

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan April sampai bulan Agustus 2016 di Laboratorium terpadu Kultur jaringan Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Sunan Gunung Djati Bandung.

3.2 Bahan dan Alat

1. Bahan Penelitian

Bahan tanaman yang digunakan sebagai eksplan adalah daun tanaman nilam (*Pogostemon cablin*. Benth) yang bahan indukannya diambil dari Bumi Dago Herbal, media yang digunakan media Murashige and Skoog (MS), zat pengatur tumbuh BAP dan 2,4-D, agar-agar, gula, aquadest, sabun cuci, *chlorox*, spirtus, dan alkohol 70% dan 90%.

2. Alat Penelitian

Laboratorium yang dibagi atas 2 ruangan, ruangan persiapan, dan ruangan mutlak steril Alat yang digunakan diantaranya botol kultur, bunsen, *Laminar Air Flow Cabinet* (L AFC), *petridish*, peralatan diseksi (pinset besar, pinset kecil, dan pisau *scalpel*), timbangan analitik, plastik, *handsprayer*, karet gelang, *magnetik stirer*, *hot plate*, labu takar, beker glass, *erlenmeyer*, pH meter, *autoclave*, pipet ukur, *aluminium foil*, kertas label, oven, lemari pendingin, dan rak kultur.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam 3 tahap. Tahap pertama yaitu proses karantina tanaman nilam tahap ke kedua teknik sterilisasi dengan menggunakan 3 teknik sterilisasi dan tahap ketiga induksi kalus, pada tahap ketiga ini menggunakan 2 ZPT yaitu 2,4-D dan BAP.

3.3.1 Karantina Bahan Eksplan

Karantina dilakukan pada tanaman yang akan dijadikan bahan induk dengan perlakuan penyimpanan tanaman induk di dalam *screen house* selama 1 bulan sebelum digunakan sebagai eksplan. Tujuan dari karantina tersebut yaitu menjaga dan melindungi bahan induk agar terhindar dari kontaminasi yang berasal dari lingkungan luar. Tanaman induk yang dikarantina diberi perlakuan penyemprotan larutan bakterisida Agrept® 20 WP 2 g untuk mencegah kontaminasi bakteri dan penyemprotan larutan fungisida Antracol 70® WP 2 g untuk mencegah kontaminasi jamur. Kedua penyemprotan ini dilakukan 2 hari sekali berselang yang dilakukan setiap pagi hari sekitar pukul 08.00 pagi, selain pemberian larutan bakterisida dan fungisida juga dilakukan pemeliharaan pada tanaman induk yaitu penyiraman, karena tanaman nilam ini tidak membutuhkan air yang banyak jadi penyiraman dilakukan setiap 2 hari sekali pada pagi hari atau tergantung kondisi tanah. Pemeliharaan lain pada tanaman nilam ini yaitu pemberian pupuk NPK sebanyak 80 g pertanaman setiap minggu, untuk pengendalian hamanya dilakukan dengan cara mekanik. Diagram alir proses pemeliharaan tanaman induk dan sumber eksplan nilam pada Lampiran 4.

3.3.2 Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan ini bertujuan untuk mendapatkan eksplan yang terbebas dari sumber kontaminasi sehingga didapat teknik sterilisasi yang terbaik bagi tanaman nilam. Teknik sterilisasi yang dipakai yaitu ada dua teknik sterilisasi (tabel 1).

Tabel 1. Waktu dan bahan Sterilisasi

Perlakuan	Bahan Sterilisasi	Dosis	Waktu (menit)
S1.	Fungisida	2 g	30
	Bakterisida	2 g	30
	Antibiotik	0,5 ml	120
	Detergen	5 ml	30
	Clorox	15 ml	30
S2.	Fungisida	2 g	40
	Bakterisida	2 g	40
	Antibiotik	0,5 ml	120
	Detergen	5 ml	30
	Clorox	15 ml	40
S3	Alcohol	60 %	½
	Clorox	30 %	5
	Aquades	100 ml	7

Keterangan: S = Sterilisasi

Tiga perlakuan ini didapat 1 perlakuan yang terbaik bagi kultur nilam, dari 36 unit sampel yang ada tumbuh menjadi kalus. Bahan yang digunakan pada sterilisasi pertama dan sterilisasi kedua ini berbeda, namun pada sterilisasi pertama dilakukan dua kali dengan bahan yang sama namun waktu pemberian yang berbeda. Hasil perlakuan yang terbaik pada teknik sterilisasi eksplan nilam ini selanjutnya digunakan sebagai teknik sterilisasi pada pengujian pengaruh berbagai konsentrasi 2,4-D dan BAP terhadap induksi kalus nilam.

