

### **III. BAHAN DAN METODE**

#### **3.1 STUDI 1: REGENERASI TANAMAN TEBU (*Saccharum officinarum* L.) DARI KALUS YANG TIDAK DIIRADIASI SINAR GAMMA**

Studi ini terdiri dari 3 percobaan yaitu :

1. Percobaan 1: Pengaruh konsentrasi 2,4-D terhadap proliferasi kalus.
2. Percobaan 2: Respons klon tebu terhadap media induksi kalus.
3. Percobaan 3: Pengaruh konsentrasi IBA terhadap pengakaran tunas tebu dan daya hidup kalus pada waktu diaklimatisasi.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Tanaman, Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

##### ***3.1.1 Percobaan 1 : Pengaruh Konsentrasi 2,4-D terhadap Proliferasi Kalus***

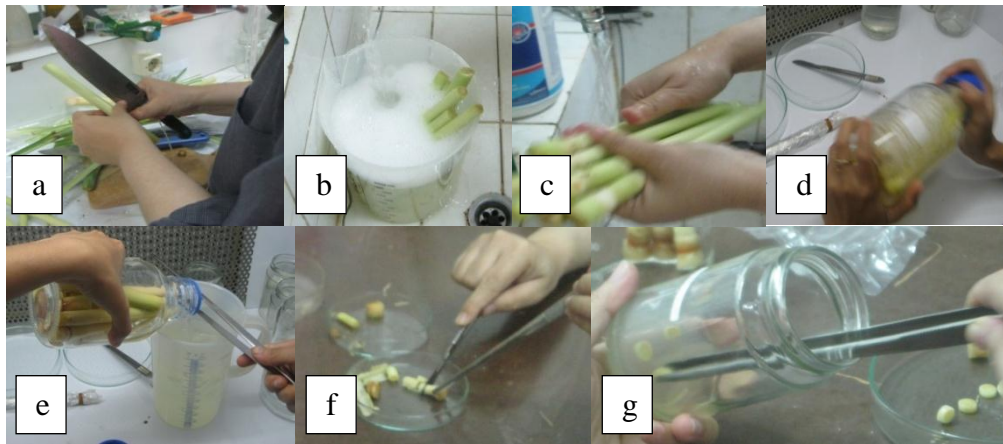
###### **3.1.1.1 Bahan Tanaman**

Tanaman yang digunakan dalam percobaan ini adalah tanaman tebu klon Ragnar yang diperoleh dari PT Gunung Madu Plantations (PT GMP), Lampung. Eksplan yang digunakan adalah gulungan daun muda (*leafroll*). Cara pengambilan eksplan dilakukan sebagaimana dilaporkan oleh Mayang (2011). Pengambilan eksplan

dari lahan dilakukan dengan cara mengambil batang tanaman bagian atas sepanjang  $\pm$  1 meter. Potongan batang kemudian dibersihkan dari pelepah daunnya, selanjutnya bagian pangkal batang direndam dengan larutan fungisida Dithane M 45 sebanyak 2 g/l selama 60 menit. Setelah itu batang tebu tersebut dipotong kembali hingga panjangnya 13—15 cm. Eksplan yang digunakan berupa potongan gulungan daun muda pada pucuk tanaman tebu bagian terdalam.

#### 3.1.1.2 Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi batang tebu dilakukan dengan 2 tahap yaitu sterilisasi luar dan sterilisasi dalam. Sterilisasi luar dilakukan dengan membuang pelepah daun terluar secara hati-hati dan selanjutnya dicuci dengan detergen hingga bersih kemudian dibilas dengan air mengalir. Setelah itu dilakukan sterilisasi di dalam LAFC (*laminar air flow cabinet*) dengan cara mengupas pelepah daun sampai pada daun termuda hingga batang berdiameter 0,5—1 cm kemudian direndam ke dalam *ethanol* 70% selama  $\pm$  30 detik. Setelah itu eksplan direndam ke dalam larutan *Bayclin* (mengandung 5,25% sodium hipoklorit) 25 % dan *Tween* 20 sebanyak 5 tetes dikocok perlahan selama 10 menit. Kemudian eksplan direndam kembali dengan *Bayclin* (mengandung 5,25% sodium hipoklorit) 15 % *Tween* 20 sebanyak 5 tetes dikocok perlahan selama 10 menit. Selanjutnya eksplan dibilas dengan air steril hingga 3 kali dan eksplan siap untuk dipotong-potong kemudian ditanam pada media induksi kalus.



