks bercahaya per unit luas

water bath peralatan makmal untuk menetapkan suhu air

fragmen bahagian pucuk terpisah daripada kumpulan tisu utama

bibit anak pohon yang masih kecil dan masih dapat dipindah-pindahkan

hapa jaring bersaiz 8mm yang dibuat daripada bahan nilon



KEMENTERIAN PERTANIAN
DAN KETERJAMINAN MAKANAN
JABATAN PERIKANAN MALAYSIA



ISBN 978-967-2946-53-3



9 789672 946533

PUSAT PENYELIDIKAN LANGKAWI
KOMPLEKS PERIKANAN BUKIT MALUT
07000 LANGKAWI
KEDAH