

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Benih Industri dan Hortikultura, Salaman, Magelang dan berlangsung dari bulan Juli 2004 sampai dengan Maret 2005.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### a. Alat

Alat-alat yang digunakan terdiri dari : alat-alat gelas (gelas Beaker, gelas ukur, labu Erlenmeyer, cawan petri, batang pengaduk, pipet dan botol kultur), alat-alat logam (skalpel dan pinset), *Laminair Air Flow Cabinet* (LAF), timbangan digital, alat sterilisasi (otoklaf, oven, lampu spirtus, dan penyemprot alkohol (*hand sprayer*)), pH meter, lemari pendingin, kamera, saringan, higrometer, termometer, lampu fluorescent & lampu UV, kertas label, kertas payung, *hot plate stirrer*, *magnetic stirrer*, kertas *tissue*, korek api, aluminium foil, plastik wrap, sarung tangan karet, masker, *cutter* dan sikat gigi.

##### b. Bahan :

Bahan-bahan kimia yang digunakan terdiri dari : larutan stok A, B, C, D, E, F dari medium MS; larutan stok mio inositol; larutan stok glisin; larutan stok NAA; larutan stok BAP; akuades steril; agar; larutan vitamin; bahan sterilisasi

yaitu larutan fungisida Dithane M-45 2 g/L; larutan bakterisida Agrept 2 g/L; alkohol 70%; spirtus; detergen cair; larutan Na hipoklorit (pemutih) 20%, 10% dan 5%; larutan antiseptik (Betadine) 0,3 ppm serta bahan buffer pH (KOH 0,1 N dan HCl 0,1 N).

Eksplan yang digunakan berupa mata tunas yang diambil dari rimpang kunyit putih (*Curcuma zedoaria* Berg.) berumur lebih dari 9 bulan. Rimpang tersebut diperoleh dari salah seorang penjual jamu serbuk di daerah Taru Budaya, Ungaran, Jawa Tengah.

### 3.3 Cara Kerja

#### a. Sterilisasi Alat

Alat-alat *dissecting set* (skalpel dan pinset) dan alat-alat dari gelas dicuci dengan detergen dan dibilas dengan air bersih beberapa kali kemudian dikeringanginkan. Setelah kering, alat-alat gelas, alat-alat logam dan cawan petri dibungkus dengan kertas payung, kemudian disterilkan dalam otoklaf dengan suhu 121<sup>0</sup>C tekanan 1,5 atm selama 1 jam. Khusus alat-alat *dissecting set* (skalpel dan pinset) disterilisasi terlebih dahulu dengan alkohol 70% dan dibakar dengan nyala api spirtus setiap kali akan digunakan di dalam LAF (Gunawan, 1995).

#### b. Pembuatan Media Kultur MS (Murashige & Skoog)

Pembuatan media MS diawali dengan pembuatan larutan stok terlebih dahulu (Lampiran 4 ). Langkah selanjutnya yaitu pembuatan media untuk setiap perlakuan. Untuk pembuatan 1 liter media, dimasukkan sukrosa sesuai perlakuan ke dalam gelas Beaker volume 1 liter kemudian ditambahkan akuades sebanyak

250 mL lalu diaduk sampai sukrosa larut seluruhnya. Satu per satu larutan stok A dan B sebanyak 10 mL; larutan stok C, D, E, dan F sebanyak 5 mL; larutan stok vitamin sebanyak 4 mL; larutan mio inositol sebanyak 5 mL; dan larutan stok glisin sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam gelas Beaker yang tadi telah berisi larutan sukrosa. Larutan yang diperoleh ditambah dengan 4 mL larutan stok BAP (konsentrasi 4 ppm) dan 1 mL larutan stok NAA (konsentrasi 1 ppm) (Lampiran 3) lalu ditambah akuades hingga volume larutan mendekati 1 liter. Keasaman larutan diatur pada pH 5,8 dengan menggunakan pH meter, jika pH kurang dari 5,8 maka ditambahkan larutan KOH 0,1 N dan jika lebih dari 5,8 maka ditambahkan larutan HCl 0,1 N. Larutan ditambah dengan agar sebanyak 7 gram dan arang aktif sebanyak 3 gram. Larutan media dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk, kemudian diangkat. Media dituang ke dalam botol kultur masing-masing sebanyak 20 mL (1 liter media dituang ke dalam 50 botol kultur). Setiap botol kultur ditutup dengan tutup botol dari plastik (Gunawan, 1995).

