

### **III. TATA CARA PENELITIAN**

#### **A. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium kultur *in vitro* Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Juli - November 2018.

#### **B. Bahan dan Alat Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu eksplanendosperm kepel: medium Murashige and Skoog (MS), BAP, 2,4-D, sukrosa, agar, stok makro, stok mikro, vitamin, myoinositol, alkohol 70%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aquades steril, deterjen 5%, fungisida, bakterisida dan betadin.

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu: *dissecting kits*, petridish, botol kultur, erlenmayer, autoklaf, *laminar air flow* (LAF), pH stik, aluminium foil, kertas payung, dan *hot plate magnetic stirrer*.

#### **C. Metode Penelitian**

Penelitian dilaksanakan dengan menggunakan metode eksperimen faktor tunggal terdiri dari 6 perlakuan yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Masing-masing perlakuan diulang 3 kali dengan masing-masing ulangan terdiri dari 3 sampel sehingga total penelitian terdapat 54 unit. Sterilisasi endosperm kepel dilakukan dengan 2 tahap percobaan. Adapun perlakuannya sebagai berikut :

### 1. Sterilisasi tahap 1

A = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% + 10 menit

B = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2% + 10 menit

C = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% + 10 menit

D = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% + 15 menit

E = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2% + 15 menit

F = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% + 15 menit

### 2. Sterilisasi tahap 2

A = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% + 10 menit

B = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% + 10 menit

C = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15% + 10 menit

D = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% + 15 menit

E = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% + 15 menit

F = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15% + 15 menit

## D. Cara Penelitian

### 1. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan dengan menggunakan sterilisasi bakar dan sterilisasi basah. Sterilisasi bakar dilakukan di LAF (*Laminar Air Flow*) dengan cara mencelupkan *dissecting kits* ke dalam alkohol 70%, kemudian membakar di atas lampu bunsen. Alat yang disterilisasi bakar yaitu *dissecting kits* (pinset dan skalpel) untuk penanaman eksplant ke dalam botol kultur. Sebelum LAF (*Laminar air flow*) di gunakan untuk melakukan sterilisasi alat kondisi LAF harus dalam keadaan yang aseptik. Sterilisasi LAF (*Laminar air flow*) dilakukan dengan

melakukan penyemprotan alkohol 70% dan menyalakan lampu UV selama 1 jam sebelum LAF digunakan (Yoga, 2016).

Sterilisasi basah dilakukan dengan cara memasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C bertekanan 1 atm selama 60 menit. Sebelum dimasukkan ke dalam autoklaf alat-alat yang akan disterilisasi terlebih dahulu dibungkus dengan menggunakan kertas payung. Alat-alat yang disterilisasi basah diantaranya yaitu: pinset, skalpel, aluminium foil, *glassware* dan botol-botol kultur.

## **2. Pembuatan Larutan Stok**

### **a. Larutan stok makro**

Bahan-bahan yang digunakan dan dibutuhkan untuk membuat 10 x konsentrasi awal larutan stok makro yaitu:  $\text{KNO}_3$  19 g;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  16,5 g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  4,4 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3,7 g dan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,7 g. Pembuatan larutan stok makro dilakukan dengan cara mengencerkan bahan larutan dengan menggunakan aquades steril sebanyak 50 ml secara satu persatu kedalam erlenmayer. Larutan stok kemudian dihomogenkan dengan cara menggojok larutan sampai tercampur merata. Menetapkan volume larutan menjadi 100 ml dengan menambahkan aquades steril. Larutan yang sudah ditetapkan selanjutnya dipindahkan ke dalam botol dan dibungkus dengan aluminium foil serta diberi label 50 ml/l (lampiran 2).

### **b. Larutan stok mikro**

Bahan-bahan yang digunakan dan dibutuhkan untuk membuat 10 x konsentrasi awal larutan stok mikro yaitu:  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,233 g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,086 g;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,062 g; KI 0,0083 g;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,0025 g;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,00025;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,00094 g dan  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,278 g. Pembuatan larutan stok mikro dilakukan dengan cara mengencerkan bahan larutan

dengan menggunakan aquades steril sebanyak 50 ml secara satu persatu kedalam erlenmayer. Larutan stok kemudian dihomogenkan dengan cara menggojok larutan sampai tercampur merata. Menetapkan volume larutan menjadi 100 ml dengan menambahkan aquades steril. Larutan yang sudah ditetapkan selanjutnya dipindahkan ke dalam botol dan dibungkus dengan aluminium foil serta diberi label 10 ml/l (lampiran 2).