Gambar 1. Tahap sterilisasi eksplan. (a) pengupasan pelepah daun, (b) perendaman eksplan ke dalam detergen, (c) pencucian eksplan, (d) perendaman dan pengocokan eksplan dalam larutan *Bayclin+Tween 20*, (e) pembilasan eksplan sebanyak 3 kali, (f) pengirisan eksplan, dan (g) penanaman eksplan

### 3.1.1.3 Induksi Kalus

Kegiatan ini bertujuan untuk memperoleh kalus embriogenik yang mudah diregenerasikan menjadi tunas. Induksi kalus dilakukan sebagaimana dilaporkan oleh Mayang (2011) yaitu dengan menanam potongan eksplan gulungan daun muda (*leafroll*) berdiameter  $\pm 0,5$  cm dan diiris melintang setebal 1,5—2 mm ke dalam media MS + 2,4-D 3 mg/l. Pembuatan media induksi kalus dilakukan dengan cara membuat larutan stok dan menimbang bahan lain yang tidak dibuat larutan bakunya. Media yang dibuat adalah formulasi media MS + 2,4-D 3 mg/l + CW (*coconut water*) 150 ml/l + Asam askorbat 150 mg/l + Asam sitrat 50 mg/l. Setelah bahan tercampur merata, larutan tersebut ditera hingga 1 liter dengan menggunakan labu ukur. Selanjutnya pH larutan media disesuaikan menjadi 5,8 dengan menambahkan KOH 1 N jika pH kurang dari 5,8 dan HCl 1 N jika pH lebih dari 5,8. Setelah larutan media disesuaikan pH nya, media ditambahkan

agar-agar 8 g/l sebagai pematat media, kemudian media dimasak hingga mendidih. Setelah mendidih, larutan dimasukkan ke dalam botol steril, kemudian ditutup dengan menggunakan plastik dan diikat dengan karet. Setelah itu, botol-botol tersebut di autoklaf selama 7 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,55 kg f/cm<sup>2</sup>.

#### 3.1.1.4 Subkultur Kalus

Subkultur kalus dilakukan pada 1 bulan setelah penanaman eksplan ke dalam media MS+2,4-D (1, 2, 3, 4, dan 5 mg/l). Prosedur pembuatan media kultur dilakukan sama dengan pembuatan media induksi kalus, hanya saja media yang dibuat adalah media MS + 2,4-D dengan konsentrasi (1, 2, 3, 4, dan 5 mg/l). Kalus yang akan disubkultur dipilih yang embriogenik dengan ciri-ciri kalus terlihat putih kompak. Setiap botol berisi 4 *clumps*, masing-masing *clump* berdiameter  $\pm 1$  cm. Botol yang telah berisi eksplan ditutup rapat menggunakan plastik dan diikat karet gelang. Botol-botol kultur tersebut kemudian diletakkan pada rak kultur dalam ruang gelap dengan suhu ruang  $25\pm 2$  °C.

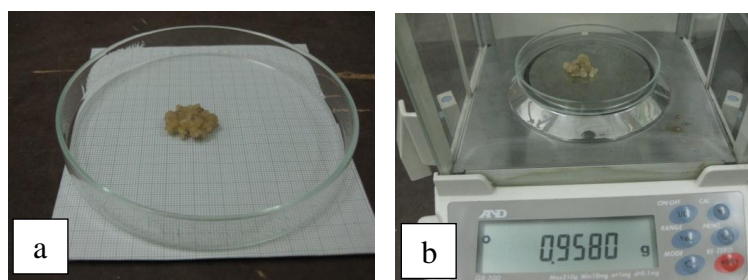
#### 3.1.1.5 Analisis Statistik

Percobaan ini dilaksanakan dengan menggunakan rancangan teracak sempurna (RTS) dengan perlakuan beberapa taraf konsentrasi 2,4-D (1, 2, 3, 4, dan 5 mg/l). Setiap unit percobaan terdiri dari 3 botol kultur yang masing-masing berisi 4 *clumps*. Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Data dianalisis keragamannya dengan menggunakan analisis ragam. Perbedaan dua nilai tengah diuji dengan

menggunakan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 5%. Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan program EXTAT.

