UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Juni sampai dengan September 2013. Tempat percobaan adalah di Laboratorium Kultur *in vitro* Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

B. Bahan dan Alat Penelitian

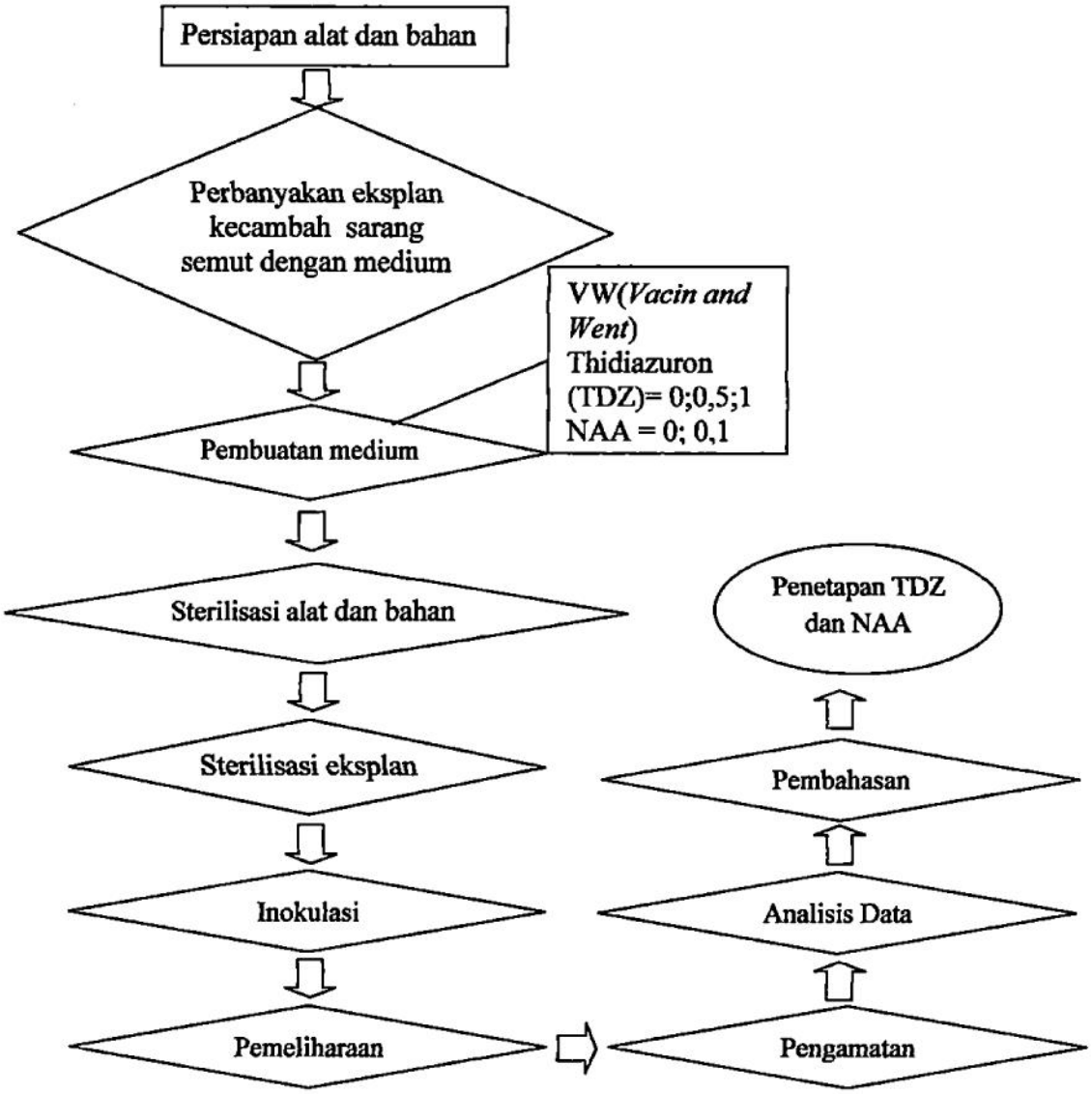
Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksplan biji sarang semut (*Myrmecodia pendans*). Medium yang digunakan adalah VW padat ditambah dengan sitokinin (TDZ) dan auksin (NAA). Pengaturan pH media dengan menambahkan KOH atau HCl 0,1 N. Bahan untuk sterilisasi berupa alkohol 70%, clorox, betadin, bakterisida (Agrept), fungisida (Banlate). Bahan lainnya seperti agar, gula, karet gelang, plastik, kertas buram, *tissue* dan label.

