

I. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

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

B. Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah botol kultur, erlenmayer, gelas ukur, botol jam, pinset, skalpel, petridish, pisau, nampan, timbangan analitik, mangkuk timbang, aluminium foil, pengaduk kaca, *Laminar Air Flow*, pH stik, autoklaf, lampu bunsen, rak kultur.

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah embrio biji kepel, larutan H₂O₂, alkohol 70%, detergen 5%, bakterisida dan fungisida, betadine, aquades steril, kertas payung, karet, spirtus, medium Murashige and Skoog (MS), NAA, BAP, gula pasir, agar, stok makro dan stok mikro.

C. Metode Penelitian

Penelitian dilaksanakan dengan metode percobaan Laboratorium faktor tunggal yang terdiri atas 6 perlakuan yang disusun dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Setiap perlakuan diulang 3 kali dengan masing-masing ulangan terdiri dari 3 sampel sehingga didapatkan 54 unit. Penelitian ini dilakukan dalam 2 tahap, yaitu:

Strerilisasi tahap pertama :

A = H₂O₂ 1% + 5 menit

B = H₂O₂ 1% + 10 menit

C = H₂O₂ 2% + 5 menit

D = H₂O₂ 2% + 10 menit

E = H₂O₂ 3% + 5 menit

F = H₂O₂ 3% + 10 menit

Strerilisasi tahap kedua :

A = H₂O₂ 5% + 10 menit

B = H₂O₂ 5% + 15 menit

C = H₂O₂ 10% + 10 menit

D = H₂O₂ 10% + 15 menit

E = H₂O₂ 15% + 10 menit

F = H₂O₂ 15% + 15 menit

D. Cara Penelitian

1. Persiapan Alat dan Bahan

Persiapan alat dan bahan ini meliputi menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan, yaitu dari mulai menyiapkan kebutuhan botol kultur, Erlenmeyer dan alat yang lainnya. Begitupun pada persiapan bahan, pada tahap persiapan bahan ini dilakukan untuk memeriksa bahan yang akan digunakan dari mulai eksplan sampai media.

2. Sterilisasi Alat

Tahap sterilisasi alat meliputi 3 tahapan yaitu sterilisasi basah, sterilisasi bakar dan ultra violet. Langkah sterilisasi basah dimulai dengan mencuci alat yang akan digunakan dengan menggunakan detergen ataupun ada yang menggunakan larutan clorox, setelah alat semua bersih maka langkah selanjutnya alat dan bahan yang akan di sterilkan harus dibungkus seluruh permukaannya dengan menggunakan kertas payung yang selanjutnya akan disusun ke dalam rak autoklaf dan dimasukkan ke dalam autoklaf untuk melakukan proses sterilisasi. Proses sterilisasi alat membutuhkan waktu sekitar 1 jam dengan suhu 121°C sedangkan untuk sterilisasi aquades maka diperlakukan waktu selama kurang lebih 2 jam. Setelah proses sterilisasi di dalam autoklaf selesai maka langkah selanjutnya yaitu menunggu sampai alat benar-benar dingin dan setelah dingin alat akan dipindahkan ke ruang inkubasi.

Tahapan Sterilisasi bakar dan sterilisasi bakar dapat dijadikan menjadi satu rangkaian. Sebelum sterilisasi bakar dilakukan, *laminar air flow* yang akan digunakan harus dalam keadaan yang steril atau aseptik. *Laminar air flow* yang akan digunakan harus disemprot menggunakan alkohol 70% dan menyalakan lampu UV selama 1 jam sebelum LAF akhirnya digunakan. Sterilisasi bakar dilakukan menggunakan lampu bunsen di dalam *laminar air flow* (LAF). Tahapan sterilisasi bakar ini yaitu dengan cara mencelupkan pinset dan scalpel yang digunakan untuk penanaman eksplan ke dalam botol kultur.