### 3.1.1.6 Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada umur 1 bulan setelah penanaman eksplan dengan variabel ukuran diameter *clumps*, dan bobot *clumps*. Diameter *clumps* dapat diukur dengan cara meletakkan kalus pada cawan petri dengan kertas millimeter blok di bagian bawah petri. Bobot *clumps* diperoleh dengan cara *clumps* diletakkan pada cawan petri yang berada diatas timbangan analitik.



Gambar 2. Pengamatan diameter dan bobot *clump*/kalus. (a) Pengukuran diameter *clump*, dan (b) Pengukuran bobot *clump*

Persen pertambahan bobot dan diameter *clumps* juga dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ pertambahan} = \frac{\text{bobot akhir} - \text{bobot awal}}{\text{bobot awal}} \times 100\%$$

### 3.1.2 Percobaan 2 : Respons Klon Tebu terhadap Media Induksi Kalus

#### 3.1.2.1 Bahan tanaman

Tanaman yang digunakan dalam percobaan ini adalah 4 klon tebu (Ragnar, X3, GM 19, dan GP11) yang berasal dari PT Gunung Madu Plantations (PT GMP), Lampung. Eksplan yang digunakan adalah gulungan daun muda (*leafroll*). Cara pengambilan eksplan dilakukan sama seperti pada Percobaan 1.

#### 3.1.2.2 Sterilisasi Eksplan

Prosedur sterilisasi eksplan tebu dilakukan sama dengan Percobaan 1.

#### 3.1.2.3 Induksi Kalus

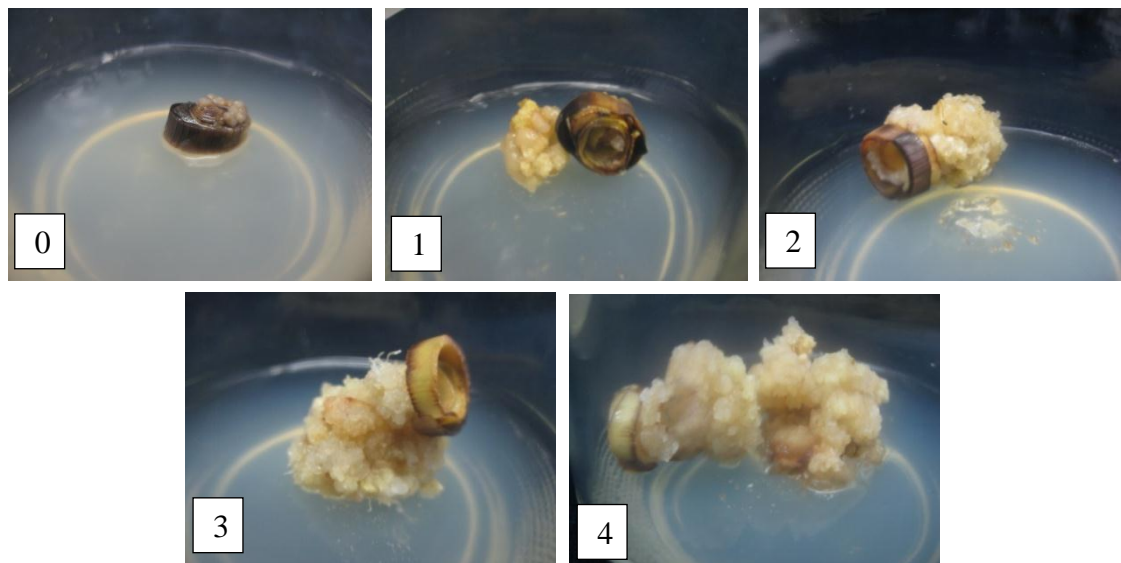
Kegiatan induksi kalus dilakukan menggunakan media MS + 2,4-D 3 mg/l MS + 2,4-D 3 mg/l + CW (*coconut water*) 150 ml/l + Asam askorbat 150 mg/l + Asam sitrat 50 mg/l. Bahan tanaman yang digunakan adalah potongan eksplan gulungan daun muda (*leafroll*) 4 klon tebu (Ragnar, X3, GM 19, dan GP 11). Setiap botol berisi 1 eksplan berdiameter  $\pm 0,5$  cm dan diiris melintang setebal  $\pm 1,5$ —2 mm. Botol yang telah berisi eksplan ditutup rapat menggunakan plastik dan diikat karet gelang. Botol-botol kultur tersebut kemudian diletakkan pada rak kultur dalam ruang gelap dengan suhu ruang  $25 \pm 2$  °C. Subkultur pertama dilakukan 2 minggu setelah tanam, dan seterusnya subkultur dilakukan 1 bulan sekali pada media yang sama MS + 2,4-D 3 mg/l. Pembuatan media induksi kalus dilakukan sama dengan Percobaan 1.

