

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur *In Vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Pada bulan September 2006 – Maret 2007.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas : (a). bahan tanam berupa batang *Aglaonema* sp (b) medium SA (gula pasir-agar), medium MS, 2,4-D dan kinetin (c) Sterilan : deterjen, NaClO (pemutih), Bakterisida, Fungisida, *aquadest* steril dan alkohol 70%.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas : (a) Alat kultur : autoklaf, *Hot Plate Magnetic Stirrer*, *Laminar Air Flow* (LAF), kompor gas, glassware (petridish, gelas ukur, labu takar, erlenmeyer, pipet tetes), skalpel, spatel, syring, pinset, sprayer, botol kultur, aluminium foil, kertas payung, gunting, lampu spiritus (b) Alat ukur : kertas pH, pipet ukur, jangka sorong timer, alat tulis.

C. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan 2 tahap metode percobaan laboratorium, yaitu:

1. Optimasi Sterilisasi

Penelitian dilakukan dengan menggunakan Rancangan faktor tunggal 4

diuji adalah konsentrasi dan lama perendaman NaClO. Masing-masing perlakuan diulang 3 kali dan masing-masing ulangan 3 sampel. Adapun perlakuannya yaitu :

A = NaClO 10% selama 10 menit di lanjutkan NaClO 5% selama 5 menit

B = NaClO 10% selama 15 menit di lanjutkan NaClO 5% selama 5 menit

C = NaClO 20% selama 10 menit di lanjutkan NaClO 5% selama 5 menit

D = NaClO 20% selama 15 menit di lanjutkan NaClO 5% selama 5 menit

Masing-masing perlakuan diulang 3 kali dan masing-masing ulangan terdiri dari 2 sampel sehingga total unit percobaan adalah $4 \times 3 \times 3 = 36$ unit percobaan.

2. Induksi Kalus

Penelitian dilakukan dengan menggunakan rancangan faktorial 6 perlakuan yang disusun dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan yang diuji adalah penambahan konsentrasi 2,4-D dan kinetin dalam medium MS. Tiap perlakuan diulang 3 kali masing-masing 3 sampel sehingga diperlukan 54 botol

D. Pelaksanaan Penelitian

1. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan dengan dua cara yaitu sterilisasi panas dan sterilisasi bakar. Sterilisasi panas bisa dilakukan dengan cara mencuci dan mengeringkan alat-alat yang digunakan untuk kultur jaringan, kemudian membungkusnya dengan kertas payung dan disterilkan dalam autoklaf dengan tekanan 1atm (121°C) selama 30 menit. Alat-alat yang disterilkan dengan cara ini meliputi Botol kultur, Petridis, Erlenmeyer, Gelas piala, Gelas ukur, Pinset dan *Dissecting kits*.

Sterilisasi bakar dilakukan dengan cara membakar alat pada lampu spiritus dengan terlebih dahulu mencelupkan alat pada alkohol 70% sampai alkoholnya hilang. Sterilisasi dilakukan dengan *Laminair Air Flow* sebelum dilakukan penanaman eksplan. Alat-alat yang disterilkan antara lain Scalpel, Gunting dan Pinset, sedangkan sterilisasi alat pada penabur *Laminair Air Flow* dilakukan dengan cara menghidupkan lampu UV selama 1 jam sebelum inokulasi, kemudian menyemprotkan alkohol 70% dan dilap sampai kering.

2. Pembuatan Media Sukrosa Agar

Media yang digunakan pada Sterilisasi adalah media Sukrosa Agar. Media dibuat untuk 36 botol, dimana masing-masing berisi 10 ml atau sebanyak 360 ml. Untuk membuat media ditimbang Sukrosa $30 \text{ g/l} = 1,8 \text{ g/360 ml}$. Setelah bahan ditimbang, kemudian ditambahkan *aquadest* steril sampai volume 360 ml, kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga mendidih dan menjadi jernih. Larutan

10 ml, lalu ditutup dengan plastik dan diikat dengan karet, kemudian disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121 °C, tekanan 1atm selama 20 menit.

