

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang dilaksanakan pada bulan Mei-juli 2014.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan antara lain oven, gelas ukur, pipet, gelas beker, timbangan analitik, pH meter, hot plate and magnetik stirrer, botol kultur, plastic tahan panas, karet, autoklaf, tisu, lampu bunsen, *Laminar Air Flow* (LAF), alat diseksi (pinset, skalpel), cawan petri, korekapi, aluminium foil, plastik wrap, rak kultur dan kertas label.

Bahan utama yang digunakan adalah bagian tunas dari tanaman mangium sebagai eksplan yang akan ditanam pada media. Bahan untuk sterilisasi adalah deterjen, aquades, alkohol 70%, alkohol 96%, HgCl₂, Clorox (NaOCl), dan aquades steril Media dasar yang digunakan adalah media MS (Murashige&Skoog) menggunakan ZPT dengan konsentrasi 1 mg/l (BAP) dan 1 mg/l (IBA). Bahan-bahan lain untuk pembuatan media adalah gula dan agar-agar.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian dengan rancangan acak lengkap (RAL) dengan kombinasi perlakuan antara konsentrasi NaOCl dan HgCl₂. Masing-masing kombinasi perlakuan dilakukan tiga ulangan dan setiap perlakuan kombinasi dilakukan dalam tiga lama waktu yang berbeda-beda yaitu 5 menit, 7 menit, dan 10 menit. Adapun kombinasi perlakuan adalah sebagai berikut:

1. Faktor pertama dengan konsentrasi NaOCl dalam 1 liter larutan
 - a. N1: 0,5 %
 - b. N2: 1 %
 - c. N3: 2 %
 - d. N4: Sterilisasi bertingkat (2%, 1%, 0,5%)
2. Faktor kedua dengan konsentrasi HgCl₂ dalam 1 liter larutan
 - a. H1: 0 mg/L
 - b. H2: 0,05 mg/L
 - c. H3: 0,1 mg/L
 - d. H4: 0,15 mg/L
 - e. H5: 0,2 mg/L

Tabel 3.1 kombinasi perlakuan NaOCl dengan HgCl₂ dalam lama waktu perendaman 5 menit, 7 menit, dan 10 menit

| Konsentrasi HgCl ₂ (mg/L) | Konsentrasi NaOCl (%) | | | |
|--------------------------------------|-----------------------|--------|--------|------------------------------------|
| | 0,5 | 1 | 2 | Sterilisasi bertingkat (2, 1, 0,5) |
| 0 | N1H1M2 | N2H1M2 | N3H1M2 | N4H1M2 |
| 0,05 | N1H2M2 | N2H2M2 | N3H2M2 | N4H2M2 |
| 0,1 | N1H3M2 | N2H3M2 | N3H3M2 | N4H3M2 |
| 0,15 | N1H4M2 | N2H4M2 | N3H4M2 | N4H4M2 |
| 0,2 | N1H5M2 | N2H5M2 | N3H5M2 | N4H5M2 |

3.4 Metode Sterilisasi

Tahapan-tahapan dalam penelitian ini meliputi sterilisasi alat dan bahan, sterilisasi lingkungan kerja, pemilihan dan pengambilan bahan eksplan, sterilisasi eksplan dengan beberapa perlakuan, penanaman eksplan dalam botol kultur, serta pemeliharaan dan pengamatan eksplan.

3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Akuades disterilkan dengan menggunakan autoklaf dengan cara mengisikan air akuades tersebut ke dalam botol-botol kultur dengan isi setengah botol kaca ± 300 ml. Botol ditutup dengan plastic dan diikat dengan karet. Sterilisasi dilakukan pada temperatur 121°C pada tekanan 1 atm selama 3 jam. Akuades yang telah disterilisasi diletakkan dalam plastic transparan, untuk menghindari mikroba masuk ke botol. Alat-alat tanam seperti pinset, gunting, dan skalpel disterilkan setiap akan dipakai dengan dicelupkan pada alkohol 70% kemudian dibakar pada lampu spiritus dan selanjutnya dicelupkan dalam air steril. Alat-alat dari logam yang disterilkan

dalam autoklaf dibungkus dalam kertas tebal. Temperatur yang digunakan dalam sterilisasi alat ini ialah 121°C pada tekanan 1 atm selama 20 menit. Cawan Petri dan alat tanam setelah disterilisasi disimpan dalam oven, dalam keadaan terbungkus kertas sampai digunakan kembali.

3.4.2 Sterilisasi lingkungan kerja

Sterilisasi dilakukan dengan cara menyemprot permukaan *laminar air flow cabinet* (LAFC) dengan menggunakan alkohol 70% dan menyalakan lampu ultraviolet minimal 30 menit sebelum digunakan, untuk mematikan kontaminan yang ada di permukaan meja. Pekerja menyemprot tangannya dengan alkohol, sebelum bekerja menggunakan masker dan jas laboratorium. Setelah selesai digunakan, permukaan meja disemprot kembali dengan menggunakan alkohol 70%.

3.4.3 Pemilihan dan Pengambilan Eksplan

Eksplan diambil dari pohon *Acacia mangium* secara langsung dari lapang dengan memilih tunas yang masih muda selanjutnya eksplan dipotong ± 2 cm untuk dicuci di air mengalir dengan detergen.

