

### 3. BAHAN DAN METODE

#### 3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, Laboratorium Fisiologi Tanaman, Laboratorium Pemuliaan Tanaman dan Laboratorium Bioteknologi (Laboratorium Sentral) Jurusan Agronomi, Fakultas Pertanian Brawijaya. Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari 2017–Januari 2018.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), timbangan analitik, kompor listrik, botol kultur, pengaduk, gelas beker, gelas ukur, gelas arloji, pipet hisap, pipet tetes, spatula, gelas erlenmeyer, gunting, *handsprayer*, karet gelang, plastic, tisu, pinset, cawan petri, *scalpel*, pH meter, panci, *magnetic stirrer*, air conditioner (AC), rak kultur, bunsen, *autoclave*, oven, *Color Chart Royal Horticultural Society* (RHS), cuvet, kaca preparat, kaca penutup, mikroskop Ollympus yang terhubung ke Optilab *photomicroscope*, penggaris, alat tulis dan kamera.

Bahan yang digunakan adalah eksplan tunas temulawak UB2 (klon Jember) dan UB3 (klon Pasuruan). Media dasar Murashige dan Skoog (MS), sukrosa 30 g/L, agar 6,3 g, *Benzyl Amino Purine* (BAP) 5,0 ppm, 2,4-D (*2,4-Dichlorophenoxyacetic acid*), aquades steril, spiritus, label, plastik penutup, karet gelang, alkohol 70%, alkohol 96%, fungisida (blanlate) 5g/L, detergen, bakterisida (streptomycin) 5 g/L, 8-Hydroxyquinolin 0,002 M, 8-Hydroxyquinolin 0,004 M, Asam asetat 45%, HCL 1N, NaOH 1N, clorox 15%, Aceto orcein 2%, cat kuku bening, Methylene blue, dan casein hidrolisat 0,08g/L.

#### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan percobaan dengan metode Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 3 ulangan. Faktor yang digunakan adalah klon temulawak yaitu UB<sub>2</sub> (klon Jember) yang telah diberi perlakuan 2,4-D dan UB<sub>3</sub> (klon Pasuruan). Pada setiap ulangan terdapat 2 eksplan, sehingga terdapat 36 eksplan. Seluruh eksplan digunakan sebagai bahan pengamatan destruktif dan non destruktif.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 6 kombinasi antar klon temulawak dengan konsentrasi 2,4-D sebagai berikut:

T1 = Temulawak klon Jember yang tidak mendapatkan perlakuan 2,4-D

T2 = Temulawak klon Jember yang telah mendapatkan perlakuan 2,4-D 1 ppm

T3 = Temulawak klon Jember yang telah mendapatkan perlakuan 2,4-D 2 ppm

T4 = Temulawak klon Pasuruan yang tidak mendapatkan perlakuan 2,4-D

T5 = Temulawak klon Pasuruan yang telah mendapatkan perlakuan 2,4-D 1 ppm

T6 = Temulawak klon Pasuruan yang telah mendapatkan perlakuan 2,4-D 2 ppm

### **3.4 Pelaksanaan Penelitian**

#### **3.4.1 Sterilisasi alat**

Peralatan yang disterilisasi adalah peralatan utama yang digunakan dalam proses pembuatan media dan penanaman yaitu botol kultur, pinset, scapel, cawan petri, dan tissue. Botol kultur yang sebelumnya di cuci dengan sabun direndam dengan bayclin 10% selama 8 jam. Kemudian dicuci dengan sabun, dibilas, dan disterilisasi dalam oven bersuhu 100 °C selama 1 malam. Untuk pinset, scapel, cawan petri, dan tissue disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C bertekanan 15 atm selama 1 jam. Proses sterilisasi alat untuk menanam dapat dilakukan bersamaan dengan sterilisasi media dan sterilisasi akuades.

#### **3.4.2 Pembuatan Media MS**

Media untuk perbanyakan tunas menggunakan media Murashige dan Skoog (MS) dengan komposisi yang terlampir pada lampiran 2 dengan pH 5,8-6,0.