3. Pembuatan Larutan Stok

Pembuatan medium MS ini memerlukan larutan-larutan yang mengandung mineral yang memiliki konsentrasi yang rendah tujuannya untuk memudahkan pembuatan media yaitu dengan cara mengencerkan larutan stok yang dibutuhkan. Adapun pembuatan larutan-larutan stok untuk pembuatan medium MS dilakukan dengan cara sebagai berikut.

a. Stok Makro

Stok makro adalah larutan yang dibuat dari beberapa unsur yaitu 19 gram/L KNO_3 , 16,5 gram/L NH_4NO_3 , 4,4 gram/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, dan 3,7 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ yang selanjutnya unsur tersebut diencerkan menjadi larutan untuk kebutuhan per 1 Liter. Aquades sebanyak 50 ml satu persatu dimasukkan ke dalam erlenmayer yang tujuannya untuk mengencerkan stok makro yang sudah dibuat. Larutan stok harus dihomogenkan dengan cara menggojok larutan sampai benar-benar tercampur. Setelah larutan homogen, maka volume larutan harus ditambahkan sampai volume larutan menjadi 100 ml. Perhitungan kebutuhan stok makro untuk medium MS terlampir pada lampiran 2.

b. Stok Mikro

Larutan mikro adalah larutan yang dibuat dari beberapa unsur yaitu 0,23 gram/L MnSO_4 , 0,086 gram/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,062 gram/L H_3BO_3 , 0,0083 gram/L KI , 0,00025 gram/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,0025 $\text{Mg}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,00094 gram/L $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,278 gram/L

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dan 0,373 gram/L $\text{Na}_2 \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Perhitungan kebutuhan stok mikro untuk medium MS terlampir pada lampiran 2.

c. Stok Vitamin

Larutan vitamin yang digunakan untuk pembuatan medium MS terdiri dari beberapa larutan yaitu 1 gram/L Mio-inositol, 0,001 gram/L Thiamin-HCl, 0,005 gram/L Nicotinic-acid, 0,005 gram/L Phylloquinone-HCl, 0,02 gram/L Glicine. Perhitungan stok vitamin terlampir pada lampiran 2.

d. Stok Mio-inositol

Mio-inositol yang digunakan untuk pembuatan media MS yaitu sebanyak 0,1 ml/Liter. Adapun tujuan dari pemberian atau penambahan larutan mio-inositol pada media MS yang akan digunakan yaitu sebagai vitamin untuk eksplan juga.

e. Stok BAP (10 ppm)

Pembuatan stok BAP yaitu dengan menimbang 1 mg BAP dan selanjutnya meneteskan NaOH sampai terlarut. Volume ditetapkan hingga 100 ml dengan penambahan aquades steril. Kemudian larutan stok BAP dipindahkan ke dalam botol stok dan ditutup serta diberi label BAP 10 ppm, yang selanjutnya disimpan dalam refrigador. Untuk pembuatan 1 liter medium MS dengan penambahan 0,5 ppm BAP diperlukan 5 ml stok BAP.

f. Stok NAA (10 ppm)

Pembuatan stok NAA dibuat dengan cara menimbang 1 mg NAA terlebih dahulu kemudian ditetesi NaOH dan diaduk sampai benar-benar larut, setelah itu volume ditetapkan hingga 100 ml dengan menambahkan aquades steril. Larutan NAA selanjutnya dipindahkan ke dalam botol stok dan ditutupi serta diberi label NAA 10 ppm dan disimpan di dalam refrigerator. Untuk pembuatan 1 liter medium MS dengan penambahan 2 ppm NAA diperlukan 20 ml stok NAA.

4. Pembuatan media MS

Media MS ini terdiri dari larutan mikro, makro, vitamin, Mio-inositol, agar, zat pengatur tumbuh yaitu NAA serta BAP dan sukrosa. Langkah untuk membuat media MS dimulai dengan memeriksa stok larutan-larutan yang ada. Langkah pertama yang harus dilakukan yaitu memasukkan aquades sebanyak 100 ml ke gelas piala berukuran 400 ml, setelah itu menambahkan larutan stok Makro sebanyak 50 ml, menambahkan larutan stok mikro sebanyak 10 ml, larutan stok vitamin dan Mio-inositol masing-masing sebanyak 10 ml. Langkah kedua yaitu memasukkan sukrosa atau gula lalu diaduk hingga homogen. Setelah sukrosa tercampur dengan larutan stok dan air maka langkah selanjutnya yaitu mengukur pH dengan menggunakan pH *stick*. Apabila pH belum sesuai dengan yang diinginkan yaitu pH 7, apabila terlalu asam maka ditambahkan larutan NaOH dan apabila terlalu basa maka ditambahkan larutan KOH sampai berubah menjadi pH yang diinginkan yaitu sebesar 7. Langkah yang ketiga apabila pH sudah sesuai maka ditambahkan