Alat yang digunakan adalah sebagai berikut: *Hot Plate Magnetic Stirer* untuk mengaduk larutan stok dan medium hingga homogen; timbangan analitik untuk menimbang bahan-bahan dalam penelitian; pH stik untuk mengukur pH pada larutan stok dan medium; timer untuk mengukur waktu; alumunium foil sebagai penutup botol kultur (medium); *dissecting kits* untuk inokulasi; autoklaf untuk mensterilkan medium dan alat yang akan digunakan dalam penelitian. Peralatan gelas yang digunakan adalah petridish, botol kultur sebagai tempat untuk menumbuhkan eksplan, gelas ukur untuk mengukur banyaknya larutan yang dibutuhkan dalam pembuatan medium stok dan medium perlakuan, pipet tetes untuk mengambil larutan dalam jumlah yang sedikit, pinset untuk mengambil

eksplan dalam botol sub kultur, *Laminar Air Flow* (LAF) sebagai tempat melakukan kegiatan penanaman dan sub kultur, lampu Bunsen untuk sterilisasi pada saat penanaman dan sub kultur eksplan, *Milipore* untuk sterilisasi thidiazuron

C. Metode Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada gambar 2



Gambar 2. Skema Penelitian Kultur *In Vitro* Sarang Semut

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode percobaan laboratorium. Penelitian disusun berdasar Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan satu faktor. Perlakuan yang digunakan adalah kombinasi konsentrasi TDZ dan NAA yang terdiri dari 6 perlakuan, masing-masing perlakuan diulang 5 kali sehingga terdapat 30 unit perlakuan. Penelitian ini menggunakan medium VW (*Vacint and Went*) dengan perlakuan sebagai berikut :

T1. 0 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA

T2. 0,5 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA

T3. 1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA

T4. 0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA

T5. 0,5 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA

T6. 1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA

D. Cara Penelitian

Penelitian ini meliputi beberapa kegiatan yaitu : Sterilisasi (alat dan eksplan) pembuatan medium, inokulasi, inkubasi, pengamatan dan analisis data.

1. Sterilisasi

a. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat bertujuan untuk membersihkan alat-alat yang akan digunakan dalam proses kultur *in vitro*. Sterilisasi alat dilakukan melalui dua cara yaitu sterilisasi bakar dan sterilisasi panas basah. Sterilisasi bakar dilakukan dengan merendam alat yang digunakan dalam alkohol 70% kemudian membakar pada lampu spritus. Alat yang dibakar yaitu pinset

dan skalpel untuk inokulasi eksplan. Sterilisasi panas basah ada dua yaitu dengan penggunaan uap bertekanan dan tanpa uap bertekanan. Sterilisasi panas basah pada uap bertekanan dilakukan dengan autoklaf. Alat-alat yang digunakan untuk penanaman dicuci dengan deterjen hingga bersih kemudian disterilkan di dalam autoklaf dengan tekanan 1 atm dan suhu 121°C selama 30 menit. Alat-alat yang disterilkan adalah botol kultur, alat tanam, scalpel, aluminium foil, petridish, dan erlenmeyer. Penyeterilan LAF dilakukan dengan menyemprotkan alkohol 70% ke seluruh permukaan kemudian dilap hingga kering dan dinyalakan lampu UV selama satu jam sebelum LAF digunakan.

b. Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan bertujuan untuk menghilangkan mikroorganisme penyebab kontaminasi contohnya bakteri dan jamur. Sterilisasi eksplan dilakukan dengan cara: biji sarang semut dikeluarkan dari buahnya kemudian dibersihkan lendirnya dan dicuci dengan air mengalir selama 10 menit. Selanjutnya biji direndam dalam deterjen 2g/l selama 10 menit, setelah itu dibilas dengan air mengalir. Kemudian biji direndam dalam larutan bakterisida dan fungisida (Agrept 2 g/l + Benlate 2 g/l) selama 10 menit setelah itu dibilas dengan aquadest, kemudian eksplan dibawa ke LAF dan direndam dalam sunclin 5% selama 10 menit. Selanjutnya eksplan dibilas dengan aquadest tiga kali. Eksplan kemudian ditempatkan pada petridis yang telah diberi larutan betadin (lima tetes betadin dilarutkan

dalam 30 ml akuades steril). Eksplan kemudian siap diinokulasi dalam medium sesuai perlakuan yang dikehendaki.