Media MS kemudian dicetak dalam botol kultur steril masing-masing dengan volume 25 ml. Kemudian disterilkan dalam autoklaf bersuhu 121°C 15 atm selama 1 jam. Media MS yang telah steril kemudian disimpan dalam ruang inkubasi selama 3 hari sebelum digunakan sebagai media perbanyakan.

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

Keterangan:

V1 = Volume larutan stok yang dicari

M1 = Dosis larutan stok yang tersedia

V2 = Volume media yang akan dibuat

M2 = Dosis media yang akan dibuat

### 3.4.3 Perlakuan Poliploidisasi

Kebutuhan konsentrasi asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) yang digunakan dalam penelitian ini ialah 0 mL (setara dengan 0 ppm), 2,5 mL (setara dengan 1 ppm), dan 5 mL (setara dengan 2 ppm) pada masing-masing klon temulawak. Pembuatan asam 2,4-D dimulai dengan pengukuran larutan asam 2,4-D sesuai dengan perlakuan. Selanjutnya dilarutkan dalam aquades hingga volume 250 mL. Tunas temulawak yang digunakan berasal dari tunas temulawak yang sebelumnya ditumbuhkan pada media MS dengan BAP 5 mg.L<sup>-1</sup> dan direndam dalam larutan asam 2,4-D sesuai dengan perlakuan selama 1 minggu dan botol ditutup rapat, kegiatan ini dilakukan dalam LAF. Kemudian dipindahkan pada media MS tanpa perlakuan.

### 3.4.4 Perbanyak tunas

Eksplan yang telah steril kemudian di tanam pada media MS untuk perbanyak tunas. Diberi identitas sesuai dengan perlakuan dan waktu penanamannya. Eksplan diinkubasi dalam ruang inkubasi dan setiap satu bulan sekali di lakukan subkultur untuk memisahkan anakan dari tunas sebelumnya hingga didapatkan jumlah eksplan yang sesuai untuk perlakuan.

### 3.4.4 Penanaman secara *in vitro*

Penanaman eksplan dilakukan di dalam LAF. Sebelum menggunakan LAF, blower dan lampu dinyalakan terlebih dahulu selama 15 menit. Sebelum melakukan penanaman, pinset, cawan petri dan scapel disterilkan dengan aquades 96%. Proses selanjutnya memotong eksplan tunas temulawak yang sepanjang 1 cm. Sebelum menanam eksplan, leher botol

media disterilkan di atas lampu bunsen. Leher botol disterilkan di atas lampu bunsen kemudian eksplan ditanam dan botol ditutup dengan plastik tahan panas kemudian diikat dengan karet. Botol diberi keterangan yang terdiri dari perlakuan, ulangan dan tanggal inokulasi.

### **3.4.5 Pemeliharaan**

Pemeliharaan dilakukan dengan cara menyemprotkan alkohol 70% ke sekitar botol-botol kultur setiap hari. Selain itu dilakukan pengamatan media atau eksplan yang mengalami kontaminasi untuk di pindahkan ke ruang yang berbeda. Subkultur dilakukan apabila nutrisi pada media yang digunakan habis dan pertumbuhan tanaman dalam botol telah mencapai titik maksimum pada botol yang digunakan. Serta dilakukan sub kultur setiap 1 bulan sekali. Sub kultur dilakukan dengan memisahkan tanaman induk dengan anakan yang akan dipindahkan pada botol kultur yang lain. Botol-botol kultur yang telah ditanam disimpan di rak-rak kultur, penyinaran dilakukan 16 jam setiap hari dengan menggunakan lampu TL 20 watt yang diletakkan pada masing-masing rak kultur dengan suhu ruangan 20 °C.

## **3.5 Parameter Pengamatan**

Pengamatan yang akan dilakukan meliputi :

### 1. Pengamatan non destruktif:

Pengamatan non destruktif dilakukan setiap satu minggu sekali hingga 8 minggu setelah perlakuan. Pengamatan non destruktif meliputi:

#### a) Tinggi Eksplan (cm)

Pengamatan dilakukan satu minggu sekali dengan mengukur planlet dari pangkal tanaman hingga titik tertinggi, pengamatan dimulai pada minggu pertama setelah perlakuan (1 MSP) hingga 8 minggu setelah perlakuan (MSP).