agar-agar untuk selanjutnya diaduk hingga homogen dan gelas piala yang tadi masih berisi 100 ml harus ditambahkan air sampai volume nya mencapai 400 ml. Agar yang sudah tercampur dengan bahan yang lainnya kemudian dipanaskan dengan menggunakan kompor dalam keadaan api yang kecil yang tujuannya supaya media dapat tercampur dengan sempurna.

Media yang sudah dianggap mendidih dan dianggap sudah homogen selanjutnya diangkat dan setelah itu dibagi ke dalam botol kultur dengan volume masing-masing botol kultur sebesar 20 ml, sehingga larutan media dengan volume 400 ml dapat dibagi ke dalam 20 botol kultur.

Pada pembuatan medium MS sebanyak 1.200 mL dibuat dengan menggunakan labu Erlenmeyer yang berukuran 400 mL sehingga untuk memenuhi kebutuhan medium MS sebanyak 1.200 mL dilakukan pembuatan medium sebanyak 3 kali. Medium MS yang digunakan untuk penanaman eksplan atau inokulasi eksplan ini ditambahkan zat pengatur tumbuh yaitu NAA 2 ppm dan BAP sebanyak 0,5 ppm. Pemberian ZPT ini bertujuan untuk menumbuhkan eksplan yang ditanam.

5. Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan ini dilakukan dengan membuka buah kepel dan memisahkan biji nya dari daging buah. Setelah itu biji dicuci sampai bersih sampai benar-benar terpisah dari daging buah. Langkah selanjutnya biji yang sudah dicuci bersih ini dibelah menggunakan pisau dan nampan untuk memisahkan kembali bagian embrio yang ada di dalam biji buah kepel, embrio yang sudah terpisah kemudian diambil menggunakan pinset dan

dimasukan ke dalam botol jam steril. Embrio kepel selanjutnya melalui tahap sterilisasi yaitu dengan mulai merendam embrio kepel dengan larutan detergen sebanyak 2 gram selama kurang lebih 10 menit, kemudian embrio kepel dibilas dengan menggunakan aquades steril sebanyak 3 kali dan setelah itu direndam kembali dengan larutan bakterisida dan fungisida sebanyak 2 gram menggunakan merk dagang dithane dan agreptselama 60 menit.

Cara kerja dari fungisida dan bakterisida terhadap eksplan embrio kepel yang disterilisasi yaitu dengan cara kontak atau langsung masuk pada jaringan eksplan embrio biji kepel sehingga diharapkan bakteri dan jamur yang menempel pada eksplan yang terbawa dari luar dapat langsung langsung mati. Apabila embrio kepel telah direndam dengan bakterisida dan fungisida, maka langkah selanjutnya embrio biji kepel yang sudah direndam tersebut dibersihkan dengan menggunakan aquades steril atau dibilas sebanyak 3 kali sampai eksplan benar-benar bersih dari larutan bakterisida dan fungisida. Setelah benar-benar bersih eksplan yang ditempatkan di dalam botol jam dibawa ke dalam ruang inokulasi dan masih harus melalui proses perendaman larutan H_2O_2 selama waktu yang telah ditentukan sesuai perlakuan.

Sterilisasi pada tahapan ini dilakukan sebanyak 2 kali tahapan yaitu sterilisasi tahap pertama dengan menggunakan H_2O_2 dengan konsentrasi 1%, 2%, dan 3% dengan lama perendaman selama 5 menit dan 10 menit. Sterilisasi tahapan kedua yaitu menggunakan H_2O_2 dengan konsentrasi 5%, 10%, dan 15% dengan lama perendaman selama 10 menit dan 15 menit.

Eksplan yang telah direndam pada berbagai konsentrasi kemudian dibilas menggunakan aquades steril kurang lebih sebanyak 3 kali bilasan.

