

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur *In Vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, pada bulan Juli 2018 sampai dengan November 2018.

B. Bahan dan Alat penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini berupa biji kepel, medium dasar MS, 2,4-D, BAP, alkohol 96%, H₂O₂, fungisida Dithane, bakterisida Agrept, larutan detergen, agar, gula pasir, KOH, HCl, plastik wrap dan aquadest steril.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas: Autoklaf, *Laminar Air Flow*, kompor gas, *glassware* (gelas ukur, erlenmeyer, botol kultur, gelas *beaker*), botol jam, pinset, timbangan analitik, rak kultur, pengaduk, *aluminium foil*, kertas payung, gunting, lampu bunsen, pH stik, *hand sprayer*, pipet, mistar, dan alat tulis.

C. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan metode percobaan laboratorium faktor tunggal dengan 6 perlakuan. Masing- masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali sehingga terdapat 18 unit. Setiap unit terdiri dari 3 sampel sehingga total keseluruhan terdapat 54 eksplan yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan yang dicobakan yaitu sterilisasi eksplan dengan perendaman biji kepel dalam H₂O₂ pada berbagai konsentrasi dan lama perendaman:

1. H₂O₂ 5% selama 5 menit
2. H₂O₂ 5% selama 15 menit
3. H₂O₂ 10% selama 5 menit
4. H₂O₂ 10% selama 15 menit
5. H₂O₂ 15% selama 5 menit
6. H₂O₂ 15% selama 15 menit

D. Tata Laksana Penelitian

1. Sterilisasi Alat

a. Sterilisasi Basah

Sterilisasi basah dilakukan dengan cara memasukkan alat yang telah dibungkus kertas pada autoklaf selama 2 jam dengan tekanan 1 atm pada suhu 121°C. Alat-alat yang disterilkan antara lain botol kultur sebanyak 54 buah, erlenmeyer, pinset, dan *aluminium foil*.

b. Sterilisasi Bakar

Sterilisasi bakar dilakukan di dalam LAF pada saat alat akan digunakan untuk inokulasi. Sterilisasi bakar dilakukan dengan cara merendam alat yang telah disterilkan dalam alkohol 70% dan setiap kali akan menggunakan alat tersebut, alat dibakar terlebih dahulu pada spiritus hingga alkohol kering.

c. Sterilisasi UV

Sebelum digunakan untuk kegiatan inokulasi yang mutlak steril, maka dinding kaca dalam *Laminar Air Flow* disemprotkan terlebih dahulu dengan alkohol 70% dan dikeringkan dengan tisu bersih. Sterilisasi UV dilakukan

dengan cara enyalakan lampu UV selama 1 jam, setelah satu jam lampu UV dimatikan dan menyalakan lampu TL serta blower.

2. Pembuatan Larutan Stok

Larutan stok terlebih dahulu dibuat untuk mempermudah dalam pembuatan medium MS. Pembuatan larutan stok bertujuan meniadakan penimbangan kembali setiap membuat medium dan menghindari kesalahan penimbangan jika bahan yang ditimbang sedikit. Pembuatan larutan stok medium MS dilakukan dengan cara sebagai berikut:

a. Larutan Stok Makro

Menimbang persenyawaan NH_4NO_3 16,5 g, KNO_3 19 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 3,7 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 4,4 g, dan KH_2PO_4 1,7 g. Bahan yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam gelas piala bersih yang telah berisi aquadest kira-kira 100 ml, kemudian diaduk rata. Menambahkan aquadest hingga volume larutan tepat 500 ml. Memberi label stok makro 50 ml/l. Untuk membuat 1 liter media dibutuhkan 50 ml stok makro.

b. Larutan Stok Mikro

Menimbang persenyawaan $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 0,223g, H_3BO_3 0,062 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,086 g, KI 0,0083 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,0025g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,00025g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,0025g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,00025g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,278g, $\text{Na}_2 \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,373g. Bahan yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam gelas piala bersih yang telah berisi aquadest kira-kira 50 ml, kemudian diaduk rata. Menambahkan aquadest hingga volume larutan tepat

100 ml. Memberi label stok makro 10 ml/l. Untuk membuat 1 liter media dibutuhkan 10 ml stok mikro.