#### **c. Larutan stok vitamin**

Bahan-bahan yang digunakan dan dibutuhkan untuk membuat 10 x konsentrasi awal larutan stok vitamin yaitu : Thiamine-HCl 0,001 g; Nicotinic acid 0,005; Phiyrodoxin-HCl 0,005 g dan Glycine 0,2 g. Pembuatan larutan stok vitamin dilakukan dengan cara mengencerkan bahan larutan dengan menggunakan aquades steril sebanyak 50 ml secara satu persatu kedalam erlenmayer. Larutan stok kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *hot plate magnetic stirer*. Menetapkan volume larutan menjadi 100 ml dengan menambahkan aquades steril. Larutan yang sudah ditetapkan selanjutnya dipindahkan ke dalam botol dan dibungkus dengan aluminium foil serta diberi label 10 ml/l (lampiran 2).

#### **d. Larutan stok myoinositol**

Bahan-bahan yang digunakan dan dibutuhkan untuk membuat 10 x konsentrasi awal larutan stok vitamin yaitu 1 g myoinositol. Pembuatan larutan stok myoinositol dilakukan dengan cara mengencerkan bahan larutan dengan menggunakan aquades steril sebanyak 50 ml ke dalam erlenmayer. Larutan stok dihomogenkan dengan cara menggojok larutan sampai tercampur merata. Menetapkan volume larutan menjadi 100 ml dengan menambahkan aquades steril.

Larutan yang sudah ditetapkan selanjutnya dipindahkan ke dalam botol dan dibungkus dengan aluminium foil serta diberi label 10 ml/l (lampiran 2).

**e. Larutan Stok BAP**

Pembuatan larutan stok BAP dibuat dengan menimbang 10 mg BAP kemudian meneteskan NaOH sampai terlarut. Volume ditetapkan hingga 100 ml dengan menambahkan aquades steril. Larutan BAP yang digunakan untuk membuat 1 liter medium MS dengan penambahan 0,5 ppm BAP dibutuhkan sebanyak 5 ml stok BAP (lampiran 2).

**f. Larutan Stok 2,4-D**

Pembuatan larutan stok 2,4-D dibuat dengan menimbang 10 mg 2,4-D kemudian meneteskan NaOH sampai terlarut. Volume ditetapkan hingga 100 ml dengan menambahkan aquades steril. Larutan 2,4-D yang digunakan untuk membuat 1 liter medium MS dengan penambahan 2 ppm 2,4-D dibutuhkan sebanyak 20 ml stok 2,4-D (lampiran 2).

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

Medium yang digunakan yaitu medium MS sebanyak 1.200 ml yang akan digunakan untuk penanaman eksplan endosperm kepel sebanyak 54 botol kultur dan setiap botol kultur diisi dengan media MS sebanyak 20 ml. Bahan-bahan yang digunakan dan dibutuhkan untuk membuat satu liter medium MS yaitu: agar 7 g; sukrosa 30 g; stok makro 50 ml; stok mikro 10 ml; stok vitamin 10 ml; stok myoinositol 10 ml, PPM 0,5 ml, BAP 5 ml dan 2,4-D 20 ml.

Pembuatan medium MS sebanyak 1 liter dilakukan dengan cara memasukan aquades steril 500 ml, stok makro, stok mikro, stok vitamin, stok

myoinositol, PPM, BAP dan 2,4-D kedalam erlenmayer. Menambahkan sukrosa sebanyak 30 g dan digojok hingga semua larutan tercampur merata. Larutan dihomogenkan dengan cara digojog sampai homogen. Setelah homogen, dilakukan pengukuran pH dengan menggunakan pH stik dengan batas optimal pH 6. Apabila larutan terlalu basa maka perlu ditambahkan HCl 1 N sebanyak yang diperlukan dan apabila larutan terlalu masam maka ditambahkan NaOH 1 N.

Sebelum media di panaskan (menggunakan pemanas di atas kompor), larutan medium ditambahkan agar sebanyak 7 g dan menambahkan aquades hingga volume medium menjadi satu liter. Setelah homogen, larutan medium dimasukan ke dalam botol kultur sebanyak 20 ml. Botol ditutup plastik dan dikencangkan dengan menggunakan karet. Medium dimasukan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 120 menit.

#### **4. Sterilisasi Eksplan Tahap 1**

Sterilisasi dilakukan dengan cara memisahkan biji kepel yang akan digunakan dari daging buah, selanjutnya biji dibilas dengan menggunakan air mengalir dan aquades steril. Biji kepel yang sudah dibilas kemudian direndam dalam larutan deterjen 2g/L selama 10 menit dan dibilas hingga bersih dengan menggunakan aquades steril. Biji kepel kemudian direndam dalam larutan bakterisida 2g/L dan larutan fungisida 2g/L selama 60 menit, lalu dibilas dengan menggunakan aquades steril. Sterilisasi biji dilanjutkan dengan merendam biji ke dalam alkohol 70% selama 1 menit, kemudian membilas dengan aquades steril. Biji kepel yang sudah steril dibelah menjadi 2 bagian dan mengambil bagian endosperm. Endosperm kepel kemudian direndam ke dalam lautan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sesuai

dengan perlakuan (1%, 2% dan 3% selama 10 menit dan 1%, 2%, 3% selama 15 menit) dan dibilas dengan aquades steril. Endosperm yang sudah steril diinokulasi dalam botol kultur. Tahap sterilisasi dan penanaman eksplan dilakukan di LAF.