Cara kerja H_2O_2 sebagai bahan pensterilan yaitu karena hidrogen peroksida dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan cendawan dengan cara menghidrolisis sel atau menggumpalkan protein yang terdapat pada protoplasma. Protein yang telah menggumpalkan kehilangan fungsinya sehingga bakteri dan cendawan mengalami kematian, setelah melalui tahapan perendaman dengan H_2O_2 maka tahapan yang terakhir yaitu embrio dimasukkan ke dalam larutan betadine yang sudah dicampurkan dengan aquades steril. Tahapan ini bertujuan untuk menghilangkan bakteri dan jamur yang masih terbawa dan tidak mati pada proses perendaman menggunakan H_2O_2 dapat mati akibat rendaman betadine. Cara kerja betadine sebagai bahan pensteril yaitu dengan mengganggu metabolisme sel atau mengubah permeabilitas dari dinding sel mikroorganisme. Hal ini pada prinsipnya hampir sama saja dengan H_2O_2 yang akan langsung menyerang pada dinding sel dari mikroorganisme.

6. Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan ini dilakukan di dalam LAF dengan keadaan yang steril. Sebelum eksplan ditanam, LAF harus melalui tahapan sinar ultraviolet selama kurang lebih 1 jam tujuannya yaitu agar bakteri ataupun jamur serta kotoran lain yang menempel dapat mati dengan sinar UV. Setelah proses penyinaran UV, sebelum menanam eksplan LAF harus disemprot dengan menggunakan alkohol 70% atau alkohol 96% namun pada penelitian ini

alkohol yang digunakan yaitu alkohol 70%. Bahan dan alat yang dibutuhkan selama proses penanaman eksplan kemudian dimasukkan ke dalam LAF dengan disemprot alkohol terlebih dahulu. Langkah pertama dalam proses penanaman yaitu mengambil media MS yang telah tersedia, selanjutnya eksplan yang sudah direndam menggunakan H_2O_2 diambil dan dimasukkan ke dalam alkohol 70% selama kurang lebih 5 detik. Eksplan embrio kepel kemudian diangkat untuk selanjutnya direndam dalam betadine selama beberapa detik. Eksplan yang telah direndam betadine diangkat dan ditiriskan pada kertas saring steril, setelah beberapa lama maka eksplan siap ditanam dalam media MS. Eksplan embrio kepel yang sudah ditanam dibungkus dengan menggunakan aluminium foil dan plastic wrap untuk selanjutnya disimpan dan diamati selama 60 hari.

7. Pengamatan Eksplan

Pengamatan eksplan ini dilakukan berdasarkan parameter pengamatan. Parameter pengamatan persentase dilakukan setiap 3 hari sekali selama 60 hari atau dalam jangka waktu 2 bulan. Namun untuk pertumbuhan kalus eksplan, pengamatan dilakukan setiap 1 minggu sekali dalam jangka waktu yang telah ditentukan. Pengamatan ini bertujuan untuk mengetahui apakah eksplan terkontaminasi oleh jamur maupun bakteri. Selain itu pengamatan dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan eksplan.

E. Parameter Yang Diamati

1. 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.

$$\text{Persentase hidup} = \frac{\text{jumlah eksplan yang berhasil masing-masing perlakuan}}{\text{jumlah eksplan keseluruhan}} \times 100\%$$

2. Persentase Kontaminasi (%)

Persentase kontaminasi yang diamati ini bertujuan untuk mengetahui jumlah persentase keseluruhan eksplan yang terkontaminasi baik oleh jamur maupun bakteri. Persentase kontaminasi ini diamati setiap 3 hari sekali. Cara untuk menghitung persentase kontaminasi ini sendiri yaitu dengan menggunakan rumus :

$$\text{Persentase kontaminasi} = \frac{\text{eksplan yang terkontaminasi setiap perlakuan}}{\text{total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

3. Persentase *Browning* (%)

Persentase *browning* diamati setiap 3 hari sekali dan persentase *browning* ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Persentase } \mathbf{Browning} = \frac{\text{jumlah ekspla yang mengalami } \mathbf{browning} \text{ tiap perlakuan}}{\text{total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

4. Jenis dan Saat Kontaminasi (hari)

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

5. Saat Eksplan *Browning* (hari)

Pengamatan dilakukan setiap hari pada eksplan yang mengalami *browning*, tujuannya yaitu untuk mengetahui saat eksplan mengalami *browning*.

F. Analisis Data

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