#### 3.1.2.4 Induksi Tunas

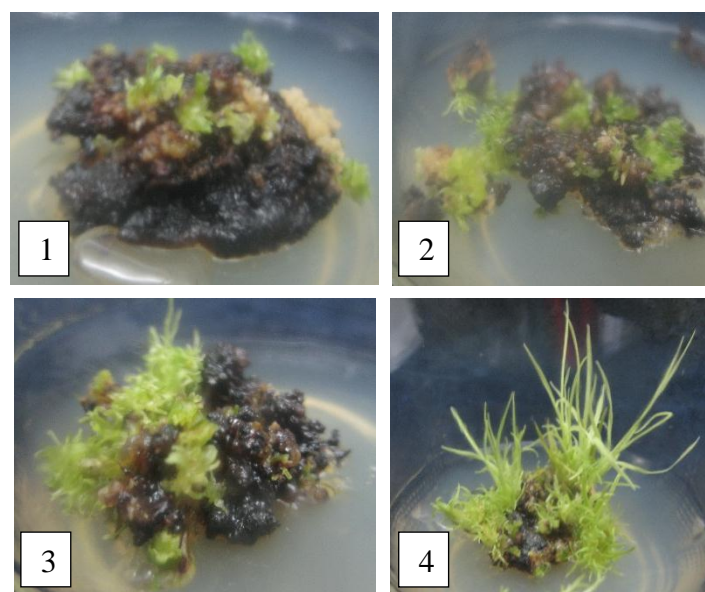
Kegiatan induksi tunas ini bertujuan untuk meregenerasikan kalus yang diperoleh untuk menjadi tunas. Induksi tunas dilakukan sebagaimana dilaporkan oleh Mayang (2011) yaitu dengan menggunakan ZPT BA 2,5 mg/l yang dicampurkan dengan komponen lainnya yang sesuai dengan formulasi media MS. Prosedur pembuatan media kultur sama dengan Percobaan 1. Kalus yang dihasilkan dari Percobaan 1 dipilih yang baik dengan penampakan visual kalus tidak terdapat fenolik, berwarna putih kompak dan kalus pada bagian yang aktif membelah. Setiap botol berisi 1 *clumps* dengan ukuran  $\pm 1$  cm. Botol yang telah berisi eksplan ditutup rapat menggunakan plastik dan diikat karet gelang. Botol-botol kultur tersebut kemudian diletakkan pada rak kultur dalam ruang terang dengan pencahayaan lampu *fluorescent* 1000-2000 lux dengan suhu ruang  $25 \pm 2$  °C. Subkultur dilakukan setiap 1 bulan sekali ke media yang sama sampai kalus membentuk tunas.

#### 3.1.2.5 Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada umur 2 bulan setelah penanaman eksplan dengan variabel banyaknya kalus dan banyaknya tunas yang terbentuk dengan cara skoring dengan 5 level yaitu 0 (tidak ada), 1 (sedikit), 2 (sedang), 3 (banyak), dan 4 (sangat banyak).



Gambar 3. Penentuan skor pembentukan kalus tebu. (0) tidak ada, (1) sedikit, (2) sedang, (3) banyak, (4) sangat banyak



Gambar 4. Contoh penentuan skor tunas. (1) sedikit, (2) sedang, (3) banyak, (4) sangat banyak



### 3.1.2.6 Analisis Statistik

Percobaan ini dilaksanakan dengan menggunakan rancangan teracak sempurna (RTS) dengan perlakuan perbedaan 4 klon tebu (Ragnar, X3, GM 19, dan GP11). Setiap unit percobaan terdiri dari 8 botol kultur, yang masing-masing berisi 1 eksplan.

### ***3.1.3 Percobaan 3 : Pengaruh Konsentrasi IBA terhadap Pengakaran Tunas Tebu dan Daya Hidup Planlet pada waktu Diaklimatisasi***

#### 3.1.3.1 Bahan Tanaman

Bahan tanam yang digunakan dalam percobaan ini adalah kalus embriogenik klon Ragnar yang diperoleh dari Percobaan 1.

