

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung pada November 2014 sampai April 2015.

3.2 Metode Penelitian

Percobaan ini dilaksanakan menggunakan rancangan teracak lengkap, dengan 8 perlakuan yang dicobakan. Empat taraf konsentrasi TDZ, yaitu 0,01; 0,02 ; 0,04 dan 0,08 mg/l dengan dan tanpa BA 5 mg/l. Masing-masing dari perlakuan tersebut ditambahkan ke dalam media dasar MS (Murashige dan Skoog, 1962). Setiap perlakuan terdiri dari 3 ulangan, setiap ulangan terdiri dari 2 botol kultur. Setiap botol terdiri atas satu eksplan.

Pada penelitian ini, data akan diolah menggunakan *Standar Error (SE)*

menggunakan rumus
$$SE = \pm \sqrt{\frac{\sum(xi)^2 - \frac{(\sum xi)^2}{n}}{n(n-1)}}$$

(Walpole, 1997)

3.3 Pelaksanaan Penelitian

3.3.1 Sterilisasi Alat

Semua alat yang akan digunakan dalam kegiatan kultur jaringan harus berada dalam kondisi aseptik. Sterilisasi botol sebagai tempat kultur merupakan langkah pertama yang harus dilakukan. Sterilisasi botol dilakukan dalam 2 tahapan. Tahap 1, botol hasil kultur sebelumnya disterilisasi menggunakan autoklaf *Budenberg* (Gambar 2a) selama 30 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Selanjutnya botol dicuci dengan menghilangkan sisa media tanam sebelumnya dan direndam dalam air yang telah dicampur detergen (± 10 g) dan 5 tutup botol (± 50 ml) desinfektan selama 1 malam. Tahap 2, (Gambar 3) botol yang sudah direndam dicuci bersih seluruh bagiannya dan kertas label yang tertera pada botol dihilangkan. Botol yang sudah bersih dibilas menggunakan air mengalir lalu direndam air panas selama 30 menit. Botol hasil rendaman kemudian ditiriskan dan ditutup dengan plastik menggunakan karet. Sterilisasi tahap akhir dilakukan menggunakan autoklaf Tomy (Gambar 4) selama 30 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

Selain botol, alat-alat yang digunakan dalam kegiatan kultur juga perlu disterilisasi. Alat yang digunakan berupa alat diseksi (pinset dan scapel), cawan petri, keramik, botol *schout*, kapas, dan gelas ukur. Alat diseksi, cawan petri, dan keramik dibungkus menggunakan kertas lalu dimasukkan ke dalam plastik tahan panas. Botol *schout* diisi $\frac{3}{4}$ air sebagai persiapan untuk air steril. Kapas bersih dimasukkan ke dalam botol kultur steril. Gelas ukur diberi penutup pada bagiannya mulutnya menggunakan kertas alumunium foil. Seluruh alat

disterilisasi menggunakan autoklaf *Tomy* selama 30 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm.



Gambar 2. Autoklaf *Budenberg* (a), dan desinfektan yang digunakan (b)



Gambar 3. Botol yang direndam 1 malam dalam detergen dan desinfektan(a), botol bersih (b), alat diseksi, kapas dan air yang akan distrerilisasi (c)



Gambar 4. Autoklaf *tomy*

3.3.2 Pembuatan Media Kultur

Sebelum dilakukan pembuatan media, semua alat gelas dan nongelas (gelas beaker ukuran 2 l, 1 l, dan 500 ml; gelas ukur ukuran 25 ml, 100 ml, 800 ml, dan 2000 ml; pipet tetes; labu ukur 500 ml dan 1000 ml; magnet; pinset; spatula; dan panci enamel) yang akan digunakan dibilas dengan menggunakan aquades terlebih dahulu.

Terdapat 2 jenis media yang digunakan pada penelitian ini, yaitu media prekondisi dan media perlakuan. Kedua media tersebut menggunakan media dasar yang mengandung garam-garam MS (Murashige and Skoog, 1962), mio-inositol 100mg/l, thiamin-HCl 0,1 mg/l, piridoksin-HCl 0,5 mg/l, asam nikotinat 0,5mg/l dan sukrosa 30 mg/l. Media prekondisi berisi garam-garam MS (tertera pada Tabel1 di lampiran), 3 mg/l 2,4-D, *casein hydrolysate* 500mg/l, 150 ml/l coconut water . Komposisi media prekondisi berbeda dengan media perlakuan. Media perlakuan berisi garam-garam MS (tertera pada Tabel 1 di lampiran) dengan ditambahkan *thidiazuron* (TDZ) dan benziladenin (BA) sesuai

dengan konsentrasi masing-masing. Media prekondisi ditujukan untuk memacu pembelahan sel, media perlakuan ditujukan untuk pembentukan tunas.

Pembuatan media dilakukan dengan melarutkan garam-garam MS, 50 mg/l asam sitrat, 150 mg/l asam askorbat, BA, TDZ, dan 30 g/l sukrosa hingga homogen.

Penghomogenan larutan dilakukan menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan yang telah homogen ditera dengan aquades menggunakan labu ukur 1 l (untuk pembuatan 1 l media). Setelah itu, larutan kembali dihomogenkan lalu pH larutan media ditetapkan menjadi 5,8 menggunakan pH meter. Penetapan pH dilakukan dengan menambahkan beberapa tetes KOH 1 N jika pH kurang dari 5,8 dan menambahkan beberapa tetes HCl 1 N jika pH lebih dari 5,8. Selanjutnya larutan media dimasukkan ke dalam panci enamel yang telah berisi 8 g/l agar-agar.

