

3. BAHAN DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian dilaksanakan pada November 2015 hingga Desember 2016. Penelitian berlokasi di UPT Kultur Jaringan Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Laboratorium Pemuliaan Tanaman Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, dan Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya, Jl. Veteran Malang.

3.2. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan diantaranya yaitu sprayer, botol kultur, gelas ukur, gelas beker, spatula, pinset, scalpel, cawan petri, autoklaf, kompor listrik, timbangan analitik, *Laminar Air Flow Cabinet* (L AFC), pH meter, bunsen, kamera, *color chart Royal Horticultural Society* (RHS), mikroskop ollympus, oven, *heater*, gelas arloji, kaca objektif, kaca penutup, microtube, dan alat tulis.

Bahan yang digunakan diantaranya yaitu tunas rimpang 2 klon temulawak yaitu temulawak klon Jember (UB₂) dan temulawak klon Pasuruan (UB₃); larutan stok Murashige dan Skoog (MS); sukrosa 30 g L⁻¹; agar 6,8 g L⁻¹; Benzil Adenin (BA) 3 ppm (selama induksi poliplloid) dan 5 ppm (setelah induksi poliplloid); asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) pada taraf 0, 1, 2, 4, 5 ppm; akuades steril; plastik penutup; karet gelang; alkohol 70%; spirtus; bahan sterilisasi eksplan yaitu detergen 2,5%, blanlate (fungisida) 3 g L⁻¹, *sterptomycin* (bakterisida) 500 ppm, betadine, dan bayclin (Na-hipoklorit) 25%; bahan pengamatan kromosom yaitu etanol absolut, HCl 1 N, asam asetat galisal 45%, 8-Hydroxyquinolin 0,002 M, aceto orcein 2%, dan minyak immersi.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok Faktorial (RAKF) yang terdiri dari dua faktor yaitu klon temulawak dan berbagai taraf konsentrasi 2,4-D dengan 3 kali ulangan dan 2 eksplan pada masing-masing perlakuan sehingga

diperoleh 10 satuan percobaan dengan total keseluruhan 60 eksplan. Faktor pertama adalah klon temulawak yaitu klon Jember (UB₂) dan klon Pasuruan (UB₃). Faktor kedua adalah taraf konsentrasi 2,4-D (D) yaitu D₀= 2,4-D 0 ppm (kontrol); D₁= 2,4-D 1 ppm; D₂= 2,4-D 2 ppm; D₃= 2,4-D 4 ppm; dan D₄= 2,4-D 5 ppm, sehingga diperoleh 10 kombinasi perlakuan (Tabel 1) dengan denah pengacakan pada Lampiran 1.

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan antara Klon Temulawak dengan ZPT

Perlakuan	Konsentrasi 2,4-D				
	D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄
Klon temulawak					
UB ₂	UB ₂ D ₀	UB ₂ D ₁	UB ₂ D ₂	UB ₂ D ₃	UB ₂ D ₄
UB ₃	UB ₃ D ₀	UB ₃ D ₁	UB ₃ D ₂	UB ₃ D ₃	UB ₃ D ₄

3.4. Pelaksanaan Percobaan

Tahap 1. Sterilisasi alat dan rimpang temulawak

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 24 jam, kemudian botol dicuci dan disterilisasi dalam oven bersuhu 100°C selama ±12 jam. 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.

Rimpang temulawak disterilisasi dengan mencuci rimpang dengan sabun, selanjutnya dibilas dengan air mengalir, kemudian direndam dalam larutan fungisida 3 g L⁻¹ selama 30 menit. Kemudian di tiriskan dan disimpan di dalam ruang inkubasi.

Tahap 2. Pemecahan dormansi rimpang

Pemecahan dormansi rimpang temulawak dilakukan dengan tujuan untuk mempercepat pertumbuhan tunas yang digunakan sebagai objek pengamatan dalam penelitian. Pemecahan dormansi rimpang temulawak dilakukan dengan

menyemprot rimpang temulawak dengan akuades minimal 3 hari sekali, kemudian rimpang ditutup dengan plastik untuk menjaga kelembabannya.

Tahap 3. Pembuatan media untuk perbanyak tunas

Media untuk perbanyak tunas menggunakan media Murashige dan Skoog (MS) dengan komposisi yang terlampir pada Lampiran 2 dengan pH 5,8-6,0. Media MS untuk perbanyak tunas diperkaya dengan BA 5 ppm. Pembuatan media MS menggunakan larutan stok yang volumenya diukur dengan metode perhitungan sebagai berikut :

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

Keterangan:

V1 = volume larutan stok yang dicari

M1 = dosis larutan stok yang tersedia

V2 = volume medium yang akan dibuat

M2 = dosis medium yang akan dibuat

Media MS kemudian dicetak dalam botol kultur steril masing-masing dengan volume 15 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 perbanyak.