2. Pembuatan medium

Pembuatan medium tanam meliputi dua tahapan yaitu :

a). Pembuatan Larutan Stok VW (*Vacin and Went*) (Lampiran 2)

Pembuatan larutan stok bertujuan untuk memudahkan dalam proses pembuatan medium tanam. Cara pembuatan larutan stok sebagai berikut :

1. Stok Makro

   Menimbang $Ca_3(PO4)_2$ =20 mg/l , KNO_3=52,50 mg/l , KH_2PO_4 = 25 mg/l , $MgSO_4$. $7H_2O$ = 25 mg/l , $(NH_4)_2.SO_4$ = 50 mg/l . Bahan yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam gelas piala berisi aquadest 50 ml dan diaduk sampai homogen. Kemudian menambahkan aquadest hingga volume 100 ml. Memberi label stok Makro 20 ml untuk membuat 1 liter medium dibutuhkan 20 ml stok Makro

2. Stok Mikro

   Menimbang $MnSO_4$. $4H_2O$ = 0,75 mg/l dan Ferri-tartrat = 28 mg/l . Bahan yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam gelas piala berisi aquadest 50 ml dan diaduk sampai homogen. Kemudian menambahkan aquadest hingga volume 100 ml. Memberi label stok Mikro 20 ml untuk membuat 1 liter medium dibutuhkan 20 ml stok Mikro

b). Pembuatan Medium VW (*Vacin and Went*)

Pembuatan medium VW untuk 30 botol perlakuan, masing-masing botol berisi sekitar 20 ml sehingga dibutuhkan 600 ml medium yang terbagi menjadi 6 perlakuan dimana setiap perlakuan berisi sebanyak 100 ml.

Semua stok dimasukkan ke dalam erlenmayer, kecuali agar dan thidiazuron. Larutan bahan digojok hingga semua bahan larut, aquadest ditambahkan hingga 80 ml. Kemudian pH larutan dicek dengan pH stik sehingga pH 6, apabila terlalu masam maka ditambahkan NaOH atau KOH 1 N, dan apabila terlalu basa maka ditambahkan HCL 1 N. Kemudian agar dimasukkan, serta aquadest ditambahkan hingga volume larutan menjadi 100 ml. Larutan media dipanaskan di atas kompor sampai larutan mendidih, setelah mendidih, erlenmeyer segera ditutup dengan plastik yang dikencangkan menggunakan karet. Medium yang telah ditutup kemudian diautoklaf selama 20 menit pada suhu 121^0C dan bertekanan 1 atm.

Thidiazuron tidak disterilisasi dalam autoklaf karena bersifat termolabil sehingga sterilisasi dilakukan dengan metode sterilisasi filter. Thidiazuron dilarutkan dengan konsentrasi diukur sesuai perlakuan(0 mg/l , 0,5 mg/l , 1 mg/l) dan aquadest ditambahkan hingga volume 10 ml. Kemudian ditutup dengan plastik yang dikencangkan menggunakan karet, selanjutya stok Thidiazuron dibawa ke dalam *Laminar Air Flow.*

Cara sterilisasi stok thidiazuron dilakukan menggunakan milipore yang berukuran 0,2 μm yang telah disterilisasi dan *syringe* tanpa jarum. Larutan Thidiazuron diambil sesuai dengan perlakuan (0 mg/l , 0,5 mg/l , 1

mg/l) dengan syringe yang telah dilabel sebelumnya untuk mencegah tertukarnya *syringe* larutan Thidiazuron, kemudian *milipore* dipasang. Pemasangan *milipore* jangan sampai tersentuh oleh tangan dan diletakkan dalam petridish. Larutan Thidiazuron dimasukkan secara bergantian ke dalam erlenmeyer berisi larutan medium dengan menyuntik tegak lurus tanpa menyentuh mulut erlenmeyer. Medium digojok hingga homogen. Kemudian larutan dituang ke dalam botol kultur masing-masing sebanyak 20 ml. Botol kultur ditutup dengan alumunium foil dan plastik yang dikencangkan menggunakan karet.

3. Inokulasi

Penanaman dilakukan dalam *laminar air flow cabinet* yang telah dibersihkan dengan alkohol 70% dan disinari dengan ultraviolet selama 60 menit. Alat tanam yang digunakan harus steril. Pisau dan pinset dimasukkan ke dalam botol berisi alkohol dan sebelum digunakan dibakar dahulu dan setelah dingin dimasukkan kembali ke dalam alkohol. Eksplan yang digunakan adalah biji sarang semut, eksplan kemudian ditanam pada medium VW

4. Inkubasi

Eksplan yang telah diinokulasi diinkubasi selama 8 minggu dalam ruang inkubasi dengan suhu 23^0-25^0 C dengan pencahayaan lampu TL 40 watt selama 24 jam, selama 16 minggu. Eksplan selanjutnya diamati berdasarkan parameter yang digunakan.