c. Larutan Stok Vitamin

Menimbang bahan-bahan kimia vitamin Nicotinic-acid 0,005 g, Pyridoxine-HCl 0,005 g, Thiamine-HCl 0,001 g, Glycine 0,02 g, kemudian melarutkan bahan-bahan tersebut kedalam gelas beaker yang berisi 50 ml aquadest steril dan diaduk dengan *Magnetic stirrer* sampai homogeny. Menambahkan aquadest pada larutan stok hingga volumenya menjadi 100 ml, untuk membuat 1 liter medium diperlukan 10 ml larutan stok vitamin. Memberi label pada botol stok vitamin 10 ml/l.

d. Larutan Mio-Inositol

Menimbang persenyawaan Mio-Inositol 1 g. Bahan yang telah ditimbang dimasukan kedalam erlenmeyer. Tambahkan aquadest hingga volume sampai tepat 100 ml, kemudian memberi label pada botol stok Mio-Inositol 10 ml/l, untuk membuat 1 liter medium diperlukan 10 ml stok Mio-Inositol.

e. Larutan Stok 2,4-D

Menimbang persenyawaan 2,4-D 0,01 g. Bahan yang telah ditimbang dimasukan kedalam erlenmeyer. Tambahkan NaOH untuk melarutkan 2,4-D dan tambahkan aquadest hingga volume sampai tepat 100 ml, kemudian memberi label 100 ppm = 10 ml/l, untuk membuat 1 liter medium dibutuhkan 1 mg/l 2,4-D diperlukan 10 ml stok 2,4-D.

f. Larutan Stok BAP

Menimbang persenyawaan BAP 0,01 g. Bahan yang telah ditimbang dimasukkan kedalam gelas piala bersih. Kemudian menambahkan beberapa tetes HCl 1 N. Lalu menambahkan aquadest kira-kira 25 ml dan diaduk rata. Menambahkan aquadest hingga volume larutan tepat 100 ml. Memberi label stok BAP 100 ppm= 10 ml/l. Untuk membuat 1 liter media dibutuhkan 1 mg/l BAP diperlukan 10 ml stok BAP.

3. Proses Pembuatan Medium MS

Medium MS yang diperlukan untuk 60 botol dan tiap botol berisi 20 ml medium adalah $60 \times 20 \text{ ml} = 1200 \text{ ml}$ untuk 6 perlakuan. Medium MS sebanyak 1200 ml dibuat dengan dibagi menjadi 3 erlenmeyer dimana masing masing erlenmeyer memuat sebanyak 400 ml media MS. Media MS dibuat dengan mencampurkan larutan stok antara lain: larutan stok makro 20 ml, larutan stok mikro 4 ml, stok vitamin 4 ml, mio-inositol 4 ml, ppm 0,2 ml dan sukrosa 12 g. Bahan – bahan tersebut dimasukkan kedalam tabung erlenmeyer yang telah diisi akuades 400 ml, kemudian di aduk sampai homogen. Setelah itu tambahkan BAP 2 ml dan 2,4-D 8 ml. Kemudian media dimasak menggunakan kompor. Selanjutnya dilakukan pengukuran pH larutan medium, jika pH medium kurang dari 6 maka ditambahkan NaOH dan jika lebih dari 6 maka ditambahkan HCl. Bahan yang terakhir dimasukan adalah pematat agar sebanyak 2,6 g, kemudian diaduk menggunakan pengaduk sampai homogen. Larutan tersebut dipanaskan hingga mendidih kemudian dituangkan ke dalam botol kultur masing-masing sebanyak 20 ml dan ditutup dengan plastik dan diikat karet. Selanjutnya

dilakukan sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121⁰C dengan tekanan 1 atm selama 120 menit. Setelah selesai medium disimpan sementara di ruang inkubasi.