#### 3.1.3.2 Induksi Tunas

Prosedur pembuatan media kultur dengan formulasi media MS + BA 2,5 mg/l dilakukan sama dengan Percobaan 1. Kegiatan induksi tunas dilakukan sama dengan Percobaan 2. Subkultur dilakukan setiap 1 bulan sekali ke media yang sama sampai kalus membentuk tunas. Tunas yang dihasilkan disubkultur hingga 2 kali pada media yang sama untuk pembesaran tanaman. Kemudian tunas dipindahkan ke dalam media MS 0 + AC 2 g/l dan diletakkan pada rak kultur dengan pencahayaan *fluorescent* 1000-2000 lux dengan suhu ruang  $25\pm 2$  °C selama 4 minggu.

### 3.1.3.3 Pengakaran Tunas

Pengakaran tunas tebu dilakukan sebagai berikut. Tunas yang diperoleh dari hasil induksi tunas dipindahkan ke media pengakaran tunas, setiap botol terdiri dari 1 rumpun tunas. Media pengakaran tunas yang digunakan adalah media MS yang ditambahkan IBA dengan berbagai konsentrasi (0, 2,5, 5, 7,5, dan 10 mg/l).

Prosedur pembuatan media dilakukan sama dengan Percobaan 1. Botol yang telah berisi eksplan tunas tebu ditutup rapat menggunakan plastik dan diikat karet gelang. Botol-botol kultur tersebut kemudian diletakkan pada rak kultur dalam ruang terang dengan pencahayaan lampu *fluorescent* 1000-2000 lux dengan suhu ruang  $25\pm 2$  °C.

### 3.1.3.4 Aklimatisasi Planlet

Bahan tanam yang digunakan pada kegiatan ini adalah planlet yang ditumbuhkan dari hasil induksi tunas dan pengakaran tunas. Bahan lainnya berupa media tanam (pasir malang dan kompos daun dengan perbandingan 1:1), gelas air mineral (digunakan sebagai wadah tanaman), Dithane M 45 dan furadan. Alat-alat yang digunakan untuk aklimatisasi planlet adalah pinset, alat tulis, gunting dan *hand sprayer*.

Penyiapan media tanam dilakukan dengan merendam komponen media tanam menggunakan Dithane M 45 selama  $\pm 12$  jam kemudian dibilas dengan air bersih sebanyak 3 kali. Selanjutnya dilakukan penyampuran pasir malang dengan kompos daun (1:1) secara merata. Campuran media tersebut dimasukkan ke

dalam gelas air minum mineral (pot tanam). Setelah itu, pot tersebut ditempelkan label yang telah diberi keterangan jenis media perlakuan dan tanggal aklimatisasi.

Sebelum planlet diaklimatisasi, botol kultur yang berisi planlet diperlakukan *hardening off* selama 1 minggu. *Hardening off* dilakukan dengan meletakkan botol kultur di luar ruang kultur pada kondisi suhu kamar dan tidak terkena cahaya matahari secara langsung, namun dengan intensitas penyorotan yang tinggi. Misalnya botol kultur yang berisi planlet diletakkan di pinggir jendela.



Gambar 5. Proses *hardening off* planlet tebu sebelum diaklimatisasi selama 1 minggu