### c. Sterilisasi Media

Media dalam setiap botol kultur disterilisasi dengan cara diotoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dan tekanan 1,5 atm selama 25 menit. Pengotoklavan diawali dengan pengisian air pada panci luar otoklaf sebanyak 1,5 - 2 liter. Media yang akan disterilkan disusun di dalam panci dalam. Otoklaf ditutup rapat, katup uap dibiarkan pada posisi terbuka. Otoklaf dipanaskan dengan api kompor hingga media di dalamnya mendidih. Uap yang keluar dari katup uap dibiarkan keluar selama 5 - 7 menit agar udara yang terperangkap di dalam otoklaf ikut keluar. Katup uap ditutup. Tekanan dibiarkan naik terus sampai 1,5 atm. Setelah tekanan

tercapai, api kompor dikecilkan. Tekanan dipertahankan dengan cara mengatur nyala api kompor. Setelah 25 menit, kompor dimatikan. Tekanan dibiarkan menurun secara perlahan-lahan. Setelah jarum penunjuk tekanan mencapai angka 0, barulah katup uap dibuka sedikit demi sedikit untuk mengeluarkan sisa-sisa uap hingga habis lalu tutup otoklaf dibuka. Media didinginkan pada suhu ruangan selama 2 - 3 hari untuk melihat masih adanya kemungkinan kontaminan (Gunawan, 1995).

#### d. Sterilisasi Ruang Tanam

Ruang tanam dibersihkan dengan sapu dan dipel dengan cairan pembersih. Sterilisasi dengan sinar UV dilakukan selama 1 jam sebelum LAF digunakan. Setelah sinar UV dimatikan, lampu dan blower di dalam LAF dinyalakan dalam kondisi maksimal lalu disemprot dengan alkohol 70%. Alkohol dikeringkan dengan dilap menggunakan kapas. Alat-alat yang akan dimasukkan ke dalam LAF harus disemprot dengan alkohol 70% terlebih dahulu. Setelah alkohol benar-benar kering, alat-alat dimasukkan ke dalam LAF. LAF telah siap digunakan. LAF dihidupkan baik sebelum digunakan, saat digunakan, maupun sesudah digunakan yaitu dengan menghidupkan *blower* (modifikasi Gunawan, 1995).

#### e. Pencucian Rimpang

Rimpang kunyit putih yang diperoleh dari penjual, segera dikeluarkan dari karung dan masukkan ke dalam bak yang berisi air sampai seluruh rimpang terendam. Tanah dan kotoran-kotoran yang menempel di permukaan rimpang dibersihkan dengan sikat di dalam air. Pencucian diulang sebanyak 2 kali.

Rimpang yang sudah bersih dicelupkan ke dalam larutan campuran fungisida Dithane M-45 dan bakterisida Agrept lalu dikeringanginkan. Rimpang disusun ke dalam keranjang yang sudah diberi alas kertas agar mata tunas rimpang tidak segera bertambah tinggi dan hijau (modifikasi Syukur, 2004).

f. Persiapan Eksplan

Rimpang kunyit putih yang telah mempunyai tonjolan-tonjolan tunas, diambil dan dipotong dengan ukuran sekitar 1 cm<sup>3</sup>. Kulitnya dibersihkan dari kotoran dengan cara dicuci dan disikat di dalam air kemudian direndam dengan larutan deterjen cair selama 1jam kemudian dibilas di bawah air bersih mengalir sebanyak 3 kali. Potongan rimpang direndam dalam botol kultur steril dengan menggunakan akuades steril sampai siap sterilisasi berikutnya di dalam LAF (modifikasi Gunawan, 1995).

g. Sterilisasi Eksplan

Langkah-langkah sterilisasi eksplan diawali dengan pembuatan larutan Natrium hipoklorit (pemutih) 20 %. Larutan Natrium hipoklorit (pemutih) 20 % dibuat dengan cara larutan Natrium hipoklorit sebanyak 10 mL dituang ke dalam gelas ukur volume 50 mL, ditambahkan akuades steril sampai volume 50 mL lalu dituang ke dalam botol kultur steril yang kosong. Eksplan diambil dari rendaman akuades, dimasukkan ke dalam larutan pemutih 20 % dan direndam selama 7 menit. Sambil menunggu waktu rendaman eksplan di larutan Natrium hipoklorit 20 %, dibuat larutan pemutih 10 % dengan cara larutan Natrium hipoklorit sebanyak 5 mL dituang ke dalam gelas ukur volume 50 mL, ditambahkan akuades steril sampai volume 50 mL lalu dituang ke dalam botol kultur steril yang kosong.