### **5. Sterilisasi Eksplan Tahap 2**

Sterilisasi dilakukan dengan cara memisahkan biji kepel yang akan digunakan dari daging buah, selanjutnya biji dibilas dengan menggunakan air mengalir dan aquades steril. Biji kepel yang sudah dibilas kemudian direndam dalam larutan deterjen 2g/L selama 10 menit dan dibilas hingga bersih dengan menggunakan aquades steril. Biji kepel kemudian direndam dalam larutan bakterisida 2g/L dan larutan fungisida 2g/L selama 60 menit, lalu dibilas dengan menggunakan aquades steril. Biji kepel yang sudah steril dibelah menjadi 2 bagian dan mengambil bagian endosperm. Endosperm kepel kemudian direndam ke dalam larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sesuai dengan perlakuan (5%, 10% dan 15% selama 10 menit dan 5%, 10%, dan 15% selama 15 menit) kemudian dibilas dengan aquades steril. Sebelum dilakukan inokulasi eksplan endosperm dicelupkan ke dalam alkohol 96% selama 2-3 dan ditiriskan dikertas seteril. Tahap sterilisasi dan penanaman eksplan dilakukan di LAF.

### **6. Inokulasi Eksplan Endosperm Kepel**

LAF (*Laminar air flow*) yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu dengan cara menyemprotkan alkohol 70% pada permukaan LAF. Selanjutnya disterilisasikan dengan lampu UV selama 1 jam yang dinyalakan sebelum digunakan. Lampu bunsen dinyalakan di dalam LAF setelah lampu UV dimatikan. Eksplan endosperm kepel yang sudah steril, dipotong-potong berbentuk persegi

dengan menggunakan skalpel di dalam petridish. Potongan eksplan kepel ditanam dalam botol kultur pada medium MS sebanyak satu eksplant. Selanjutnya botol ditutup dengan menggunakan *aluminium foil* secara rapat dan dilapisi plastik *warp*.

## **7. Inkubasi Eksplan**

Botol-botol kultur yang berisikan eksplan diinkubasikan di dalam ruang inkubator dengan suhu dan intensitas cahaya sesuai dengan optimum tanaman. Sebagai pengganti sinar matahari di dalam ruang inkubasi dilengkapi lampu neon (TL) 40 watt yang dinyalakan selama 24 jam. Suhu ruang inkubasi diatur menggunakan AC dengan suhu 20-28°C. Rak-rak inkubasi disterilkan dengan menyemprotkan alkohol 70%. Pemeliharaan eksplan dilakukan selama 2 bulan.

## **8. Pengamatan**

Pengamatan penelitian dilakukan selama 2 bulan dengan parameter pengamatan yaitu: 1) Persentase kontaminasi, 2) Persentase *browning*, dan 3) Persentase hidup (kalus, tunas dan akar).

## **E. Parameter yang Diamati**

### **1. Persentase Kontaminasi (%)**

Pengamatan kontaminasi dilakukan setiap 3 hari sekali selama 2 bulan dimulai sejak eksplan memasuki ruang inkubasi. Presentase eksplan kontaminyatakan banyaknya jumlah eksplan yang kontam dari jumlah percobaan.



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

## 2. Jenis dan Saat Kontaminasi

Pengamatan dilakukan setiap hari pada eksplan yang mengalami kontaminasi dengan mengamati penyebab terjadinya kontaminasi dan mencatat jenis dan saat terkontaminasi.

## 3. Persentase *Browning* (%)

Pengamatan *browning* dilakukan setiap 3 hari sekali selama 2 bulan dan dimulai sejak eksplan diinkubasikan. Persentase eksplan *browning* menyatakan banyaknya jumlah eksplan yang *browning* dari jumlah percobaan. Eksplan dikatakan *browning* apabila pencoklatan pada eksplan lebih dari 50%.

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

## 4. Persentase Eksplan Hidup (%)

Eksplan dapat dikatakan hidup apabila eksplan tetap berwarna putih dan berkalus, tidak mengalami *browning* lebih dari setengah dan tidak ada kontaminasi dari bakteri ataupun jamur. Pengamatan eksplan hidup dilakukan setiap 3 hari sekali selama 2 bulan dan dimulai sejak eksplan diinkubasikan.

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

## F. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan analisis persentase dan disajikan dalam bentuk tabel. Sebagian data disajikan dalam bentuk gambar.