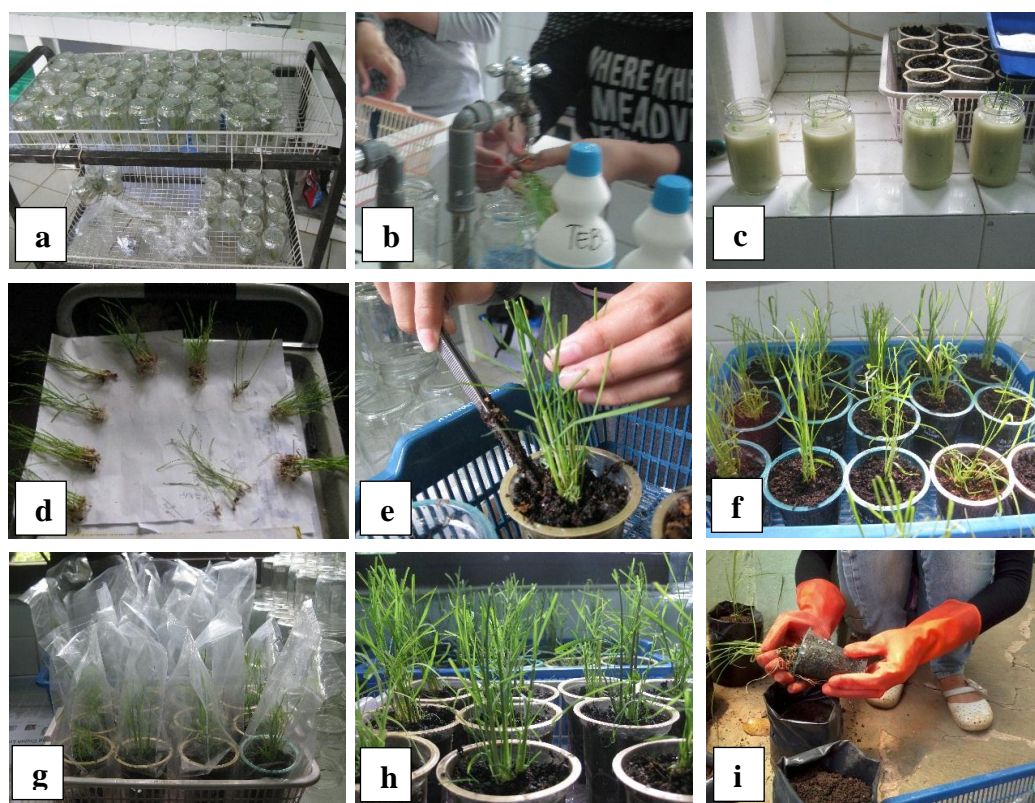
Setelah proses *hardening off*, planlet siap untuk diaklimatisasi. Aklimatisasi dilakukan dengan cara botol kultur diisi sedikit air untuk mempermudah mengeluarkan plantlet dari botol kultur, kemudian secara perlahan ambil planlet dengan menggunakan pinset dan planlet dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan media agar yang masih menempel pada akar planlet. Planlet

dibersihkan dari daun-daun yang kering menggunakan gunting, kemudian tinggi planlet diseragamkan menjadi  $\pm 10$  cm.

Setelah itu planlet direndam dalam larutan Dithane M 45 dengan konsentrasi 2 g/l selama 5—10 menit, lalu ditiriskan di atas nampan yang dialasi dengan kertas.

Planlet yang sudah kering angin dapat langsung ditanam pada media, setiap pot berisi 1 rumpun plantlet tebu. Pot tersebut diletakkan di bak tanam yang telah disediakan di rumah kaca, setelah selesai, tanaman disungkup dengan menggunakan plastik; hal ini dimaksudkan untuk mengurangi transpirasi pada planlet. Tanaman disiram sehari sekali dengan menggunakan *hand sprayer*.

Sungkup plastik dapat dibuka setelah 5 hari setelah tanam. Pada umur  $\pm 2$  bulan dalam pot (gelas air mineral), tanaman dipindahkan ke polibag ukuran 3 kg (*replanting*). Proses aklimatisasi dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Proses aklimatisasi planlet tebu. (a) botol kultur berisi planlet yang siap diaklimatisasi, (b) pencucian planlet, (c) perendaman planlet dalam larutan Dithane M45, (d) Planlet dikering anginkan, (e) penanaman planlet, (f) planlet yang baru ditanam pada media tanam, (g) penyungkupan planlet dengan plastik, (h) tanaman yang berumur 1 minggu setelah tanam, (i) Pemandahan tanaman ke dalam polibag ukuran 3 kg

#### 3.1.3.5 Pengamatan

Untuk pengakaran tunas tebu, pengamatan dilakukan saat eksplan akan diaklimatisasi yaitu dengan menghitung jumlah tunas dan jumlah akar setiap rumpun tebu per perlakuan. Sedangkan untuk mengetahui daya hidup planlet, pengamatan dilakukan pada umur 2 bulan setelah aklimatisasi yaitu dengan menghitung tunas yang hidup dan tunas yang mati per perlakuan.

### 3.1.3.6 Analisis Statistik

Percobaan ini dilaksanakan dengan menggunakan rancangan teracak sempurna (RTS) dengan perlakuan beberapa taraf konsentrasi IBA (0, 2,5, 5, 7,5, dan 10 mg/l). Untuk pengakaran tunas tebu setiap unit percobaan terdiri dari 3 botol, masing-masing botol berisi 1 rumpun/botol, setiap perlakuan terdiri dari 3 ulangan. Untuk aklimatisasi setiap unit percobaan terdiri dari 3 pot tanam, masing-masing pot tanam berisi 1 rumpun/pot, setiap perlakuan terdiri dari 3 ulangan.