E. Parameter yang diamati

Beberapa parameter diamati dalam penelitian ini, yaitu :

1. Persentase Eksplan Hidup (%)

   Eksplan yang hidup diamati setiap minggu selama 16 minggu. Kriteria eksplan hidup adalah tidak terdapat adanya jamur dan bakteri dan tidak mengalami pencoklatan lebih dari separuh eksplan. Persentase eksplan hidup dihitung pada akhir pengamatan dengan rumus :

   $$\textit{Persentase eksplan hidup} = \frac{\textit{Jumlah eksplan yang hidup}}{\textit{Jumlah eksplan tiap perlakuan}} \text{ x } 100\%$$

2. Persentase Eksplan kontaminasi (%)

   Eksplan yang terkontaminasi dihitung setiap hari selama 16 minggu, eksplant terkontaminasi apabila terdapat jamur dan bakteri didalam medium kultur dan dinyatakan dalam persen. Persentase kontaminasi dihitung diakhir pengamatan berdasarkan rumus

   $$\text{Persentase eksplan kontaminasi} = \frac{\textit{Jumlah eksplan kontaminasi}}{\textit{Jumlah eksplan tiap perlakuan}} \text{x} 100\%$$

3. Persentase Eksplan *Browning* (%)

   Eksplan yang mengalami *browning* diamati setiap minggu sekali selama 16 minggu. Kriteria eksplan yang *browning* adalah eksplan yang mengalami pencoklatan lebih dari 50%. Persentase *browning* dihitung dengan rumus :

   $$\textit{Persentase eksplan browning} = \frac{\textit{Jumlah eksplan yang Browning}}{\textit{Jumlah eksplan tiap perlakuan}} \text{ x } 100\%$$

4. Saat muncul tunas

Munculnya tunas diamati saat (hari keberapa) terbentuk tunas dan diamati setiap hari selama 16 minggu, selanjutnya pada akhir pengamatan dilakukan perhitungan.

5. Persentase Ekspalan Bertunas(%)

Pengamatan dilakukan dengan melihat tunas yang terbentuk pada setiap perlakuan. Dilakukan setiap minggu sekali selama 16 minggu dan dinyatakan dalam persen. Rumus persentase tunas sebagai berikut :

$$\text{Persentase eksplan bertunas} = \frac{Jumlah\ eksplan\ bertunas}{Jumlah\ eksplan\ tiap\ perlakuan} \text{x}100\%$$

6. Tinggi Tunas

Tinggi tunas diukur mulai dari pangkal sampai pucuk tiap minggu sekali selama 16 minggu dengan satuan sentimeter. Tunas diukur tingginya adalah tunas paling tinggi

7. Jumlah Tunas Tiap Perlakuan

Jumlah tunas yang terbentuk diamati pada masing-masing botol, pengamatan dilakukan tiap minggu sekali selama 16 minggu.

8. Jumlah Daun

Pengamatan dilakukan pada tiap botol dengan menghitung banyaknya daun yang terbentuk. Dilakukan seminggu sekali selama 16 minggu, kriteria daun yang dihitung adalah daun yang sudah membuka.

9. Warna Tunas

Warna tunas diamati secara visual setiap minggu selama 16 minggu dengan menggunakan *Munssel Plant Tissue Coloure Chart.*

10. Saat Eksplan Berakar

Munculnya akar diamati saat (hari keberapa) terbentuk akar dan diamati setiap hari selama 16 minggu, selanjutnya pada akhir pengamatan dilakukan perhitungan.

11. Persentase Eksplan Berakar

Pengamatan dilakukan dengan melihat akar yang terbentuk pada setiap perlakuan. Dilakukan setiap minggu sekali selama 16 minggu dan dinyatakan dalam persen. Rumus persentase tunas sebagai berikut :

$$\text{Persentase eksplan bertunas} = \frac{Jumlah\ eksplan\ berakar}{Jumlah\ eksplan\ tiap\ perlakuan} \text{x}100\%$$

12. Jumlah Akar

Pengamatan dilakukan pada tiap botol dengan menghitung banyaknya akar yang terbentuk. Dilakukan seminggu sekali selama 16 minggu, kriteria akar yang dihitung adalah akar yang sudah tumbuh dari eksplan

F. Analisis Data

Data hasil pengamatan perbanyakan tunas sarang semut secara *in vitro* kemudian diolah dan dianalisis dengan sidik ragam pada taraf kesalahan $\alpha = 5\%$, dan apabila berbeda nyata dilanjutkan uji lanjut dengan Uji Jarak Duncan (DMRT) dengan taraf kesalahan $\alpha = 5\%$. Hasil olah data disajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan software SAS 6.1.2