Larutan media dimasak hingga mendidih. Selama proses memasak, pengadukan terus dilakukan supaya larutan media dan agar-agar tercampur rata. Sebanyak 25-30 ml media dituangkan ke dalam botol kultur steril lalu ditutup menggunakan plastik, diikat dengan karet, dan diberi label sesuai dengan komposisi media.

Untuk 1 l media dibutuhkan kurang lebih 30 botol kultur steril.

Larutan media kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf Tomy selama 7 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Setelah sterilisasi berakhir, media dikeluarkan dari autoklaf, didiamkan hingga dingin, lalu disimpan dalam ruang kultur.

3.3.3 Bahan Tanaman

Sansevieria yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Sansevieria masoniana*. Bahan tanam yang digunakan berupa eksplan daun. Eksplan daun didapatkan dari Ibu Yusnita yang dibeli dari penjual bunga di Gunung Terang. Pengambilan eksplan daun dilakukan dengan memotong bagian pangkal daun dengan menggunakan pisau tajam. Daun yang digunakan yaitu daun baru yang sudah membuka sempurna (*fully expanded leaf*). Daun yang sudah diambil kemudian dibawa ke Laboratorium Kultur Ilmu Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.

3.3.4 Sterilisasi dan Penanaman Eksplan

Sterilisasi permukaan eksplan dilakukan di ruang persiapan dan ruang tanam laboratorium Kultur Jaringan. Eksplan daun dicuci bersih dengan deterjen (Gambar 5a), berulang kali hingga permukaannya bebas dari kotoran dan kesat, selanjutnya daun dipotong- potong lalu dimasukkan ke dalam botol steril (Gambar 5b,c).

Sterilisasi dilakukan di dalam *Laminar Air Flow Cabinet* (L AFC) dengan menggunakan larutan etanol 80% eksplan daun tersebut permukaannya dioles dengan etanol untuk merusak kutikula yang ada sehingga saat sterilisasi dengan larutan desinfektan, larutan tersebut dapat mensterilkan eksplan secara maksimal. Selanjutnya eksplan disterilisasi menggunakan larutan desinfektan. Desinfektan yang digunakan mengandung bahan aktif 5,25% NaOCl. Pembuatan larutan desinfektan 20% dilakukan dengan melarutkan 20 ml larutan desinfektan ke dalam 80 ml air steril. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam botol steril yang

telah berisi eksplan daun kemudian ditambahkan cairan Tween-20 sebanyak 2 tetes/100 ml.

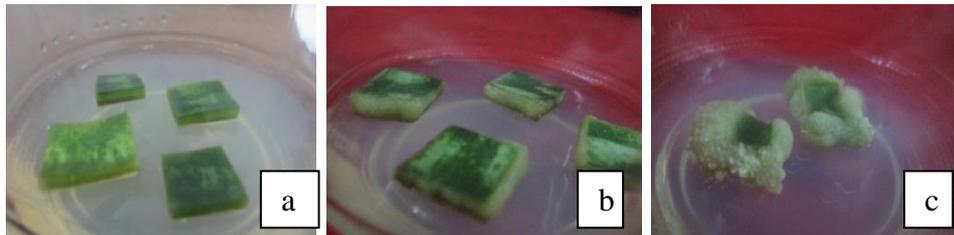
Eksplan dalam larutan desinfektan ini dikocok (Gambar 5c) selama 10 menit, lalu dibilas dengan air steril hingga bersih (± 3 kali). Eksplan steril dipotong dengan ukuran 1x1 cm, ditanam 4 eksplan per botol ke dalam media induksi kalus, yaitu MS + 2,4-D 3 mg/l selama 4 minggu (Gambar 5e,f).



Gambar 5. Daun *S.masoniana* dicuci dengan sabun (a), daun dipotong berbentuk segiempat (b), sterilisasi dengan larutan klorok 20% (c), dikocok tangan selama 10 menit (d), daun steril dipotong 1x1 cm (e), dan pelabelan botol kultur (f)

3.3.6 Subkultur ke Media Perlakuan

Subkultur ke media perlakuan dilakukan 4 minggu setelah tanam. Pada tahapan ini, eksplan yang sudah membentuk kalus diseleksi keseragamannya dan dipindahkan ke media perlakuan untuk percobaan ini. Kenampakan eksplan dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Perkembangan eksplan pada media prekondisi 0 MST (a), 2 MST (b) dan 4 MST (c)

3.3.7 Pengamatan

Pengamatan eksplan dilakukan pada akhir penelitian. Variabel yang diamati adalah sebagai berikut.

1. Jumlah eksplan membentuk propagul. Propagul adalah mata tunas dan tunas yang merupakan bahan tanaman hasil regenerasi dari eksplan (Gambar 7).
2. Rata - rata jumlah propagul per eksplan.



Gambar 7. Kumpulan mata tunas yang telah menjadi tunas eksplan *S. masoniana* pada 18 MST

Keterangan : lingkaran kuning menunjukkan tunas dan lingkaran biru menunjukkan mata tunas