3.3.3 Tahap Induksi Kalus

Pada tahap induksi kalus terdapat 2 faktor, Faktor pertama yaitu pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D yang terdiri dari tiga taraf dan faktor kedua BAP yang terdiri dari empat taraf perlakuan. Adapun penjelasannya adalah sebagai berikut :

Tabel 2. Kombinasi Perlakuan

2,4 D	BAP
2,4 D 2 ppm	BAP 0 ppm
2,4 D 4 ppm	BAP 0,5 ppm
2,4 D 6 ppm	BAP 1 ppm
	BAP 2 ppm

Berdasarkan perlakuan yang dilakukan maka diperoleh 12 unit kombinasi perlakuan dan diulang sebanyak tiga kali sehingga jumlah keseluruhan perlakuan terdiri dari 36 unit sampel.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

Adapun tahap pelaksanaan penelitian ini meliputi:

1) Sterilisasi Alat

Peralatan meliputi botol kultur, botol selai, botol saus dan cawan *petridish*, *scalpel*, dan pinset dicuci dengan menggunakan sabun cuci, dibilas, kemudian dikeringkan. Proses selanjutnya dengan sterilisasi basah dengan menggunakan *autoclave*. Alat-alat yang sudah kering dibungkus dengan kertas koran (kecuali botol kultur, botol selai, botol saus). Semua alat tersebut disterilisasi dengan

autoclave pada suhu 121⁰C dan tekanan 17,5 Psi (kg/cm) selama 45 menit. Terakhir proses sterilisasi yaitu dengan cara oven atau disebut dengan sterilisasi kering. Proses ini dilakukan setelah sterilisasi basah, alat-alat dipindahkan ke oven dengan suhu 80⁰C sampai pemakaian alat-alat.

2) Sterilisasi Ruangan

Sterilisasi awal ruang inkubasi yaitu dengan pemberian formalin padat disudut ruangan seminggu sebelum ruangan digunakan. Kemudian dilakukan setiap harinya sebelum memulai aktifitas penelitian dengan cara membersihkan daerah sekitar ruangan penelitian, meliputi pembersihan lantai, meja, rak kultur dan semua barang yang terdapat diruang inkubasi (ruang steril). Membersihkan dengan menggunakan alat pembersih kemudian dengan pemberian dan penyemprotan alcohol 70%. Aktifitas penelitian sudah selesai dikerjakan alat yang terdapat pada setiap ruang dibersihkan kembali. Sterilisasi *Laminair Air Flow* (LAF) atau tempat penanaman dilakukan dengan menyalakan lampu UV selama 1 jam sebelum pemakaian ruang. Sterilisasi LAF dilanjutkan dengan penyemprotan alcohol 70% kemudian dikeringkan dengan *tissue* bersih

3) Pembuatan larutan stok

Pembuatan larutan stok dilakukan dengan cara menimbang bahan-bahan kimia, hara makro, dan hara mikro, serta ZPT sesuai dengan komposisi media MS (Lampiran 1). Bahan-bahan tersebut dilarutkan dengan aquadest steril lalu diaduk hingga benar-benar homogen menggunakan *magnetic stirrer*, lalu dimasukkan ke dalam botol yang diberi label (sesuai dengan perlakuannya) dan disimpan dalam lemari pendingin.

4) Pembuatan media tanam

Media yang dipakai pada setiap perlakuan sebanyak 250 ml. Pembuatan media pertama yaitu dengan menimbang setiap bahan yang diperlukan agar-agar 1,75 gram dan gula 7,5 gram. Pengambilan masing-masing larutan stok sesuai dengan perlakuan yang telah ditentukan kemudian memasukkannya ke dalam *beaker glass*. Kemudian penambahan ZPT dengan menggunakan pipet, konsentrasi dari BAP yang dipakai sebanyak 100 ppm jadi masing-masing pemberian pada kombinasi perlakuan yaitu 0,5 ml 1 ml, dan 2 ml dan 2,4-D sebanyak 100 ppm dengan jumlah 0 ml, 0,125 ml, 0,25 ml dan 0,5 ml pada setiap kombinasi perlakuan.

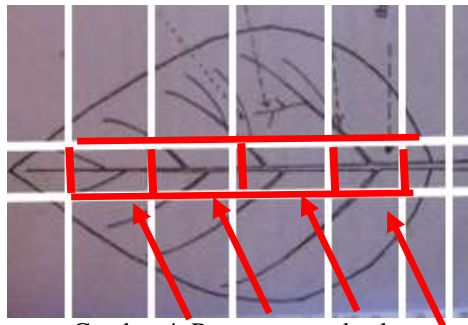
Semua bahan (kecuali agar-agar) dimasukkan ke beaker glass simpan beaker glass diatas hot plate setelah itu tambahkan aquades kurang lebih 100 ml, tutup mulut beaker glass dengan menggunakan tisu kemudian nyalakan *hot plate* diamkan dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut dan homogen. Homogen kemudian cek pH dengan menggunakan pH meter, pastikan pH netral sebanyak 6,5. Jika pH larutan tidak netral maka dilakukan penambahan NaOH bila pH terlalu rendah dan bila pH terlalu tinggi ditambahkan dengan HCl. Larutan ditambahkan agar-agar sebanyak 2 gram, kemudian larutan tersebut diaduk serta dididihkan dengan menggunakan *magnetic stirrer* dan *hot plate*. Larutan setelah mendidih dan jernih, larutan tersebut dituangkan ke botol kultur \pm 20 ml setiap botolnya. Botol ditutup dengan plastik PP 0,3 mm dan diikat dengan karet. Media disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121⁰C, tekanan 17 psi selama 45 menit. Setelah itu, botol-botol ditempatkan pada rak-rak kultur.

