

I. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Juni – Oktober 2018 di Laboratorium Kultur *In vitro*, Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Jl. Brawijaya, Taman Tirta, Kasihan, Bantul, D. I. Yogyakarta.

B. Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan yaitu: endosperm kepel dan embrio kepel, NaOCl, medium MS, antiseptik, fungisida, bakterisida, deterjen, sukrosa, agar, spirtus, alkoho 70%, aquades steril, *aluminium foil*, HCl. Alat yang digunakan yaitu: timbangan analitik, botol kultur, autoklaf, LAF, pinset, skalpel, pisau, bunsen, botol jam, sinar UV, cawan petri, pH stik, spatula, erlenmeyer, kompor, *syring* dan lampu TL, *shaker* dan *magnetic stirrer*.

C. Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan menggunakan metode eksperimen faktor tunggal yang disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan perendaman bahan eksplan menggunakan larutan NaOCl yang terdiri dari 8 aras :

EN 5% - 5' = Eksplan Endosperm → NaOCl 5% selama 5 menit

EN 5% - 10' = Eksplan Endosperm → NaOCl 5% selama 10 menit

EN 10% - 5' = Eksplan Endosperm → NaOCl 10% selama 5 menit

EN 10% - 10' = Eksplan Endosperm → NaOCl 10% selama 10 menit

EM 5% - 5' = Eksplan Embrio → NaOCl 5% selama 5 menit

EM 5% - 10' = Eksplan Embrio → NaOCl 5% selama 10 menit

EM 10% - 5' = Eksplan Embrio → NaOCl 10% selama 5 menit

EM 10% - 10' = Eksplan Embrio → NaOCl 10% selama 10 menit

Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali, sehingga didapat 24 unit percobaan.

Setiap unit terdiri dari 3 sampel, sehingga terdapat 72 sampel percobaan. *Lay out* percobaan terlampir (lampiran 1).

D. Cara Penelitian

1. Persiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan dipersiapkan sebelum penelitian dimulai. Persiapan ini dilakukan dengan menyediakan peralatan dan bahan-bahan yang akan dibutuhkan.

2. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat yang dilakukan dengan metode sterilisasi basah, sterilisasi bakar dan ultra violet. Sterilisasi basah diawali dengan pencucian peralatan seperti: *beaker glass*, petridish, skalpel dan pinset menggunakan air mengalir dan deterjen. Botol kultur bekas pakai direbus dahulu hingga mendidih, kemudian botol dicuci dengan deterjen dan direndam menggunakan larutan NaOCl selama 24 jam. Setelah itu semua peralatan kemudian ditiriskan hingga kering. Peralatan kemudian ditutup menggunakan kertas payung, kemudian direkatkan dengan karet. Peralatan yang sudah ditutup kemudian disterilisasi ke dalam autoklaf pada suhu 121°C bertekanan 1 atm selama 60 menit. Setelah selesai diautoklaf, peralatan didinginkan

terlebih dahulu, kemudian disimpan di ruang inkubasi. Peralatan yang disterilkan antara lain: botol kultur, pinset, skalpel, *aluminium foil*, erlenmeyer, gelas ukur, spatula, cawan petri dan botol jam.

Sterilisasi bakar dilakukan dengan menggunakan lampu bunsen di dalam *laminar air flow cabinet* (LAF). Sterilisasi bakar dilakukan dengan cara mencelupkan pinset dan skalpel ke dalam alkohol 70% kemudian dibakar diatas lampu bunsen. Proses pembakaran tersebut diulang sebanyak tiga kali. Peralatan yang disterilisasi bakar yaitu : pinset, skalpel dan *aluminium foil*.

Sterilisasi *laminar air flow cabinet* (LAF) dilakukan dengan cara penyemprotan alkohol 70% pada bagian bawah dan dinding samping LAF, kemudian diusap menggunakan tisu hingga kering. Lampu ultra violet (UV) dihidupkan selama satu jam sebelum LAF digunakan untuk sterilisasi LAF. Peralatan yang ikut disterilkan dengan UV yaitu pisau, telenan dan sarung tangan. Lampu TL dan *blower* kemudian dinyalakan setelah UV selesai. Peralatan dan bahan yang akan dimasukkan ke dalam LAF diseprot menggunakan alkohol 70% terlebih dahulu.