#### b) Jumlah Daun (Helai)

Pengamatan dilakukan satu minggu dengan menghitung jumlah daun yang membentuk sempurna pengamatan dimulai pada minggu pertama setelah perlakuan (1 MSP) hingga 8 minggu setelah perlakuan (MSP).

c) Jumlah Tunas (Tunas)

Pengamatan dilakukan satu minggu sekali dengan menghitung jumlah tunas yang muncul, pengamatan dimulai pada minggu pertama setelah perlakuan (1 MSP) hingga 8 minggu setelah perlakuan (MSP).

d) Jumlah Akar

Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah akar yang terbentuk dimulai minggu pertama setelah perlakuan (1 MSP) hingga 8 minggu setelah perlakuan (MSP)

e) Warna Eksplan

Pengamatan warna eksplan dilakukan dengan membandingkan dengan *color chart* RHS (*Royal Horticultural Society*). Pengamatan pada 8 minggu setelah perlakuan (MSP).

2. Pengamatan destruktif

Pengamatan destruktif dilakukan pada umur 8 minggu setelah perlakuan dengan 3 sampel tanaman setiap satuan percobaan. Pengamatan destruktif meliputi:

a) Kromosom

Pengamatan kromosom yang dilakukan dengan memotong ujung akar 0,5-1 cm kemudian dimasukkan kedalam botol yang berisi larutan 8-Hydroxyquinolin 0,002 M lalu dinginkan pada suhu  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  selama 180 menit yang bertujuan agar jaringan atau sel bersih dari kotoran sekaligus mempertahankan agar sel tidak mudah rusak. Akar tanaman dicuci dengan air, direndam dalam asam asetat 45% selama 10 menit kemudian dimasukkan kedalam botol yang berisi larutan HCl dengan asam asetat 45% dengan perbandingan 3:1 selama 2 menit. akar dipanaskan dalam *waterbath* dengan suhu  $60^{\circ}\text{C}$  bertujuan untuk menghentikan tahap-tahap pembelahan sel dan melunakan jaringan atau dinding sel.

Akar dipindahkan kedalam gelas arloji dengan posisi ujung akar dibagian dalam gelas arloji, teteskan aceto orcein 2% sebagai pewarna dalam sel dan diamkan selama 10 menit. Setelah 10 menit ujung akar diletakkan pada preparat dan dipotong pada ujungnya sepanjang 1-2 mm yang kemudian ditetesi aceto orcein 2% dan ditutup dengan penutup

preparat. Preparat dilewatkan pada api bunsen 2-3 kali, kemudian di-*squash* dan ditekan dengan ibu jari dengan tujuan untuk meratakan sebaran kromosom dan jaringan akar. Kemudian preparat diamati jumlah kromosomnya dibawah mikroskop ollympus yang telah terhubung dengan *optilab photomicroscope*. Selanjutnya dilakukan pemotretan terhadap kromosom yang sebarannya baik. Pengamatan jumlah kromosom dilakukan secara mikroskopis dengan perbesaran obyektif 1000x pada masing-masing perlakuan, dan dibandingkan dengan kontrol (Ratri, 2017).

b) Stomata

Pengamatan stomata dilakukan pada daun planlet sampel yang diambil satu helai pada masing-masing perlakuan, kemudian bagian epidermis daun bawah diolesi dengan cat kuku (kutek) bening kemudian ditutup dengan selotip, tunggu hingga kering dan kemudian dikupas. Selanjutnya diamati dibawah mikroskop ollympus yang terhubung pada *optilab photomicroscope* dengan perbesaran 400 kali dengan luas bidang pandang  $0,19625 \text{ mm}^2$ . Pengamatan stomata dilakukan dengan mengukur diameter, jumlah dan kerapatan stomata pada keseluruhan daerah yang diamati. Kerapatan stomata dapat diukur dengan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Kerapatan stomata} = \frac{\text{jumlah stomata}}{\text{luas bidang pandang}}$$