### 3.2 STUDI 2: REGENERASI TANAMAN TEBU (*Saccharum officinarum* L.) DARI KALUS YANG DIIRADIASI SINAR GAMMA

Studi ini terdiri dari 2 percobaan yaitu :

1. Percobaan 4 : Respons klon tebu terhadap iradiasi sinar gamma.
2. Percobaan 5 : Regenerasi tunas tebu dari kalus yang diiradiasi sinar gamma

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Tanaman, Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Iradiasi sinar gamma dilakukan di Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi Badan Tenaga Nuklir Nasional (PATIR BATAN) Pasar Jumat, Jakarta Selatan.

### **3.2.1 Percobaan 4 : Respons Klon Tebu terhadap Iradiasi Sinar Gamma**

#### 3.2.1.1 Bahan Tanaman

Bahan tanam yang digunakan berupa kalus klon Ragnar yang berwarna putih kompak yang diperoleh dari Studi 1 Percobaan 1.

#### 3.2.1.2 Pembuatan media

Prosedur pembuatan media dilakukan dengan cara yang sama dengan Percobaan 1. Media yang digunakan pada percobaan ini adalah formulasi media MS (Murashige and Skoog, 1962), dengan penambahan 2,4-D 3 mg/l, asam sitrat 50 mg/l dan asam askorbat 150 mg/l. Media yang sudah dimasak kemudian dituangkan ke dalam botol *Scott* untuk diautoklaf selama 7 menit, setelah itu media dituangkan ke dalam cawan petri dan ditutup rapat dengan dilapisi *plastic wrap*.

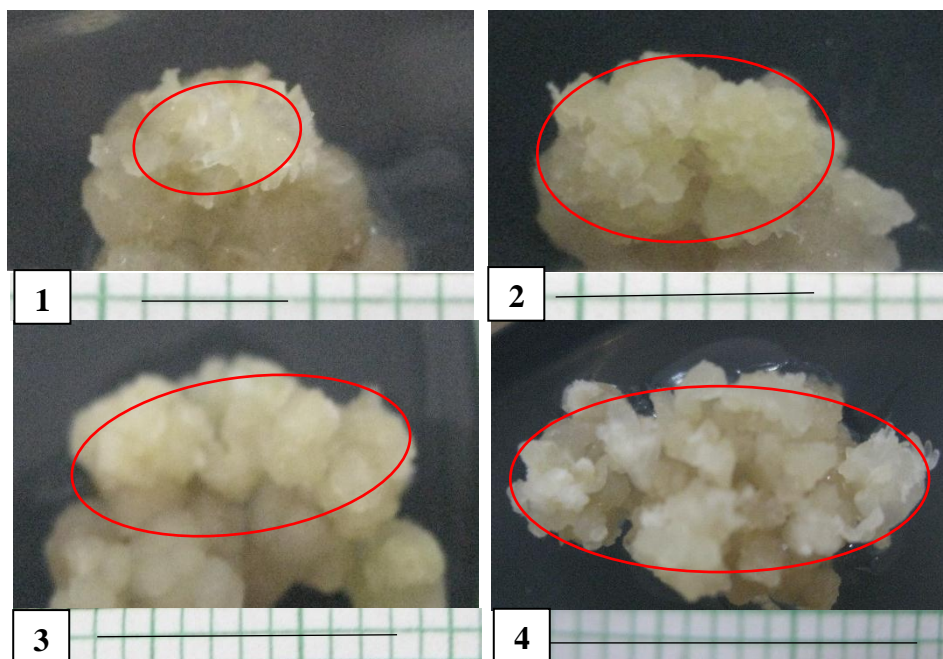
#### 3.2.1.3 Penanaman Kalus

Eksplan yang ditanam berupa kalus yang berwarna putih kompak. Penanaman eksplan dilakukan di dalam LAFC. Kalus diambil dengan menggunakan sendok atau pinset steril, kemudian diletakkan perlahan ke dalam petridish yang berisi media MS + 2,4-D 3 mg/l + asam sitrat 50 mg/l + asam askorbat 150 mg/l. Setiap petridish berisi 10 *clumps* dengan ukuran yang sama yaitu  $\pm 1$  mm. Petridish yang berisi eksplan tersebut ditutup kembali dan dilapisi *plastic wrap*. Petridish kultur tersebut kemudian diletakkan di rak kultur pada kondisi gelap dengan suhu ruang

25 ±2°C dan setelah 2 minggu kultur siap untuk diiradiasi sinar gamma dengan level dosis (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, dan 60 Gy). Setelah diiradiasi kalus harus segera dipindahkan ke media baru yang sama komposisinya dan diletakkan kembali di rak kultur pada kondisi gelap dengan suhu ruang 25 ± 2°C. Subkultur dilakukan 1 bulan sekali pada media yang sama.