Tahap 4. Sterilisasi dan perbanyak tunas

Tunas temulawak yang telah pecah dormansi dipilih dan dipotong yang telah memilih panjang minimal 3 cm. Tunas kemudian disterilisasi dalam larutan detergen 2,5% selama 10 menit kemudian dibilas dengan air mengalir, tahap selanjutnya disterilisasi dalam larutan fungisida 3% selama 30 menit, kemudian di sterilisasi dalam larutan Bayclin 25% selama 15 menit dan dibilas dengan akuades steril sebanyak 2 kali masing-masing selama 1 menit. Tahap sterilisasi selanjutnya dilakukan dalam LAFC. Sebelum tahap sterilisasi dalam LAFC dilakukan pengupasan dan pemotongan tunas terlebih dahulu sehingga hanya menyisakan bagian tengah tunas dengan ukuran ± 1 cm. Kemudian dilakukan sterilisasi dengan *streptomycin* 500 ppm selama 15 menit selanjutnya dibilas akuades steril selama 1 menit sebanyak 1 kali, kemudian disterilkan dalam larutan betadine (10 tetes dalam 50 mL akuades steril) selama 10 menit, dan kemudian ditiriskan diatas tissue steril.

Eksplan tunas yang telah steril kemudian di tanam pada media MS untuk memperbanyak tunas dan diberikan label identitas sesuai dengan klon dan waktu penanaman. Eksplan diinkubasi dalam ruang inkubasi dan setiap satu bulan sekali dilakukan subkultur untuk memisahkan anakan dari tunas induk. Kegiatan subkultur dilakukan berkali-kali hingga diperoleh bahan tanam dengan jumlah yang sesuai dengan kebutuhan.

Tahap 5. Pembuatan media untuk induksi poliploidi

Media induksi poliploidi menggunakan media MS yang proses pembuatannya hampir sama dengan media MS yang digunakan untuk memperbanyak tunas temulawak. Perbedaan antara keduanya adalah dari konsentrasi ZPT yang digunakan dalam media. Pada media MS induksi poliploidi digunakan ZPT yang berasal dari golongan auksin yaitu asam 2,4-Diklorofeniksiasetat (2,4-D) dengan berbagai konsentrasi dan konsentrasi BA homogen dengan taraf yang lebih rendah dari media memperbanyak yaitu sebesar 3 ppm. Perhitungan konsentrasi ZPT yang digunakan terlampir pada Lampiran 3.

Tahap 6. Penanaman eksplan pada media induksi poliploidi

Eksplan yang ditanam pada media induksi poliploidi berasal dari subkultur tunas temulawak yang telah diperbanyak sebelumnya. Eksplan kemudian ditanam pada media induksi poliploidi dan diinkubasi selama 28 hari dalam ruang inkubasi bersuhu 21°C dengan lama penyinaran 16 jam per hari. Pada saat inkubasi tersebut dilakukan pengamatan non-destruktif.

Tahap 7. Subkultur eksplan pada media memperbanyak

Eksplan yang telah diinduksi poliploid selama 28 hari kemudian disubkulturkan ke dalam media memperbanyak yaitu media MS yang diperkaya dengan BA 5 ppm. Tujuan dari kegiatan subkultur tersebut adalah untuk mencegah kematian eksplan karena terlalu lama terpapar 2,4-D. Eksplan yang telah disubkultur pada media memperbanyak kemudian diinkubasi dalam ruang inkubasi bersuhu 21°C dengan lama penyinaran 16 jam per hari dan diamati pertumbuhannya sesuai dengan parameter pengamatan non-destruktif selama 56 hari.

Tahap 8. Penentuan jumlah kromosom

Penentuan jumlah kromosom dilakukan terhadap akar dan/atau kalus eksplan yang sebelumnya telah disubkulturkan pada media perbanyakan. Metode yang digunakan dalam pengamatan kromosom dijabarkan pada poin pengamatan destruktif dalam subbab parameter pengamatan. Tujuan dari pengamatan jumlah kromosom adalah untuk mengetahui perubahan jumlah kromosom temulawak sebagai respon terhadap mutagen kimia yaitu kombinasi ZPT yang telah diberikan.