c) Jaringan Pembuluh Angkut

Pengamatan jaringan pembuluh angkut dilakukan pada batang planlet yang diiris tipis melintang kemudian diletakkan pada kaca preparat dan ditetesi dengan *methylene blue* kemudian ditutup dengan kaca penutup. Selanjutnya diamati dibawah mikroskop ollympus yang terhubung pada *optilab photomicroscope* dengan perbesaran 40 kali. Pengamatan jaringan pembuluh angkut dilakukan dengan mengukur diameter xylem dan floem.

### 3.6 Analisa Data

Data hasil jumlah daun, jumlah akar, dan jumlah tunas di transformasi menggunakan transformasi akar  $[\sqrt{(x+0,5)}]$ . Data hasil pengamatan yang diperoleh diuji dengan menggunakan analisis ragam (uji F) pada taraf 5% untuk mengetahui adanya pengaruh nyata antar perlakuan. Pengaruh nyata antar

perlakuan ( $F \text{ hitung} > F \text{ tabel } 5\%$ ) dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) taraf 5% untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

Kemudian dilakukan perhitungan koefisien keragaman genotip (KKG) serta pendugaan nilai heritabilitas. Pendugaan nilai heritabilitas dapat dilakukan dengan melihat analisa ragam berdasarkan rancangan yang digunakan. Menurut Mangoendidjojo (2003) *dalam* Sari, Damanhuri, dan Respatijarti (2014), pendugaan komponen ragam genetik dan ragam fenotip adalah:

SK	DB	KT	$\Sigma$
Ulangan	r-1	KTu ( $M_3$ )	$\sigma_e^2 + g \sigma_u^2$
Genotip	g-1	KTg ( $M_2$ )	$\sigma_e^2 + r \sigma_g^2$
Galat	(r-1)(g-1)	KTe ( $M_1$ )	$\sigma_e^2$

Keterangan :

Varian galat ( $\sigma_e^2$ ) =  $M_1$

Varian genetik ( $\sigma_g^2$ ) =  $\frac{M_2 - M_1}{u}$

Varian fenotip ( $\sigma_p^2$ ) =  $\sigma_g^2 + \frac{\sigma_e^2}{u}$

Menurut Moedjiono dan Mejaya (1994) *dalam* Sari, Damanhuri, dan Respatijarti (2014), Koefisien Keragaman Genotip (KKG) dan Koefisien Keragaman Fenotip (KKF) tiap karakter dihitung dengan rumus :

$$KKG = \frac{\sqrt{\sigma_2g}}{\bar{x}} \times 100\%$$

$$KKF = \frac{\sqrt{\sigma_2p}}{\bar{x}} \times 100\%$$

Keterangan :

KKG = Koefisien Keragaman Genotip

KKF = Koefisien Keragaman Fenotip

$\sigma_2g$  = Ragam genotip

$\sigma_2p$  = Ragam fenotipe

$\bar{x}$  = Rata-rata seluruh populasi tiap karakter tanaman

Kriteria nilai KKF dan KKG adalah rendah ( $0\% \leq 25\%$ ), agak rendah ( $25\% \leq 50\%$ ), cukup tinggi ( $50\% \leq 75\%$ ), dan tinggi ( $75\% \leq 100\%$ ).

Perhitungan nilai heritabilitas ( $h^2$ ) dapat dihitung dengan rumus :

$$h^2 = \frac{\sigma^2_g}{\sigma^2_g + \sigma^2_e} = \frac{\sigma^2_g}{\sigma^2_p}$$

Menurut Stanfield (1991) *dalam* Sari, Damanhuri, dan Respatijarti (2014) kriteria nilai duga heritabilitas dalam arti luas adalah tinggi ( $h^2 \geq 0,50$ ), sedang ( $0,20 \leq h^2 < 0,50$ ), rendah ( $h^2 < 0,20$ ).