5) Pengambilan eksplan.

Eksplan yang digunakan yaitu berasal dari tanaman induk Nilam, bagian yang digunakan eksplan yaitu daun paling atas setelah pucuk. Diambil (dipotong) sebelum jam 9 pagi. Syarat utama daun yang dipakai eksplan yaitu daun yang telah melebar sempurna, masa karantina lebih dari 2-3 minggu dan tidak mengalami serangan hama ataupun penyakit. Alat yang dipakai untuk memotong eksplan dari pohon induk yaitu gunting yang khusus untuk kultur jaringan yang sebelumnya telah disterilkan dilaboratorium, ketika proses pengambilan eksplan (daun) yang dipakai diharuskan tidak mengalami pelukaan selain bekas pemotongan dari pohon induk. Eksplan kemudian disimpan di botol gelas yang sebelumnya diberi air aquades steril kemudian tutup botol dengan *aluminium foil*.

6) Penanaman eksplan

Eksplan yang digunakan pada tanaman nilam yaitu daun yang pertama setelah pucuk. Penanaman dilakukan terlebih dahulu dilakukan dengan sterilisasi eksplan kemudian setelah itu eksplan diletakan di LAF bersama peralatan lain yang akan digunakan pada saat penanaman eksplan. Daun nilam kemudian dipotong berukuran kurang lebih 2 cm dengan menggunakan *scapel* searah tulang daun, buang pinggiran daunnya, dan sisakan tulang daun bersama sedikit bagian daun yang dekat dengan tulang daun. Bagian yang ditunjukkan arah panah yang bergaris merah, bagian itulah yang digunakan sebagai eksplan, bagian pinggir yang terdapat lembaran daun yang tidak digunakan sebagai eksplan dibuang. Berikut ilustrasi cara pemotongan eksplan daun nilam pada gambar 4:



Gambar 4. Pemotongan eksplan

. Bagian mulut botol dipanaskan terlebih dahulu dengan api bunsen untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Kemudian ekplan ditanam pada media perlakuan dengan pinset steril, untuk menjaga kesterilan dari alat, maka *scalpel* dan pinset selalu dipanaskan sebelum digunakan. Mulut botol sebelum ditutup terlebih dahulu dipanaskan kembali. Kemudian, botol ditutup dengan *aluminium foil* dan melapisinya dengan plastik 0,3 mm. Botol diberi label sesuai perlakuan dan tanggal penanamannya.

7) Pemeliharaan

Pemeliharaan botol-botol kultur dilakukan dengan cara meletakkan pada rak-rak kultur. Untuk mencegah kontaminasi, botol-botol tersebut disemprot dengan alkohol setiap dua hari sekali.

3.5 Variabel Pengamatan

1) Persentase Kontaminasi (%)

Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati dan menghitung jumlah eksplan yang terkontaminasi cendawan, bakteri maupun keduanya pada 7 HSI. Persentase dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$\% \text{ kontaminasi} = \frac{\Sigma \text{ eksplan terkontaminasi}}{\Sigma \text{ seluruh eksplan}} \times 100\%$$

(Sekar, 2014)

2) Persentase Eksplan Browning (%)

Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati dan menghitung jumlah eksplan yang terjadi browning pada 7 HSI. Persentase dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$\% \text{ browning} = \frac{\Sigma \text{ eksplan browning}}{\Sigma \text{ seluruh eksplan}} \times 100\%$$

(Sekar, 2014)

3) Persentase Stagnasi (%)

Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati dan menghitung jumlah eksplan yang mengalami stagnasi pada 7 HSI. Persentase dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$\% \text{ stagnasi} = \frac{\Sigma \text{ eksplan stagnasi}}{\Sigma \text{ seluruh eksplan}} \times 100\%$$

(Sekar, 2014)

4) Persentase Eksplan Tumbuh (%)

Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati dan menghitung jumlah eksplan yang masih hidup, tidak terjadi kontaminasi dan tidak mati secara fisiologis pada 7 Hari Setelah Inisiasi (HIS). Persentase dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$\% \text{ eksplan hidup} = \frac{\Sigma \text{ eksplan hidup}}{\Sigma \text{ seluruh eksplan}} \times 100\%$$

(Sekar, 2014)

5) Waktu awal muncul kalus

Pengamatan dilakukan setiap hari dengan menghitung hari saat muncul kalus pertama kali yang dinyatakan dalam HSI (Hari Setelah Inisiasi). Ditandai dengan adanya pembengkakan atau munculnya jaringan berwarna putih kehijauan pada permukaan eksplan

6) Warna Kalus

Pengamatan warna kalus dilakukan pada akhir pengamatan (30 HSI) dengan mengamati secara visual.

7) Tekstur Kalus

Pengamatan tekstur kalus dilakukan pada akhir pengamatan (30 HSI) dengan mengamati tekstur kalus yang terbentuk, apakah termasuk kalus yang kompak atau remah.