3. Pembuatan Larutan Stok

Pembuatan larutan stok bertujuan untuk mendapatkan stok nutrient yang banyak dan pemudahan saat penimbangan. Pembuatan larutan stok nutrient diburuhkan untuk pembuatan medium MS. Adapun larutan stok yang dibuat yaitu: stok makro, stok mikro, stok vitamin dan stok mio-inositol. Tabel kebutuhan bahan larutan terlampir (lampiran 2).

a. Stok Makro

Pembuatan larutan stok makro dilakukan dengan menimbang semua komponen unsur makro yang dibutuhkan dengan jumlah yang telah ditentukan. Selanjutnya jumlah tersebut dikalikan 10 x untuk membuat larutan stok. Komponen unsur makro dalam larutan stok antara lain: Ammonium nitrat (NH_4NO_3) 16,5 gram, Kalium nitrat (KNO_3) 19 gram, Kalsium klorida dihidra ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 4,4 gram, Magnesium sulfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 3,7 gram dan Kalium hidrogen fosfat (KH_2PO_4) 1,7 gram. Semua bahan selanjutnya dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian dilarutkan menggunakan aquades steril sebanyak 500 ml diaduk hingga homogen dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan stok yang telah homogen selanjutnya dimasukkan ke dalam 5 botol kultur masing-masing 100 ml dan ditutup menggunakan penutup karet dan *aluminium foil*. Botol stok selanjutnya disimpan di dalam lemari pendingin.

b. Stok Mikro

Pembuatan larutan stok mikro dilakukan dengan menimbang semua komponen mikro nutrien yang dibutuhkan dengan jumlah yang telah ditentukan. Semua bahan tersebut kemudian jumlahnya dikalikan 10 x untuk membuat stok. komponen mikro nutrient antara lain : Kalium Iodida (KI) 0,0083 gram, Asam borat (H_3BO_3) 0,062 gram, Mangan II sulfat tetrahidrat ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 0,23 gram, Zink sulfat heptahidrat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,086 gram, Natrium sulfat tetrahidrat ($\text{NaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

0,00025 gram, Cuppri II sulfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0,0025 gram, Cobalt II clorid ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0,00094 gram, Disodium diaminat tetraasetat ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,373 gram dan Ferri II sulfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,278 gram. Selanjutnya semua bahan dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian dilarutkan menggunakan aquades steril sebanyak 100 ml hingga homogen. Larutan stok yang telah homogen selanjutnya dimasukkan ke dalam botol kultur sebanyak 100 ml dan ditutup menggunakan penutup karet dan *aluminium foil* hingga menutupi seluruh permukaan botol. Botol stok selanjutnya disimpan di dalam lemari pendingin.

c. Stok Vitamin

Pembuatan larutan stok vitamin dilakukan dengan menimbang semua komponen vitamin yang dibutuhkan dengan jumlah yang telah ditentukan. Selanjutnya jumlah tersebut dikalikan 10 x untuk membuat stok. komponen vitamin antara lain : Thiamin HCl 1 gram, Asam nikotinat 0,005 gram, Piridoxin HCl 0,005 gram dan Glisin 0,02 gram. Selanjutnya semua bahan dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian dilarutkan menggunakan aquades steril sebanyak 100 ml hingga homogen dengan cara digojok. Larutan stok selanjutnya dimasukkan ke dalam botol kultur dan ditutup menggunakan penutup karet dan *aluminium foil*. Selanjutnya botol stok disimpan di dalam lemari pendingin.

d. Stok Mio Inositol

Pembuatan larutan stok mio inositol dilakukan dengan menimbang bahan yang dengan jumlah yang telah ditentukan. Selanjutnya jumlah tersebut dikalikan 10 x untuk membuat stok. Bahan mio inositol 1 gram, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian dilarutkan menggunakan aquades steril sebanyak 100 ml hingga homogen dengan cara digojok. Selanjutnya larutan stok dimasukkan ke dalam botol kultur dan ditutup menggunakan penutup karet dan *aluminium foil*. Botol stok kemudian disimpan di dalam lemari pendingin.

e. Stok BAP

Pembuatan larutan stok BAP dilakukan dengan menimbang bahan BAP 1 mg/l. Selanjutnya jumlah tersebut dikalikan 10 x untuk membuat larutan stok dengan jumlah 0,01 gram. Bahan selanjutnya dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, kemudian dilarutkan menggunakan NaOH secukupnya hingga dengan cara digojok, kemudian ditambahkan aquades setril hingga volume 100 ml. Larutan stok BAP dimasukkan ke dalam botol kultur dan ditutup menggunakan penutup karet dan *aluminium foil*. Botol stok kemudian disimpan di dalam lemari pendingin.

f. Stok 2,4 D

Pembuatan larutan stok 2,4 D dilakukan dengan menimbang bahan 1 mg/l. Bahan selanjutnya dikalikan 10 x untuk membuat larutan stok sejumlah 0,01 gram. Bahan selanjutnya dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, kemudian dilarutkan menggunakan NaOH sebanyak 50 ml hingga

homogen menggunakan *magnetic stirrer* dan ditambahkan aquades setril hingga volume 100 ml. Larutan stok kemudian dimasukkan ke dalam botol kultur dan ditutup menggunakan penutup karet dan *aluminium foil*. Botol stok kemudian disimpan di dalam lemari pendingin.

