

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan (BBPPBPTH), Jl. Palagan Tentara Pelajar KM 15 Purwobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta, selama 3 bulan pada bulan Juli sampai September 2017.

B. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tunas aksiler yang diambil dari stek mikro *plantlet C. calothyrsus* (Gambar 3). Bahan lain yang digunakan adalah media dasar *Murashige-Skoog* (MS), agar-agar, sukrosa, NaOH, HCl, tisu, alkohol, bakterisida, fungisida, NaClO, larutan *tween*, larutan stok A, B, C dan vitamin, serta aquadest. Zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan adalah BAP dan NAA.



Gambar 3. *Plantlet C. calothyrsus* yang akan dijadikan eksplan

2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian terdiri atas autoklaf, timbangan analitik, *laminar Air Flow* (LAF), *Hot Plate Magnetic Stirer*, pH meter, *petridish*, pinset, *sprayer*, botol kultur, *Glass ware* (*beaker glass*, erlenmeyer, gelas ukur, labu takar), pipet ukur, timer, scalpel, pipet tetes, *aluminium foil*, lampu bunsen, dan rak inkubasi.

C. Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan metode eksperimental menggunakan rancangan faktorial yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Faktor pertama adalah konsentrasi BAP dengan empat aras yaitu 1 mg/l, 2 mg/l, 3 mg/l dan 4 mg/l. Faktor kedua adalah konsentrasi NAA dengan dua aras yaitu 0,1 mg/l dan 0,5 mg/l, dengan menggunakan 1 kontrol yaitu tanpa penambahan zat pengatur tumbuh (B0N0). Perlakuan yang diujikan adalah kombinasi NAA+BAP yang terdiri dari 8 aras dan 1 kontrol masing-masing perlakuan diulang sebanyak 5 kali sehingga diperoleh 45 unit perlakuan.

Tabel 1. Kombinasi perlakuan faktorial konsentrasi BAP dan NAA untuk induksi tunas *C. calothyrsus*

NAA (mg/l) \ BAP (mg/l)	0	0,1	0,5
0	B0N0	-	-
1	-	B1N0,1	B1N0,5
2	-	B2N0,1	B2N0,5
3	-	B3N0,1	B3N0,5
4	-	B4N0,1	B4N0,5

D. Cara Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan dengan urutan sebagai berikut :

1. Penyiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini dipersiapkan terlebih dahulu. Penyiapan alat dan bahan dilakukan untuk mempermudah penelitian. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini disterilisasi dengan dua cara yaitu sterilisasi basah atau menggunakan uap air bertekanan dan sterilisasi bakar.

2. Sterilisasi

Sterilisasi merupakan kegiatan dalam upaya menekan kelangsungan hidup kontaminan bahkan menghilangkan sumber kontaminan yang mutlak dilakukan dalam perbanyakan secara *in vitro*. Prinsip tersebut berkaitan dengan ruangan, peralatan maupun eksplan yang harus dalam keadaan steril.

a. Sterilisasi Eksplan

Eksplan yang digunakan merupakan *plantlet C. calothyrsus*, *plantlet* didapat dengan menumbuhkan biji *C. calothyrsus* pada media *White*. Biji direndam dalam air panas selama 4 hari, dibilas dengan aquadest kemudian direndam dalam larutan fungisida 2 g/l selama 20 menit dan direndam dalam larutan bakterisida 2 g/l selama 20 menit. Setelah itu biji direndam dalam larutan *tween* 3 tetes selama 2 menit kemudian di dalam *laminar air flow* (LAF) biji direndam pada larutan NaClO 20% selama 3 menit lalu direndam dalam alkohol 70% selama 1 menit. Biji ditiriskan dengan tisu steril kemudian ditanam pada media

White. Setelah berumur sekitar satu bulan biji yang ditanam pada media *White* kemudian dijadikan sebagai sumber eksplan.

b. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan menggunakan sterilisasi basah/uap panas bertekanan dan sterilisasi bakar. Sterilisasi basah bertekanan dilakukan dengan cara memasukkan alat dan bahan ke dalam autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 1 atm selama 25 menit. Alat-alat yang disterilkan antara lain *petridish*, pinset, erlenmeyer, pipet, scalpel, gelas piala, dan botol-botol kultur dan bahan yang disterilisasi yaitu tissu. Sterilisasi bakar dilakukan dengan cara memasukkan alat tanam ke dalam alkohol 95% dan membakarnya pada lampu spirtus sampai alkohol hilang. Sterilisasi LAF dilakukan dengan cara menyemprot dinding dan permukaan LAF dengan alkohol 70%, kemudian dikeringkan (dilap) dengan *tisu* dan menyalakan lampu UV selama 1 jam sebelum penanaman dimulai.

c. Sterilisasi Medium

Sterilisasi medium dilakukan dalam autoklaf pada temperatur 121°C selama 20 menit, dengan membungkus botol kultur dengan plastik, kemudian disterilkan dengan autoklaf.

3. Pembuatan Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini yaitu media MS (*Murashige* dan *Skoog*). Pembuatan media MS dilakukan sesuai dengan jumlah perlakuan yaitu 8 perlakuan dan 1 kontrol setiap perlakuan terdiri dari 5 ulangan, sehingga diperoleh 45 unit percobaan. Setiap botol dibuat sebanyak 30 ml. Pembuatan

media MS 500 ml untuk masing-masing perlakuan dengan mengambil larutan stok A, B, C (Tabel 2) yang masing-masing dibuat 40 kali kepekatan pembuatan yang dipekatkan menjadi 1 liter dan pembuatan larutan stok vitamin dengan 50 kali kepekatan yang dipekatkan dalam 1 liter media.

Tabel 2. Pengambilan larutan stok untuk media MS 500 ml

Bahan	Kebutuhan dalam 1 liter media	Dalam membuat media 500 ml dibutuhkan:
Stok A	25 ml	12,5 ml
Stok B	25 ml	12,5 ml
Stok C	25 ml	12,5 ml
Stok Vit.	10 ml	5 ml
Sukrosa	30 gram	15 gram
Agar	7 gram	3,5 gram

Langkah pembuatan media MS sebanyak 500 ml yaitu dengan menyiapkan gelas piala dan diberi aquadest sebanyak 300 ml, kemudian menimbang semua komponen yang dibutuhkan seperti agar dan gula, disiapkan larutan stok A, B, C, stok vitamin (Lampiran 1) dan ZPT, dan disiapkan botol kultur yang telah disterilisasi. Larutan stok A, B, C, stok vitamin dimasukkan sesuai dengan takarannya, dan ZPT sesuai perlakuan media pada gelas piala yang telah disiapkan, kemudian dihomogenisasi menggunakan stirer, selanjutnya gula dimasukkan sambil distirer dan diukur pH dengan pH meter (pH meter dimasukkan ke dalam larutan media), pH diukur hingga mencapai 5,7 jika pH terlalu rendah maka tambahkan NaOH jika pH terlalu tinggi maka tambahkan HCl. Kemudian ditambahkan aquadest sampai 500 ml, selanjutnya tuangkan agar sebanyak 3,5 gr lalu dimasukkan ke dalam *microwave* sekitar 6 menit, kemudian dipanaskan diatas hot plate stirrer sampai mendidih. Langkah berikutnya yaitu

menuangkan media ke dalam botol kultur, masing-masing botol berisi 30 ml lalu botol kultur ditutup menggunakan *aluminium foil* serta diberi label sesuai perlakuan. Botol-botol kultur yang telah berisi media kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 20 menit, kemudian media disimpan dalam ruang inkubasi selama 48 jam untuk memastikan bahwa media telah steril dan tidak terkontaminasi oleh mikroorganisme.