3.4.4 Sterilisasi Eksplan

Eksplan dicuci dengan menggunakan air kran yang mengalir dan detergent selama 5-10 menit, setelah eksplan sudah bersih kemudian direndam dalam larutan fungisida sebanyak 1 gram dalam 100 ml air selama satu jam dan setelah itu eksplan

dicuci bersih lagi untuk direndam dalam larutan HgCl_2 dengan berbagai konsentrasi (0,05 mg/l; 0,1 mg/l; 0,15 mg/l; dan 0,2 mg/l) dengan waktu yang berbeda selama 5 menit, 7 menit, dan 10 menit. Eksplan yang telah direndam dicuci dengan air steril 3-4 kali. kemudian dimasukkan dalam larutan NaOCl dengan berbagai konsentrasi (0%; 0,5%; 1%; 2%; sterilisassai bertingkat (2%, 1%, 0,5%)) dengan waktu yang berbeda selama 5 menit, 7 menit, dan 10 menit. Eksplan yang telah direndam dicuci dengan air steril 3-4 kali. Setelah disterilkan eksplan ini diletakkan dalam cawan petri steril yang siap untuk ditanam. Proses sterilisasi ini dilakukan dalam (*LAF*) Laminar Air Flow Cabinet. Untuk tabel kombinasi perlakuan pada tabel 3.1.

3.4.5 Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan dilakukan di dalam Laminar Air Flow Cabinet (*LAF*). Eksplan yang telah dipotong dengan ukuran ± 1 cm ditanam di botol-botol kultur yang berisi media MS dengan bantuan pinset yang telah disterilisasi. Botol kultur ditutup rapat dengan menggunakan plastik dan diikat dengan karet, lalu dilapisi dengan *aluminium foil*, dilapisi dengan plastik kembali dan diikat dengan karet, dan direkatkan dengan menggunakan plastik wrap. Botol kultur selanjutnya diletakkan dalam rak-rak kultur. Eksplan dalam botol kultur diamati setiap hari selama 1 bulan. Botol-botol kultur yang sudah menunjukkan adanya eksplan yang terkontaminasi oleh cendawan segera dipisahkan untuk menghindari penyebaran cendawan ke botol kultur yang lain, sedangkan kontaminasi oleh bakteri tidak perlu dipisahkan sampai akhir pengamatan.

3.5 Pembuatan Media

Langkah Pembuatan media MS untuk 1000 ml yaitu:

1. Dimasukkan 4,43 gr bubuk MS, 30gr gula, hormon pertumbuhan dengan konsentrasi 1 mg/l (BAP) dan 1 mg/l (IBA). ke dalam gelas beker dan diletakkan di atas *hot plate*.
2. Ditambahkan aquades sampai volume 1000 ml, kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer*.
3. Diukur pH larutan media dalam beaker glass (pH 5,6-5,8). pH diatur dengan larutan HCl 1 N atau KOH 1 N.
4. Ditambahkan 7 gr agar.
5. Larutan media dididihkan dalam gelas beker sambil terus diaduk.
6. Larutan media MS dituangkan ke dalam botol kultur, masing-masing sebanyak 20 mL.
7. Botol kultur ditutup dengan plastic tahan panas dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm, selama 15 menit.
8. Botol berisi media MS diinkubasi dalam ruang inkubator selama minimal 3 hari.

3.6 Pengamatan

3.6.1 Pengamatan Mingguan

Pengamatan dilakukan setiap satu minggu sekali dimulai setelah penanaman untuk mengamati eksplan tunas *Acacia mangium* yang terkontaminasi atau browning.

1. Pengamatan kontaminasi yaitu ada atau tidak adanya kontaminasi. Pengamatan dilakukan dengan mengamati secara langsung dengan melihat ciri-ciri umum koloni mikroorganisme (jamur ataupun bakteri).
2. Pengamatan kematian eksplan tunas *Acacia mangium*.
3. Pengamatan browning pada eksplan tunas *Acacia mangium*.

1.6.2 Pengamatan Akhir

Pengamatan akhir dilakukan di akhir hari pengamatan atau pada minggu ke-4. Parameter pengamatan meliputi satuan persentase eksplan yang terkontaminasi dan eksplan yang browning.

1. Satuan parameter persentase tingkat kontaminasi adalah berapa banyak eksplan yang terkontaminasi dalam satuan persen (%), dengan rumus hitung sebagai berikut:

Persentase tingkat kontaminasi

$$= \frac{\text{Eksplan yang terkontaminasi tiap perlakuan}}{\text{Total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

2. Satuan parameter tingkat kematian eksplan adalah jumlah keseluruhan eksplan yang mengalami kontaminasi dan eksplan yang mengalami browning dalam satuan persentase (%), dengan rumus sebagai berikut:

$$\begin{aligned} & \text{Persentase tingkat kematian eksplan} \\ & = \frac{\text{Eksplan yang mati tiap perlakuan}}{\text{Total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\% \end{aligned}$$

3. Satuan parameter tingkat browning dalam satuan persentase (%), dengan rumus sebagai berikut:

$$\begin{aligned} & \text{Persentase tingkat browning} \\ & = \frac{\text{Eksplan yang browning tiap perlakuan}}{\text{Total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\% \end{aligned}$$

3.7 Analisis Data

Data pengamatan berupa data kuantitatif dan kualitatif. Selanjutnya untuk mengetahui pengaruh antar perlakuan, dilakukan uji statistik menggunakan ANOVA *Two-Way*. Bila terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan uji DMRT pada taraf 5%. Semua data menggunakan SPSS 16.0 untuk mengetahui data terbaik pada setiap pengujian. Dan data kualitatif berupa pengamatan visual hasil kultur disajikan secara deskriptif untuk dibandingkan antara ketiga pengujian.