3. Optimasi Sterilisasi

a. Sterilisasi dan Penanaman Eksplan

Eksplan batang *Aglaonema* sp diambil kemudian dicuci hingga bersih dengan air mengalir selama 20 menit untuk membuang kotoran. Batang *Aglaonema* sp dicuci dengan deterjen 2 g/l selama 10 menit sambil digojog – gojog dan dibilas dengan air sebanyak 3 kali. Batang *Aglaonema* sp yang sudah bersih direndam dalam Fungisida dan Bakterisida masing – masing 2 g/l selama 15 menit, kemudian dibilas dengan *aquadest* steril sebanyak 3 kali. Eksplan dibawa ke dalam *laminar Air Flow* kemudian direndam dalam alkohol 70% selama 1 menit dan rendam eksplan ke dalam larutan NaClO sesuai dengan masing – masing perlakuan, selanjutnya dibilas dengan *aquadest* sebanyak 3 kali. Eksplan diambil menggunakan pinset dan diletakkan dalam petridish (diameter 11 cm dan berisi 30 ml *aquadest* steril dengan menambah 7 tetes Betadin). Eksplan kemudian dipotong tipis melintang dengan ketebalan 1-2 mm dan diinokulasi ke dalam medium Sukrosa Agar(cara pembuatan lampiran 1). Permukaan mulut botol terlebih dahulu dipanaskan pada lampu spritus sebelum eksplan ditanam dan ditutup. Botol kultur ditutup secepat mungkin dengan aluminium foil. Botol kultur yang telah ditanam diberi label, tanggal, penanam dan perlakuan. Botol kultur tersebut kemudian dikeluarkan dari *Laminar Air Flow* dan segera dipindahkan pada rak inkubasi dengan lampu TL (neon) berkekuatan 40 watt dengan suhu ruangan antara 20 – 28°C selama 2 minggu.

4. Tahap Induksi Kalus

a. Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan dilakukan dengan menggunakan metode sterilisasi yang terbaik pada saat tahap optimasi sterilisasi, dan selanjutnya ditanam pada media sesuai dengan perlakuan.

b. Pembuatan Media

Media yang digunakan adalah media MS (Murashige dan Skoog) dengan penambahan ZPT 2,4-D dan kinetin sesuai dengan perlakuan.

1) Larutan Stok A (5 kali konsentrasi)

Melarutkan NH_4NO_3 8,25 g ke dalam glass beaker yang berisi 50 ml aquadest steril yang diaduk dengan *Magnetik Stirer* sampai homogen. Menambahkan aquadest pada larutan stok hingga volumenya menjadi 100 ml, untuk membuat satu liter medium diperlukan 20 ml larutan stok. Memberi label dalam botol stok A 20 ml/1.

2) Larutan Stok B (5 kali Konsentrasi)

Melarutkan KNO_3 9,5 g ke dalam gelas beaker yang berisi 50 ml aquadest steril dan diaduk dengan *Magnetic Stirer* sampai homogeny. Menambahkan aquadest pada larutan stok hingga volumenya menjadi 100 ml, untuk membuat 1 liter medium diperlukan 20 ml larutan stok. Memberi label dalam botol stok B 20 ml/1.

3) Larutan Stok C (5 kali konsentrasi)

Melarutkan KH_2PO_4 0,85 g, H_3BO_3 0,31 g, KI 0,004 g, dan NaMoO_4 ,

dengan *Magnetic Stirer* sampai homogen. Menambahkan *aquadest* pada larutan stok hingga volumenya menjadi 100 ml, untuk membuat 1 liter medium diperlukan 20 ml larutan stok. Memberi label dalam botol stok C 20 ml/1.

4) Larutan Stok D (5 kali konsentrasi)

Melarutkan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 g ke dalam gelas beaker yang berisi 50 ml *aquadest* steril dan diaduk dengan *Magnetic Stirer* sampai homogen. Menambahkan *aquadest* pada larutan stok hingga volumenya menjadi 100 ml, untuk membuat 1 liter medium diperlukan 20 ml larutan stok. Memberi label dalam botol stok D 20 ml/1.