Setelah 7 menit, eksplan dipindah ke larutan Natrium hipoklorit 10 % dan direndam selama 10 menit. Sambil menunggu waktu rendaman eksplan di larutan Natrium hipoklorit 10 %, dibuat larutan Natrium hipoklorit 5 % dengan cara larutan Natrium hipoklorit sebanyak 2,5 mL dituang ke dalam gelas ukur volume 50 mL, ditambahkan akuades steril sampai volume 50 mL lalu dituang ke dalam botol kultur steril yang kosong. Setelah 10 menit, eksplan dipindah ke larutan Natrium hipoklorit 5 % dan direndam selama 15 menit. Sambil menunggu waktu rendaman eksplan di larutan Natrium hipoklorit 5 %, dituang akuades steril ke dalam 5 botol kultur steril yang kosong, masing-masing sebanyak 50 mL. Salah satu akuades dalam botol kultur tersebut, ditambah dengan 6 tetes larutan antiseptik lalu digoyang-goyangkan sampai warna larutan merata. Setelah 15 menit, eksplan dipindah ke akuades steril yang sebelumnya telah disiapkan dalam botol kultur dan direndam selama 5 menit. Setelah 5 menit, eksplan dipindah ke larutan antiseptik yang sebelumnya telah disiapkan dalam botol kultur dan direndam selama 2 - 3 menit. Setelah 2 - 3 menit, eksplan dipindah ke 3 botol kultur berisi akuades steril lain yang sebelumnya telah disiapkan dan direndam selama 5 menit secara berturutan (modifikasi Gunawan, 1995).

#### h. Penanaman dan Pemeliharaan Eksplan

Eksplan ditanam pada media, tiap botol berisi 1 eksplan lalu setelah botol kultur ditutup dengan tutup botol dari plastik dan dilapisi dengan plastik wrap sampai betul-betul rapat. Eksplan yang telah ditanam kemudian diinkubasi pada suhu 23 - 24<sup>0</sup>C dan kelembaban 30 dengan penyinaran 16 jam per hari

dengan penyinaran lampu tabung *fluorescens* 40 Watt berintensitas 1.000 Lux (Gunawan, 1995).

i. Pengamatan

Pengamatan dilakukan setiap hari sampai 1 bulan pengamatan. Jika terdapat eksplan yang terkontaminasi (jamur dan atau bakteri), segera disingkirkan dari ruang inkubasi (Gunawan, 1995).

j. Pengukuran Parameter

Tunas hasil inkubasi, diambil dari dalam botol dengan menggunakan pinset dan diletakkan di cawan petri steril. Bagian bawah tunas dibersihkan dari sisa-sisa media yang masih menempel. Tunas dibilas dalam akuades steril sambil digoyang-goyangkan sampai bersih lalu diletakkan di atas kertas saring steril. Berat basah diperoleh dari penimbangan tunas yang sudah bersih dari sisa-sisa akuades, menggunakan timbangan digital dengan pengulangan masing-masing sebanyak 3 kali ulangan. Berat kering diperoleh dari penimbangan seluruh tunas yang sudah dikeringkan di dalam oven pada suhu 70 – 80°C sampai diperoleh berat konstan, dengan pengulangan masing-masing sebanyak 3 kali ulangan (George & Sherrington, 1984).

### 3.4 Parameter

Pada penelitian ini parameter yang diamati adalah :

1. berat basah tunas, diperoleh dengan menimbang tunas pada akhir pengamatan dalam keadaan segar

2. berat kering tunas, diperoleh dengan menimbang tunas pada akhir pengamatan dalam keadaan kering
3. jumlah tunas, diperoleh dengan menghitung jumlah tonjolan tunas yang muncul dari eksplan setelah masa inkubasi

### 3.5 Rancangan Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan faktor tunggal yaitu kadar sukrosa dalam medium kultur jaringan dengan kadar 1% (S1), 2% (S2), 3% (S3), 4% (S4), dan 5% (S5) (g/L) (Gomez & Gomez, 1995). Masing-masing perlakuan dilakukan 5 kali pengulangan.

Data yang diperoleh dianalisa dengan Sidik Ragam pada taraf signifikansi 95%, jika terdapat perbedaan antar perlakuan kemudian dilanjutkan dengan Uji Duncan pada taraf signifikansi 95% (Gomez & Gomez, 1995).