4. Pembuatan Medium *Murashige and Skoog* (MS)

Medium MS dibuat sebanyak 1600 ml yang dibagi menjadi 4 kali, setiap erlenmeyer berisi 400 ml. Bahan – bahan yang digunakan untuk pembuatan medium MS yaitu: stok mikro + Fe, stok makro, stok vitamin, stok mio inositol, sukrosa, agar dan ppm. ZPT seperti BAP dan 2,4-D ditambahkan masing-masing 0,5 ppm/l dan 2 ppm/l. Jumlah kebutuhan stok tersadi pada tabel 1.

Tabel 1. Jumlah larutan stok dan bahan yang digunakan untuk 400 ml medium MS.

Bahan	Kebutuhan	
	1.000 ml	400 ml
Stok makro	50,0 ml/l	20,0 ml
Stok mikro	10,0 ml/l	4 ,0ml
Stok vitamin	10,0 ml/l	4,0 ml
Stok mio-inositol	10,0 ml/l	4,0 ml
Stok BAP 0,5 ppm	5,0 ml/l	2,0 ml
Stok 2,4-D 2 ppm	20,0 ml/l	8,0 ml
Sukrosa	30,0 g	12,0 g
Agar	7,0 g	2,8 g
Ppm	0,5 ml	0,2 ml

Larutan stok diambil menggunakan syring yang telah disterilkan menggunakan alkoho 70% sesuai takaran. Selanjutnya stok tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan aquades steril sebanyak 300 ml. Medium kemudian diukur pH menggunakan pH stik

dengan pH 5,8 - 6. Apabila pH larutan terlalu asam ditambahkan KOH 1 N, dan apabila larutan terlalu basa ditambahkan HCl 1 N hingga pH larutan menjadi 6. Medium selanjutnya ditambah agar dan dipanaskan sambil diaduk hingga homogen dan mendidih di atas kompor. Setelah itu, aquades ditambahkan ke dalam larutan hingga mencapai volume 400 ml. Selanjutnya larutan medium dibagi ke botol kultur masing-masing 20 ml. Medium dalam botol kultur kemudian ditutup menggunakan plastik dan kencangkan dengan karet. Botol kultur yang telah tertutup kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf untuk disterilisasi selama 120 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm.

5. Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan diawali dengan pemilihan buah kepel yang telah matang. Buah tersebut kemudian dibelah menggunakan pisau untuk mengambil biji dari dalam buah. Biji kepel kemudian dibersihkan dari daging buahnya. Setelah itu, biji dicuci menggunakan air mengalir hingga kesat. Biji selanjutnya direndam dalam larutan deterjen 2 g/l selama 10 menit. Biji kemudian dibilas menggunakan air mengalir hingga bersih. Biji selanjutnya direndam dalam larutan fungisida (Dithane) dan bakterisida (Agrept) masing-masing 2 g/l selama 60 menit sambil *dishaker*, kemudian biji dibilas menggunakan aquades steril tiga kali. Biji selanjutnya direndam dalam alkohol 70% selama 1 menit, selanjutnya biji ditiriskan pada kertas saring steril di dalam LAF. Biji selanjutnya dibelah menggunakan pisau steril untuk memisahkan endosperm dan embrio di dalam LAF. Endosperm dan embrio

selanjutnya disterilisasi dengan NaOCl sesuai dengan perlakuan di dalam LAF dan dibilas menggunakan aquades tiga kali. Eksplan kemudian diinokulasi ke dalam medium MS 2,4-D 2 ppm dan BAP 0,5 ppm. Bagan sterilisasi eksplan terlampir (Lampiran 3).

6. Inokulasi

Eksplan yang telah disterilkan kemudian diletakkan pada petridish yang berisi larutan antiseptik di dalam LAF. Skalpel dan pinset disterilkan dengan cara dibakar pada lampu bunsen kemudian dicelupkan kembali pada alkohol 70%, cara tersebut diulang-ulang sebanyak tiga kali. Endosperm kepel kemudian dipotong dengan ukuran 0,5 cm x 0,5 cm menggunakan skalpel dan pinset. Eksplan endosperm disayat diagonal menggunakan skalpel, kemudian diinokulasi ke dalam medium MS + 2,4-D 2 ppm dan BAP 0,5 ppm secara aseptis dekat dengan lampu bunsen. Botol kemudian ditutup menggunakan *aluminium foil* dengan rapat dan bagian luar dilapisi plastik *wrap*.

