



## BAB III METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Lingkungan Pusat Penelitian Lingkungan Hidup (PPLH) Institut Pertanian Bogor, Laboratorium Kultur Jaringan Silvikultur, dan rumah kaca Silvikultur, Fakultas Kehutanan, Institut Pertanian Bogor. Penelitian ini berlangsung dari bulan Juni 2011 hingga April 2012.

### 3.2 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan meliputi:

#### a. Bahan tanaman (eksplan)

Bahan tanaman yang dipakai adalah tunas jabon berumur  $\pm$  3 bulan (Gambar 1A) yang dibeli dari petani. Bibit jabon kemudian diletakkan di dalam sungkup yang berada di rumah kaca. Sungkup tersebut ditutup dengan menggunakan *insectnet*. Bibit jabon diberikan ZPT (Zat Pengatur Tumbuh) berupa BAP, GA<sub>3</sub>, dan pupuk daun dengan cara disemprotkan pada daun setiap hari selama 2 minggu. Peletakan bibit jabon dipisahkan berdasarkan perlakuan karantina, yaitu tanpa karantina, karantina 7 hari, dan karantina 14 hari. Bibit tanpa karantina hanya diberikan ZPT, sedangkan bibit yang dikarantina diberi ZPT dan perlakuan antibiotik berupa steptomisin, amoksilin, dan kloramfenikol setiap hari selama 7 hari dan 14 hari. Tunas tanaman yang diambil mulai dari bagian pucuk sampai buku kedua (Gambar 1).

#### b. Bahan media

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media MS (Murashige dan Skoog), yang terdiri atas hara makro, hara mikro, larutan vitamin, glukosa, dan dipadatkan dengan agar-agar tanpa menggunakan ZPT.

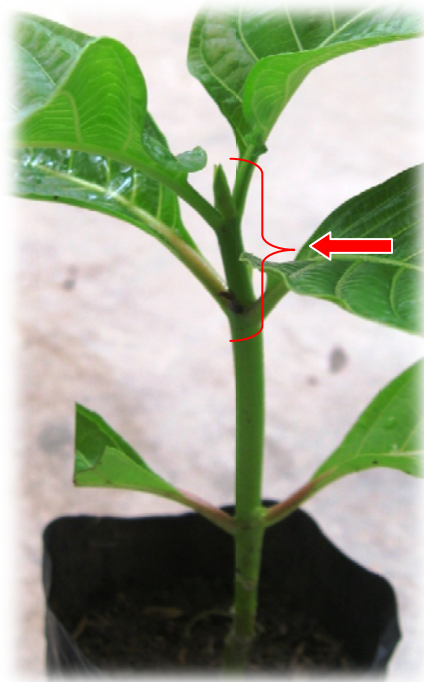
#### c. Bahan sterilisasi

Bahan sterilisasi yang digunakan ialah fungisida (Masalgin); bakterisida (Agrept 20 WP); antibiotik berupa steptomisin, amoksilin, kloramfenikol; NaOCl, alkohol 70%, dan betadine.

d. Bahan lain

Bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini meliputi detergen, air steril, dan air kran.

Alat alat yang digunakan dalam penelitian ini ialah meja kerja steril (*laminar air flow cabinet*), autoklaf, aerator, timbangan dengan ketelitian  $10^{-3}$ , *hot plate magnetic stirrer*, labu Erlenmeyer, gelas piala, gelas ukur 10 ml dan 100 ml, cawan Petri, pipet bulb, pengaduk, pinset, spatula, lampu spirtus, sprayer, pH meter, plastik, kuas, karet gelang, botol kultur, *aluminium foil*, corong, gunting, korek api, tissue, oven, masker, jas laboratorium, kamera, *tally sheet*, alat tulis dan computer.



Gambar 1 Bagian tunas jabon yang digunakan sebagai eksplan (tanda panah) pada jabon berumur  $\pm 3$  bulan

### 3.3 Metode Kerja

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

**Sterilisasi alat dan bahan.** Akuades disterilisasi dengan menggunakan autoklaf dengan cara mengisikan air akuades tersebut ke dalam botol-botol kultur

dengan isi setengah botol kaca  $\pm 100$  ml. Botol ditutup dengan plastik dan diikat dengan karet. Sterilisasi dilakukan pada temperatur  $121^{\circ}\text{C}$  pada tekanan 1 atm selama 1 jam. Akuades yang telah disterilisasi diletakkan dalam plastik 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 terbungkus dalam kertas tebal. Temperatur yang digunakan dalam sterilisasi alat adalah  $121^{\circ}\text{C}$  pada tekanan 1 atm selama 20 menit. Cawan Petri dan alat tanam setelah disterilisasi disimpan dalam oven, dalam keadaan terbungkus kertas sampai digunakan kembali.