4. Inokulasi

Inokulasi dilakukan dengan menggunakan bahan tanam stek mikro biji yang telah berumur 1 bulan. Penggunaan bahan tanam stek mikro dari biji yang telah berumur 1 bulan dilakukan karena terbatasnya sumber eksplan yang digunakan dalam penelitian ini. Pada prinsipnya stek mikro memiliki kesamaan dengan stek makro (stek pada tanaman pada umumnya). Tahapan ini dilakukan dengan cara memotong *plantlet* menggunakan scalpel. *C. calothyrsus* dipotong 3 nodul paling atas, kemudian ditanam (diinokulasi) pada media sesuai perlakuan. Tahap ini dilakukan secara aseptis didalam *Laminar Air Flow* yang sebelumnya telah disterilkan menggunakan alkohol 70% dan lampu UV selama 1 jam.



Gambar 4. Eksplan *C. calothyrsus*

5. Inkubasi

Eksplan disimpan dalam ruang inkubasi dengan kondisi terang di bawah lampu fluoresen dengan intensitas 800-2000 lux dan suhu 23°C. Eksplan ditumbuhkan dalam ruang inkubasi, kemudian diamati selama 2 bulan.

E. Parameter Yang Diamati

Pengamatan dilakukan 3 kali seminggu sampai akhir pengamatan selama 2 bulan. Data diperoleh dengan cara mengamati 6 parameter sebagai berikut:

1. Persentase Eksplan Hidup (%)

Pengamatan dilakukan dengan melihat jumlah eksplan yang hidup dan dinyatakan dalam persen (%), dilakukan seminggu 3 kali selama 8 minggu.

$$\text{Presentase eksplan hidup} = \frac{\text{Jumlah eksplan hidup}}{\text{Jumlah eksplan total}} \times 100\%$$

2. Persentase *Browning* (%)

Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah eksplan yang mengalami *browning*, dinyatakan dalam persen (%), dilakukan pada minggu ke-8.

$$\text{Presentase } \textit{browning} = \frac{\text{Jumlah eksplan } \textit{browning}}{\text{Jumlah eksplan total}} \times 100\%$$

3. Persentase Kontaminasi (%)

Pengamatan dilakukan dengan mengamati jumlah eksplan yang mengalami kontaminasi bakteri maupun jamur, dinyatakan dalam persen (%), dilakukan pada minggu ke-8.

$$\text{Presentase eksplan kontaminasi} = \frac{\text{Jumlah eksplan terkontaminasi}}{\text{Jumlah eksplan total}} \times 100\%$$

4. Saat Tunas Muncul (hari)

Pengamatan dilakukan dengan mengamati hari saat pertama kali tunas muncul pada masing-masing eksplan selama 8 minggu.

5. Pertambahan Tinggi Tunas (cm)

Pengamatan dilakukan dengan mengukur panjang tunas dari setiap perlakuan menggunakan alat ukur penggaris, dilakukan seminggu 3 kali selama 8 minggu.

6. Pertambahan Jumlah Daun

Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah daun yang tumbuh dari setiap perlakuan, dilakukan seminggu 3 kali selama 8 minggu.

7. Jumlah Tunas

Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah tunas yang tumbuh dari setiap perlakuan, dilakukan seminggu 3 kali selama 8 minggu.

F. Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis menggunakan program *Statistical Analysis System* (SAS) dengan metode *Analysis Of Variance* (ANOVA) taraf kesalahan $\alpha = 5\%$. Apabila terdapat pengaruh yang signifikan dari perlakuan yang diujikan, maka dilakukan uji lanjutan menggunakan Uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan taraf kesalahan $\alpha = 5\%$. Selanjutnya dilakukan uji kontras untuk mengetahui perbedaan pengaruh antara perlakuan faktorial (perlakuan yang diberi kombinasi ZPT) dengan perlakuan kontrol (media tanpa ZPT). Hasil analisis ditampilkan dalam bentuk Tabel, grafik atau histogram.