5) Larutan Stok E (5 kali konsentrasi)

Melarutkan $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,85 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,112 g, dan $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,043 g ke dalam gelas beaker yang berisi 50 ml *aquadest* steril dan diaduk dengan *Magnetic Stirer* sampai homogen. Menambahkan *aquadest* pada larutan stok hingga volumenya menjadi 100 ml, untuk membuat 1 liter medium diperlukan 20 ml larutan stok. Memberi label dalam botol stok E 20 ml/1.

6) Larutan Stok F (5 kali konsentrasi)

Melarutkan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,139 g dan $\text{NaEDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,816 g ke dalam gelas beaker yang berisi 50 ml *aquadest* steril dan diaduk dengan *Magnetic Stirer* sampai homogen. Menambahkan *aquadest* pada larutan stok hingga volumenya menjadi 100 ml, untuk membuat 1 liter medium diperlukan 20 ml larutan stok.

7) Larutan Stok Co (100 kali konsentrasi)

Melarutkan $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2,5 g ke dalam gelas beaker yang berisi 300 ml aquadest steril dan diaduk dengan *Magnetic Stirer* sampai homogen. Menambahkan aquadest pada larutan stok hingga volumenya menjadi 500 ml, untuk membuat 1 liter medium diperlukan 5 ml larutan stok. Memberi label dalam botol stok Co 5 ml/l.

8) Larutan Stok Cu (100 kali konsentrasi)

Melarutkan $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2,5 g ke dalam gelas beaker yang berisi 300 ml aquadest steril dan diaduk dengan *Magnetic Stirer* sampai homogen. Menambahkan aquadest pada larutan stok hingga volumenya menjadi 500 ml, untuk membuat 1 liter medium diperlukan 5 ml larutan stok. Memberi label dalam botol stok Cu 5 ml/l.

9) Larutan Stok Vitamin (5 kali konsentrasi)

Menimbang bahan-bahan kimia vitamin : Nicotinic-acid 0,0025, Pyridoxine-HCl 0,025 g, Thiamine-HCl 0,0025 g, Glycine 0,01 g. Melarutkan bahan-bahan tersebut kedalam gelas beaker yang berisi 50 ml aquadest steril dan diaduk dengan *Magnetic stirer* sampai homogen. Menambahkan aquadest pada larutan stok hingga volumenya menjadi 100 ml, untuk membuat 1 liter medium diperlukan 20 ml larutan stok. Memberi label dalam botol stok vitamin 20 ml/l.

10) Stok ZPT 2,4-D

Dibuat dengan konsentrasi 100 ppm dari 100 ml dengan cara menimbang

..... 100 ml aquadest steril 100

11) Pembuatan media MS + 2,4-D + Kinetin

Untuk membuat 100 ml medium MS dibutuhkan stok A = 20 ml, stok B = 20 ml, stok C = 20 ml, stok D = 20 ml, stok E = 20 ml, stok F = 20 ml, stok Co = 20 ml, stok Cu = 20 ml, sukrosa = 30 gram, dan agar-agar = 5 gram. Kemudian ditambahkan *aquadest* steril hingga volume menjadi 500 ml. Selanjutnya medium MS tersebut dibagi ke dalam Erlenmeyer sejumlah perlakuan dan diberi perlakuan:

Macam-macam perlakuan medium MS antara lain :

- P. MS + 2,4-D 1 ppm + kinetin 0,5 ppm
- Q. MS + 2,4-D 1 ppm + kinetin 1 ppm
- R. MS + 2,4-D 2 ppm + kinetin 0,5 ppm
- S. MS + 2,4-D 2 ppm + kinetin 1 ppm
- T. MS + 2,4-D 3 ppm + kinetin 0,5 ppm
- U. MS + 2,4-D 3 ppm + kinetin 1 ppm