**Sterilisasi lingkungan kerja.** Sterilisasi dilakukan dengan cara menyemprot permukaan *laminar air flow cabinet* (L AFC) 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%.

**Pemilihan dan pengambilan eksplan.** Eksplan diambil pada pagi hari dari bibit jabon di rumah kaca dengan panjang eksplan sekitar 2–2,5 cm. Eksplan dipotong dengan menggunakan skalpel yang terlebih dahulu disemprot menggunakan alkohol 70%. Potongan eksplan dimasukkan ke dalam botol yang berisikan air steril dan langsung ditutup.

**Sterilisasi eksplan.** Sterilisasi eksplan dilakukan dengan mengusap satu persatu eksplan dengan menggunakan alkohol 70% secara perlahan-lahan. Eksplan yang telah diusap dengan alkohol direndam dengan larutan detergen+bakterisida+fungisida masing masing 1 gram dalam 100 ml air steril selama 30 menit. Selanjutnya, eksplan dibilas dengan menggunakan air kran dan dibersihkan kembali dengan kuas satu persatu di bawah air mengalir, kemudian eksplan dibilas dengan air sampai detergen, bakterisida, dan fungisida hilang dari eksplan. Setelah eksplan bersih, dilanjutkan dengan perendaman memakai aerator dalam larutan antibiotik (streptomisin+amoksisilin+kloramfenikol) masing-masing

0,5 mg dalam 100 ml air oksigen selama 1 hari dan 2 hari. Eksplan tanpa perlakuan perendaman antibiotik, dibilas kembali dengan air steril sebanyak 2 kali, masing-masing tiga menit. Sterilisasi lanjutan dilakukan dalam LAFC dengan perendaman larutan NaOCl 7,5 % dan 5 % selama 3-5 menit, dan dibilas dengan air steril sebanyak 4 kali, masing-masing selama 3 menit. Eksplan kemudian dipotong menggunakan skalpel dengan panjang  $\pm$  1 cm di dalam cawan Petri. Daun dan bekas bahan sterilisasi dibersihkan dan dibuang dari eksplan. Setelah dipotong, eksplan direndam dalam larutan betadine selama 10 menit dan dibilas kembali dengan menggunakan air steril 1 kali. Selanjutnya, eksplan ditiriskan dalam tissue steril yang diletakkan pada cawan Petri. Perlakuan yang diberikan dalam penelitian ini meliputi:

A. Bibit tanpa karantina

A.1 Pengolesan permukaan eksplan dengan alkohol 70%

Perendaman dalam 100 ml larutan bakterisida, fungisida, dan detergen

Perendaman larutan NaOCl 7,5 % selama 3-5 menit

Perendaman larutan NaOCl 5 % selama 3-5 menit

Perendaman larutan betadine 10 menit

A.2 Pengolesan permukaan eksplan dengan alkohol 70%

Perendaman dalam 100 ml larutan bakterisida, fungisida, dan detergen

Perendaman eksplan dalam larutan antibiotik selama semalam

Perendaman larutan NaOCl 7,5 % selama 3-5 menit

Perendaman larutan NaOCl 5 % selama 3-5 menit

Perendaman larutan betadine 10 menit

A.3 Pengolesan permukaan eksplan dengan alkohol 70%

Perendaman dalam 100 ml larutan bakterisida, fungisida, dan detergen

Perendaman eksplan dalam larutan antibiotik selama dua malam

Perendaman larutan NaOCl 7,5 % selama 3-5 menit

Perendaman larutan NaOCl 5 % selama 3-5 menit

Perendaman larutan betadine 10 menit

Bibit dengan karantina 7 hari

B.1 Pengolesan permukaan eksplan dengan alkohol 70%

Perendaman dalam 100 ml larutan bakterisida, fungisida, dan detergen



Perendaman eksplan dalam larutan antibiotik selama semalam

Perendaman larutan NaOCl 7,5 % selama 3-5 menit

Perendaman larutan NaOCl 5 % selama 3-5 menit

Perendaman larutan betadine 10 menit

#### B.2 Pengolesan permukaan eksplan dengan alkohol 70%

Perendaman dalam 100 ml larutan bakterisida, fungisida, dan detergen

Perendaman eksplan dalam larutan antibiotik selama 2 malam

Perendaman larutan NaOCl 7,5 % selama 3-5 menit

Perendaman larutan NaOCl 5 % selama 3-5 menit

Perendaman larutan betadine 10 menit

#### Bibit dengan karantina 14 hari

##### C.1 Pengolesan permukaan eksplan dengan alkohol 70%

Perendaman dalam 100 ml larutan bakterisida, fungisida, dan detergen

Perendaman eksplan dalam larutan antibiotik selama semalam

Perendaman larutan NaOCl 7,5 % selama 3-5 menit

Perendaman larutan NaOCl 5 % selama 3-5 menit

Perendaman larutan betadine 10 menit

##### C.2 Pengolesan permukaan eksplan dengan alkohol 70%

Perendaman dalam 100 ml larutan bakterisida, fungisida, dan detergen

Perendaman eksplan dalam larutan antibiotik selama 2 malam

Perendaman larutan NaOCl 7,5 % selama 3-5 menit

Perendaman larutan NaOCl 5 % selama 3-5 menit

Perendaman larutan betadine 10 menit

#### **Penanaman eksplan.** Penanaman eksplan dilakukan di dalam LAFC.

Eksplan yang telah dipotong dengan ukuran  $\pm 1$  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.

### 3.4 Pengamatan dan Pengambilan Data

Peubah yang diamati meliputi persen kontaminasi bakteri, cendawan, persen browning, persen hidup.

#### 1. Persen kontaminasi bakteri

Persen kontaminasi bakteri diukur dengan cara menghitung jumlah tanaman yang terkontaminasi mulai 1 hari setelah eksplan ditanam dan selanjutnya setiap hari sampai akhir pengamatan, kemudian dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Kontaminan} = \frac{\sum \text{eksplan terkontaminasi bakteri}}{\sum \text{eksplan yang ditanam}}$$

#### 2. Persen kontaminasi cendawan

Persen kontaminasi cendawan diukur dengan cara menghitung jumlah tanaman yang terkontaminasi mulai 1 hari setelah eksplan ditanam dan selanjutnya setiap hari sampai akhir pengamatan, kemudian dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Kontaminan} = \frac{\sum \text{eksplan terkontaminasi cendawan}}{\sum \text{eksplan yang ditanam}}$$

#### 3. Persen *browning*

Persen *browning* diukur dengan cara menghitung jumlah tanaman yang mengalami *browning* mulai 1 hari setelah eksplan ditanam dan selanjutnya setiap hari sampai akhir pengamatan, kemudian dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ browning} = \frac{\sum \text{eksplan mengalami } \textit{browning}}{\sum \text{eksplan yang ditanam}}$$

#### 4. Persen hidup

Persen hidup diukur dengan cara menghitung jumlah tanaman yang hidup sampai akhir pengamatan, kemudian dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ hidup} = \frac{\sum \text{eksplan hidup}}{\sum \text{eksplan yang ditanam}}$$

#### 5. Persen multiplikasi

Persen diukur dengan cara menghitung jumlah tanaman yang bisa dimultiplikasi pada akhir pengamatan, kemudian dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ multiplikasi} = \frac{\sum \text{eksplan dapat dimultiplikasi}}{\sum \text{eksplan yang ditanam}}$$

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



### 3.5 Analisis Data

Dalam penelitian ini terdapat 2 perlakuan yaitu karantina dan perendaman antibiotik. Waktu karantina yang digunakan adalah 0 hari, 7 hari, dan 14 hari. Waktu perendaman antibiotik yang digunakan adalah 0 hari, 1 hari dan 2 hari. Penelitian dilakukan dengan 7 kombinasi perlakuan, yaitu karantina 0 hari dan perendaman 0 hari, karantina 0 hari dan perendaman 1 hari, karantina 0 hari dan perendaman 2 hari, karantina 7 hari dan perendaman 1 hari, karantina 7 hari dan perendaman 2 hari, karantina 14 hari dan perendaman 1 hari, karantina 14 hari dan perendaman 2 hari. Masing-masing kombinasi perlakuan diulang sebanyak 8 kali. Setiap ulangan terdiri atas 5 satuan percobaan berupa botol kultur. Setiap botol kultur hanya ditanami 1 eksplan. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.