7. Inkubasi

Botol kultur yang telah terisi eksplan dan tertutup, kemudian diletakkan pada rak ruang inkubasi. Pada ruang inkubasi menggunakan cahaya lampu neon (TL) sebagai pengganti sinar matahari dengan daya 400 watt selama 24 jam. Suhu ruangan diatur sekitar 20-23°C menggunakan AC. Rak pada ruangan inkubasi dibersihkan dengan alkohol 70%. Pemeliharaan dilakukan selama 2 bulan setelah inokulasi.

8. Pengamatan

Pengamatan dilakukan selama 2 bulan dengan parameter pengamatan yaitu: 1) presentase eksplan hidup, 2) presentase kontaminasi, 3) presentase *browning*, 4) saat *browning*, 5) saat tumbuh kalus, 6) diameter kalus, 7) persentase eksplan berkalus, 8) warna kalus dan 9) tekstur kalus.

E. Parameter Yang Diamati

1. Persentase Eksplan Hidup (%)

Pengamatan eksplan hidup ditandai dengan eksplan berwarna putih atau coklat dan tidak mengalami kontaminasi dan *browning*. Pengamatan eksplan hidup dilakukan setiap 3 hari selama 2 bulan. Persentase eksplan hidup dihitung pada akhir pengamatan

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

2. Persentase Kontaminasi (%)

Pengamatan kontaminasi bertujuan untuk mengetahui jenis kontaminan yang menyebabkan eksplan mati disebabkan oleh bakteri atau cendawan, yeast, kapang atau virus (Santoso dan Nursandi, 2002). Pengamatan persentase kontaminasi dilakukan setiap 3 hari dengan cara melihat kondisi permukaan eksplan selama 2 bulan. Eksplan terkontaminasi ditandai dengan lebih dari 50% eksplan terkontaminasi.

$$\% \text{ kontaminasi} = \frac{\sum \text{eksplan kontaminasi}}{\sum \text{eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%.$$

3. **Persentase *Browning* (%)**

Pengamatan eksplan *browning* ditandai dengan eksplan mengalami pencoklatan atau kehitaman lebih dari 50%. Pengamatan eksplan *browning* dilakukan setiap 3 hari selama 2 bulan. Persentase eksplan *browning* dihitung pada akhir pengamatan.

$$\% \text{ *browning* } = \frac{\sum \text{eksplan *browning*}}{\sum \text{eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

4. **Saat *Browning* (hari)**

Parameter saat *browning* digunakan untuk menghitung kecepatan eksplan mengalami *browning*. Pengamatan saat *browning* dilakukan dengan menghitung hari dari setelah inokulasi hingga waktu eksplan *browning*.

5. **Saat Muncul Kalus (hari)**

Parameter waktu muncul kalus digunakan untuk menghitung kecepatan saat muncul kalus pada eksplan. Pengamatan waktu muncul kalus dilakukan dengan menghitung hari dari setelah inokulasi hingga waktu kemunculan kalus pada eksplan.

6. **Diameter Kalus (mm)**

Parameter diameter kalus diamati untuk menghitung diameter kalus pada eksplan. Parameter ini dilakukan setiap 7 hari sekali dari waktu pertama muncul kalus hingga akhir pengamatan. pengamatan ini dilakukan dengan cara mengukur panjang eksplan berkalus dari tiga sisi (samping, depan dan tinggi), hasilnya kemudian dirata-rata untuk mendapatkan diameter kalus.

7. Persentase Eksplan Berkalus (%)

Pengamatan eksplan berkalus ditandai dengan munculnya kalus pada eksplan. Pengamatan ini dilakukan setiap 3 hari selama 2 bulan. Persentase eksplan berkalus dihitung pada akhir pengamatan.

$$\% \text{ eksplan berkalus} = \frac{\sum \text{eksplan berkalus}}{\sum \text{eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

8. Warna Kalus (warna)

Parameter warna kalus diamati dengan cara melihat warna kalus pada eksplan dihari terakhir pengamatan. Warna kalus diurutkan dari putih, kuning, kuning kehijauan, hijau dan hitam.

9. Tekstur Kalus

Parameter tekstur kalus digunakan untuk mengetahui kualitas kalus. Tekstur kalus diamati dengan cara melihat kondisi kalus secara visual di akhir pengamatan. Tekstur kalus dibedakan menjadi 3 macam yaitu : kompak (*non friable*), intermediet dan remah (*friable*).

F. Analisis Data

Data yang telah didapatkan dari hasil pengamatan pada parameter persentase eksplan hidup, persentase *browning*, dan persentase kontaminasi dianalisis dengan analisis sidik ragam *Analisis of Variance* (ANOVA) pada jenjang nyata $\alpha = 5\%$. Apabila terdapat beda nyata antar perlakuan yang diujicobakan dilakukan uji lanjut menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) taraf $\alpha = 5\%$. Hasil tersebut disajikan dalam bentuk tabel. Parameter lainnya dianalisis dan disajikan dalam bentuk histogram dan tabel.