#### 3.2.1.4 Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada umur 1 bulan setelah iradiasi sinar gamma dengan cara menghitung persentase proliferasi, mengamati kalus yang bertahan hidup setelah iradiasi dengan cara skoring kalus dengan 4 level yaitu : 1 (< 5 mm termasuk yang mati), 2 (5—10 mm), 3 (1 cm—1,5 cm), dan 4 (> 1,5 cm).



Gambar 7. Skoring kalus tebu setelah diiradiasi sinar gamma. Skor 1 (< 5 mm termasuk yang mati), 2 (5—10 mm), 3 (1 cm—1,5 cm), dan 4 (> 1,5 cm)



### 3.2.1.5 Analisis Statistik

Percobaan ini dilaksanakan dengan menggunakan rancangan teracak sempurna (RTS) dengan perlakuan 10 level dosis sinar gamma yaitu (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, dan 60 Gy). Setiap unit percobaan terdiri dari 6 petridish yang masing-masing berisi 10 *clumps*. Data dianalisis keragamannya dengan menggunakan analisis ragam. Perbedaan dua nilai tengah diuji dengan menggunakan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 5%.

## **3.2.2 Percobaan 5 : Regenerasi Tunas Tebu dari Kalus yang Diiradiasi Sinar Gamma.**

### 3.2.2.1 Bahan Tanaman

Tanaman yang digunakan dalam percobaan ini adalah tanaman tebu klon Ragnar, GM21, dan GM25 yang berasal dari PT Gunung Madu Plantations (PT GMP), Lampung. Eksplan yang digunakan berupa kalus embriogenik yang berwarna putih kompak hasil iradiasi sinar gamma 30 Gy.

### 3.2.2.2 Pembuatan Media

Media yang digunakan dan cara pembuatan media sama dengan Percobaan 1.

### 3.2.2.3 Induksi Tunas

Kegiatan induksi tunas dilakukan sama dengan Percobaan 2 dan 3. Kalus yang digunakan dipilih yang embriogenik dengan penampakan visual kalus tidak

terdapat fenolik dan berwarna putih kompak hasil dari iradiasi sinar gamma 30 Gy. Setiap botol berisi 1 *clumps* dengan ukuran  $\pm 1$  cm. Botol yang telah berisi eksplan ditutup rapat menggunakan plastik dan diikat karet gelang. Botol-botol kultur tersebut kemudian diletakkan pada rak kultur dalam ruang terang dengan pencahayaan lampu *fluorescent* 1000-2000 lux dengan suhu ruang  $25\pm 2$  °C. Subkultur dilakukan setiap 1 bulan sekali ke media yang sama sampai kalus membentuk tunas. Tunas yang dihasilkan disubkultur hingga 2 kali pada media yang sama untuk pembesaran tanaman. Kemudian tunas dipindahkan ke dalam media MS 0 + AC 2 g/l dan diletakkan pada rak kultur dengan pencahayaan *fluorescent* 1000-2000 lux dengan suhu ruang  $25\pm 2$  °C selama 4 minggu. Tunas yang diperoleh dari hasil induksi tunas kemudian dipindahkan ke media pengakaran tunas, setiap botol terdiri dari 1 rumpun tunas.

#### 3.2.2.4 Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada umur 2 bulan saat planlet akan diaklimatisasi yaitu dengan menghitung jumlah tunas dan jumlah akar tebu setiap klon yang terdiri dari 3 ulangan pada masing-masing klon.

#### 3.2.2.5 Analisis Statistik

Percobaan ini dilaksanakan dengan menggunakan rancangan teracak sempurna (RTS) dengan perlakuan perbedaan 3 klon tebu (Ragnar, GM21, dan GM25). Setiap unit percobaan terdiri dari 3 botol kultur yang masing-masing berisi 1 *clumps*.