4. Sterilisasi eksplan

a. Persiapan eksplan

Persiapan eksplan dilakukan dengan cara memilih buah yang telah matang dan memisahkan biji dari daging buah. Kemudian biji dicuci dan dibersihkan dari pulpnya hingga keset. Setelah itu, biji kepel diampas sampai terlihat bagian berwarna putih. Biji kepel diampas pada bagian atas biji kepel yang dekat dengan embrio dan salah satu sisi bagian biji kepel.

b. Tata laksana sterilisasi eksplan

Eksplan biji kepel yang telah bersih direndam dengan larutan deterjen 2 g/l selama 10 menit. Setelah itu, biji kepel dibilas dengan air mengalir. Sterilisasi selanjutnya, biji kepel direndam dalam larutan fungisida dan bakterisida 2g/l selama 3 jam dan dishaker, setelah itu dibilas dengan aquadest steril sebanyak 3 kali didalam LAF. Kemudian biji kepel direndam dalam alkohol 96% selama 1 menit. Setelah itu biji kepel disterilisasi dengan cara direndam dalam H₂O₂ sesuai dengan perlakuan yang digunakan yaitu H₂O₂ 5% selama 5 menit, H₂O₂ 5% selama 15 menit, H₂O₂ 10% selama 5 menit, H₂O₂ 10% selama 15 menit, H₂O₂ 15% selama 5 menit, dan H₂O₂ 15% selama 15 menit, kemudian dibilas dengan menggunakan aquadest steril. Biji kepel yang telah steril diinokulasikan pada medium MS. Tahap sterilisasi dan penanaman eksplan dilakukan didalam LAF.

5. Inokulasi eksplan

Penanaman dilakukan dengan cara eksplan yang telah steril di dalam botol jam sesuai perlakuan yang diujikan. Eksplan yang telah steril kemudian ambil menggunakan pinset yang telah steril, lalu bagian eksplan yang tidak di amplas dibakar terlebih dahulu di atas api lampu bunsen. Kemudian eksplan ditanam dalam medium MS+ BAP 0,5 ppm + 2,4 D 2 ppm dengan penanaman 1 eksplan pada setiap botol. Eksplan yang telah ditanam, kemudian ditutup menggunakan *aluminium foil*, kemudian diikat karet dan bagian mulutnya dibungkus dengan plastik wrap.

6. Inkubasi

Proses inkubasi dimulai dengan mensterilkan rak-rak inkubasi dengan menyemprotkan alkohol 70% dan dikeringkan dengan kain bersih. Suhu ruang inkubasi kultur 23°C dan kelembaban sekitar 70% serta pencahayaan menggunakan lampu TL (neon) 40 watt selama 24 jam setiap harinya. Botol-botol diletakkan secara acak kemudian diamati pertumbuhannya sesuai dengan parameter pengamatan.

E. Parameter yang Diamati

1. Persentase Hidup (%)

Eksplan yang hidup yaitu eksplan yang tidak terkontaminasi dan tidak mengalami *browning* atau pencoklatan kurang dari 50% dihitung setiap 3 hari sekali selama 8 minggu dan dinyatakan dalam persen. Perhitungan berdasarkan rumus:

$$\% \text{Hidup} = \frac{\sum \text{Eksplan hidup}}{\sum \text{Total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

2. Persentase *Browning* (%)

Eksplan yang mengalami pencoklatan (*Browning*) lebih dari 50%, dihitung setiap 3 hari sekali selama 8 minggu dan dinyatakan dalam persen.

Perhitungan dilakukan berdasarkan rumus:

$$\% \text{ Browning} = \frac{\sum \text{Eksplan coklat}}{\sum \text{Total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

3. Persentase Kontaminasi (%)

Eksplan yang terkontaminasi dihitung setiap 3 hari sekali selama 8 minggu. Eksplan terkontaminasi apabila terdapat jamur dan bakteri di dalam medium kultur dan dinyatakan dalam persen. Perhitungan dilakukan berdasarkan rumus:

$$\% \text{ Kontaminasi} = \frac{\sum \text{Eksplan terkontaminasi}}{\sum \text{Total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

4. Jenis Kontaminasi

Pangamatan parameter jenis kontaminasi dilakukan dengan cara mengamati kontaminasi pada eksplan secara visual. Kontaminan dapat berupa jamur ataupun bakteri. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai terjadinya kontaminasi.

5. Saat Kontaminasi

Parameter saat kontaminasi digunakan untuk menghitung kecepatan munculnya kontaminasi pada eksplan. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai terjadinya kontaminasi.

6. Saat *Browning*

Parameter saat *browning* digunakan untuk menghitung kecepatan munculnya *browning* pada eksplan. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai terjadinya *browning*.

F. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan analisis deskriptif. Data disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.