Masing-masing medium yang sudah diberi perlakuan ditepatkan volumenya menjadi 200 ml dan diukur pHnya menjadi 6-6,5. Media yang sudah diberi perlakuan dan diukur pHnya sesuai dengan kebutuhan eksplan dipanaskan hingga mendidih. Selanjutnya masing-masing media tuang ke dalam botol kultur yang sudah disterilkan dengan volume 20 ml per botol. Hingga didapatkan total medium di dalam botol keseluruhan adalah 60 botol perlakuan. Sterilisasi medium

... .. 11.61 121 °C dan tekanan 1 atm selama

c. Penanaman

Laminar Air Flow disemprot dengan alkohol 70 %, lampu UV dinyalakan 1 jam sebelum penanaman dan nyalakan *blower* 10 menit sebelum penanaman dimulai. Eksplan yang sudah disterilkan dibawa dalam LAF kemudian rendam dalam Sunclin dengan metode terbaik, selanjutnya bilas dengan *aquadest* steril sebanyak tiga kali. Eksplan diambil dari larutan dengan menggunakan pinset, kemudian potong dalam petridish yang sudah diberi *aquadest* steril 30 ml + 2 – 3 tetes betadin. Potong eksplan tipis melintang dengan ketebalan \pm 1mm, kemudian inokulasikan eksplan dalam medium perlakuan. Botol ditutup dengan aluminium foil dan ikat menggunakan karet, kemudian simpan eksplan dalam ruang inkubasi dan amati sesuai pengamatan.

d. Pemeliharaan

Eksplan yang sudah diinokulasikan segera diinkubasikan dalam ruang inkubasi dengan suhu ruangan antara (20 – 28) °C dan pencahayaan menggunakan lampu TL (neon) berkekuatan 40 watt. Pengamatan dilakukan selama 8 minggu dan bila terjadi kontaminasi pada eksplan segera dipindahkan supaya tidak

E. Variabel Pengamatan

1. Tahap I optimasi sterilisasi

a. *Persentase eksplan hidup (%)*

Eksplan yang hidup yaitu eksplan yang tidak terkontaminasi dan tidak mengalami pencoklatan (kurang separuh eksplan) dihitung setiap hari selama 2 minggu dan dinyatakan dalam persen. Perhitungan berdasarkan rumus:

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

b. *Persentase Kontaminasi (%)*

Eksplan yang terkontaminasi dihitung setiap hari selama 2 minggu. Eksplan terkontaminasi apabila terdapat jamur dan bakteri di dalam medium kultur dan dinyatakan dalam persen. Perhitungan dilakukan berdasarkan rumus:

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

c. *Persentase Kecoklatan (%)*

Eksplan yang mengalami pencoklatan yang lebih dari separuh, dihitung setiap hari selama 2 minggu dan dinyatakan dalam persen. Perhitungan dilakukan berdasarkan rumus:

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

2. Tahap II Induksi Kalus :

a. *Persentase Hidup (%)*

Eksplan yang hidup yaitu eksplan yang tidak terkontaminasi dan tidak mengalami pencoklatan (Kurang separuh eksplan) dihitung setiap hari selama 8 minggu dan dinyatakan dalam persen. Perhitungan dilakukan berdasarkan rumus :

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

b. *Persentase Kontaminasi (%)*

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

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

c. *Persentase Pencoklatan (%)*

Eksplan yang mengalami pencoklatan yang lebih separuh, dihitung setiap hari selama 8 minggu dan dinyatakan dalam persen. Perhitungan dilakukan berdasarkan rumus :

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

d. Saat muncul Kalus

Pembentukan kalus diamati saat hari terbentuknya kalus dan dilakukan setiap hari.

e. Warna kalus

Mengamati kenampakan visual warna kalus setiap hari selama 8 minggu dengan menggunakan *Munssel Plant Tissue Colour Chart*.

F. Analisis Data

Data persentase kontaminasi, persentase pencoklatan, persentase hidup, berat segar kalus dan volume kalus dianalisis dengan sidik ragam pada taraf kesalahan 5%, jika ada beda nyata antar perlakuan selanjutnya diuji dengan DMRT pada taraf kesalahan 5%. Data saat muncul kalus dan warna kalus

.....