

media, *disecting set*, pengaduk magnetik, timbangan analitik, alat-alat gelas, *sentrifuge* dan tabung *sentriuge*, *milipore filter* ukuran 0,22 μm , *nylon mesh* ukuran 100 μm , mikroskop cahaya, kertas pH, *micrometer*, *hemocytometer*, *counter*, *aluminium foil*, *shaker*.

3. Cara Kerja

a. Sterilisasi eksplan

Diambil daun pegangan, disterilisasi selama 10 menit dengan cara direndam dalam 10% bayclin, dibilas 3 kali dengan H_2O steril.

b. Isolasi dan purifikasi sel

Daun yang telah disteril diletakkan di atas cawan petri, secara hati-hati epidermis bawah daun tersebut dibuang demikian juga tulang daunnya, kemudian dipotong-potong dengan lebar ± 1 mm. Potongan daun tersebut dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 25 ml yang mengandung medium maserasi selama 30 detik. Medium maserasi lama dibuang dan diganti dengan medium maserasi yang baru dan diinkubasikan selama 20 menit dengan pengaduk magnetic dengan kecepatan rendah. Untuk membuang sisa atau fragmen yang tidak tercerna dipergunakan nylon filter, kemudian dicuci dengan medium pencuci dengan cara disentrifugasi (pada skala 1) selama 10 menit dan diulangi 3 kali. Pelet yang didapat, diamati viabilitasnya (dengan larutan 0,2% fenosafranin). Dihitung jumlah sel dengan menggunakan $= 5n \cdot 10^4$ per ml, dimana n = jumlah sel dalam triple line square (Suryowinoto, 1996). Bila sebagian besar kultur mengandung gumpalan-gumpalan sel (agregat) dengan berbagai ukuran sehingga sulit untuk diketahui jumlah sel-selnya maka ditambahkan chromic trioxide dan dipanaskan 70°C untuk beberapa waktu (2 – 15 menit).

HASIL DAN DISKUSI

1. Perlakuan Perbedaan Lama Inkubasi dan Kecepatan Stirer

Hasil analisis menunjukkan bahwa lama inkubasi dan kecepatan *stirer* berpengaruh nyata ($p > 0.05$) terhadap perolehan jumlah sel viabel mesofil pegangan. Data perolehan jumlah sel disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rerata perolehan jumlah sel viabel dengan perlakuan perbedaan lama inkubasi dan kecepatan stirer setelah ditransformasi dengan Ln.

Kecepatan <i>Stirrer</i> (rpm)	Lama Inkubasi (menit)			
	10	15	20	25
300	99,02a	98,39a	98,72a	97,87a
600	98,98a	99,17a	98,82a	98,10a

Keterangan: Angka yang diikuti huruf kecil yang sama pada kolom/baris tidak berbeda nyata pada taraf uji 5%.

Berdasarkan data dari tabel 1 dapat diketahui bahwa pada lama inkubasi dalam medium maserasi selama 15 menit dengan kecepatan stirer 300 dan 600 rpm menghasilkan jumlah sel viabel yang tinggi. Medium maserasi merupakan medium yang berisi berbagai senyawa kimia dan *macerozyme* yang dapat mendegradasi lamela tengah dari dinding sel karena mempunyai aktivitas pektinase dan hemiselulase tinggi. Lama inkubasi 15 menit menghasilkan jumlah sel yang paling tinggi karena kemungkinan waktu tersebut merupakan waktu yang paling efektif bagi medium maserasi untuk masuk ke dalam ruang antar sel dan *macerozyme* telah mendegradasi lamela tengah dari dinding sel, sehingga sel akan terpisah satu sama lain.

Jumlah sel viabel yang diperoleh pada lama inkubasi 15 menit dengan kecepatan stirer 600 rpm perolehan jumlah sel viabel lebih banyak dibanding kecepatan stirer 300 rpm. Hal ini kemungkinan karena pada kecepatan stirer 600 rpm putaran stirer yang lebih cepat akan membantu memisahkan sel dari jaringannya sehingga jumlah sel yang diperoleh lebih banyak. Perolehan jumlah sel dengan waktu inkubasi yang semakin lama hasilnya semakin menurun. Hal ini disebabkan kemungkinan enzim merusak dinding sel sehingga cairan diluar sel (medium maserasi) dapat masuk ke dalam sel dan dapat menyebabkan kerusakan sel. Menurut Bhojwani & Razdan (1982), *macerozyme* yang digunakan untuk isolasi sel tidak hanya mendegradasi lamela tengah tetapi juga akan memperlemah struktur dinding sel. Ditambahkan oleh Hadisantoso (1988), pelepasan sel-sel dari sel lainnya bervariasi untuk setiap spesies. Beberapa sel toleran terhadap waktu inkubasi yang lama, tetapi ada sel yang protoplasnya rusak karena terlalu lama waktu inkubasinya.

Viabilitas sel yang tinggi merupakan salah satu syarat kultur suspensi sel. Hasil analisa viabilitas sel dengan perlakuan kecepatan stirer dan lama inkubasi disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Rerata viabilitas sel mesofil pegangan dengan perlakuan perbedaan lama inkubasi dan kecepatan stirer (%).

Kecepatan <i>Stirrer</i> (rpm)	Lama Inkubasi (menit)			
	10	15	20	25
300	0,78.10 ⁷ c	0,88.10 ⁷ abc	0,53.10 ⁷ d	0,32.10 ⁷ f
600	0,98.10 ⁷ a	0,99.10 ⁷ a	0,80.10 ⁷ bc	0,49.10 ⁷ de

Keterangan: Angka yang diikuti huruf kecil yang sama pada kolom/baris tidak berbeda nyata pada taraf uji 5%.

Berdasarkan hasil analisis ANOVA menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh perlakuan perbedaan lama inkubasi dan kecepatan stirer terhadap viabilitas sel.