3.5. Parameter Pengamatan

Terdapat 2 tahap pengamatan yang dilakukan selama penelitian yaitu pengamatan non-destruktif dan pengamatan destruktif, tahapan pengamatan sebagai berikut:

1. Pengamatan non destruktif

Pengamatan non destruktif merupakan pengamatan pertumbuhan tanaman yaitu meliputi pengamatan panjang tunas (cm), jumlah tunas, jumlah daun (helai), jumlah akar, warna eksplan, persentase eksplan yang membentuk kalus (%), waktu inisiasi kalus (MSI), dan warna kalus, dimana pengamatan dilakukan pada keseluruhan tanaman yang dimiliki. Pengamatan non destruktif dilakukan 2 periode dengan parameter pengamatan yang berbeda pada setiap periode. Pengamatan periode pertama (fase induksi poliploid) yaitu pada saat tanaman berumur 1 sampai 4 minggu setelah induksi (MSI) dengan parameter pengamatan yaitu pengamatan jumlah tunas, jumlah akar, jumlah daun (helai), panjang tunas (cm), dan warna eksplan, sedangkan pengamatan periode kedua (fase setelah induksi poliploid) dilakukan pada saat tanaman berumur 5 sampai 12 minggu setelah induksi (MSI) dengan parameter pengamatan diantaranya yaitu pengamatan jumlah tunas, jumlah akar, jumlah daun (helai), panjang tunas (cm), persentase eksplan yang membentuk kalus (%), waktu inisiasi kalus, dan warna kalus. Khusus untuk pengamatan warna eksplan dan warna kalus digunakan alat *color chart Royal Horticultural Society* (RHS), warna yang dilampirkan pada hasil merupakan warna yang paling sering muncul dari setiap eksplan yang diamati pada setiap perlakuan. Persentase eksplan yang membentuk kalus dihitung dengan rumus, sebagai berikut:

$$\% \text{ kalus} = \frac{\text{jumlah planlet berkalus}}{\text{total eksplan}} \times 100\%$$

2. Pengamatan destruktif

Pengamatan destruktif dilakukan setelah eksplan berumur 12 minggu setelah induksi (MSI) dengan jumlah sampel yang diamati sebanyak 3 buah untuk setiap perlakuan. Pengamatan destruktif yang dilakukan yaitu pengamatan jumlah kromosom.

Penentuan jumlah kromosom menggunakan bagian akar/ kalus tanaman yang masih aktif membelah sebagai sampel. Tahapan awal penentuan jumlah kromosom adalah dengan membuat preparat yaitu dengan memotong ujung akar eksplan sepanjang 0,5-1 cm atau kalus yang sehat, kemudian direndam dalam larutan fiksasi former (etanol : asam asetat glasial, 3:1) selama 45 menit pada lemari pendingin bersuhu $\pm 18^{\circ}\text{C}$. Selanjutnya akar direndam dalam larutan 8-Hydroxyquinolin 0,002 M dan diletakkan dalam lemari pendingin bersuhu $\pm 18^{\circ}\text{C}$ selama 60 menit. Akar selanjutnya dibilas dengan akuades sebanyak tiga kali dan kemudian diletakkan dalam mikrotube berisi larutan HCl 1N dan dipanaskan dalam suhu 60°C di dalam *heater* selama 10 menit, setelah dipanaskan akar/kalus dipindahkan dalam gelas arloji. Sampel kemudian ditetesi dengan aceto orcein 2% dan didiamkan selama 15 menit, selanjutnya ujung akar dipotong sepanjang 1-2 mm pada kaca objek. Selanjutnya preparat ditetesi aceto orcein 2% dan kemudian tutup dengan gelas penutup, di-*squash* dengan ibu jari dengan tujuan untuk meratakan sebaran kromosom dan jaringan akar. Kemudian preparat diamati jumlah kromosomnya dibawah mikroskop Ollympus dengan perbesaran 1000 kali dengan bantuan minyak imersi. Preparat kromosom yang memiliki sebaran yang baik terutama pada fase mitosis kemudian didokumentasikan. Kromosom yang muncul pada setiap perlakuan digambar menggunakan aplikasi Coreldraw X7, dihitung, dan dilakukan pengestimasian jumlah.

3.6. Analisis Data

Data jumlah tunas, jumlah daun, jumlah akar, dan waktu inisiasi kalus ditransformasi menggunakan transformasi akar ($\sqrt{x+0,5}$), sedangkan data persentase eksplan yang membentuk kalus ditransformasi menggunakan transformasi arcsin ($\sin^{-1}(\sqrt{y+0,5})$). Data yang didapatkan kemudian dianalisis menggunakan tabel analisis ragam/Anova (Lampiran 4-Lampiran 10) yang

digunakan untuk menguji pengaruh perlakuan terhadap pertumbuhan temulawak dan interaksi antara klon temulawak dengan ZPT. Analisis dilakukan terhadap seluruh data yang diperoleh dan apabila terdapat pengaruh nyata maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji BNT 5%.

