

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan (BBPPBPTH) Yogyakarta selama 1 bulan yaitu pada bulan Agustus - September 2017.

B. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan

Bahan yang digunakan adalah eksplan nodus bambu petung yang diambil dari lapangan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan (BBPPBPTH) Yogyakarta. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah media Murashige dan Skoog (MS), alkohol 70%, HCl 1 N, KOH 1 N, HgCl₂ 0,01%, NaClO, deterjen, bakterisida, fungisida, tween, agar-agar bubuk, BAP, NAA, Sukrosa, aquades, aluminium foil, plastik *wrapping*, korek api, tisu, kertas saring, kertas label.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah timbangan analitik, erlenmeyer, pipet, *magnetic stirrer*, *autoclave*, gelas beker, gelas ukur, cawan petri, mikro pipet eppendorf, pH meter, gunting, pinset, skalpel, bunsen, *Laminar Air Flow* (LAF), sendok, botol kultur, oven, dan lemari pendingin (kulkas).

C. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental menggunakan rancangan faktorial yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap

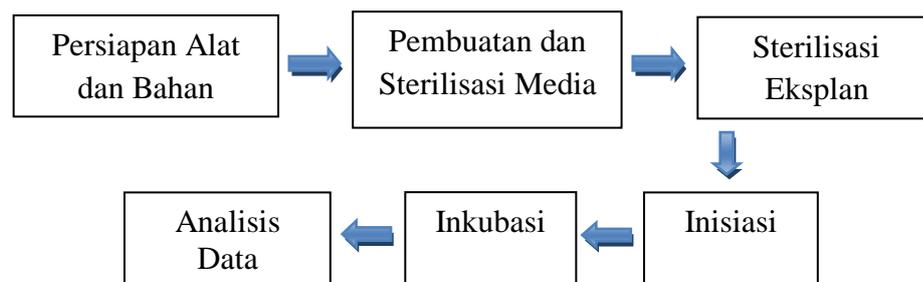
(RAL). Faktor pertama adalah konsentrasi BAP dengan tiga aras yaitu 1 mg/l, 2 mg/l, dan 3 mg/l. Faktor kedua adalah konsentrasi NAA dengan dua aras 0,1 mg/l dan 0,5 mg/l dengan menggunakan 1 kontrol yaitu tanpa penambahan zat pengatur tumbuh (B_0N_0). Perlakuan yang diujikan adalah kombinasi BAP+NAA yang terdiri dari 6 perlakuan dan 1 kontrol. Setiap perlakuan dilakukan sebanyak 10 ulangan, sehingga seluruh contoh uji coba berjumlah 70. Kombinasi perlakuan faktorial disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan Faktorial Konsentrasi BAP dan NAA untuk Induksi Tunas Bambu Petung

BAP (mg/l)	NAA (mg/l)		
	0	0,1	0,5
0	B_0N_0	-	-
1	-	$B_1N_{0,1}$	$B_1N_{0,5}$
2	-	$B_2N_{0,1}$	$B_2N_{0,5}$
3	-	$B_3N_{0,1}$	$B_3N_{0,5}$

D. Cara Penelitian

Tahapan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas beberapa tahapan. Tahapan penelitian seperti pada Gambar 3.



Gambar 3. Tahapan Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan Alat dan Bahan

Langkah awal dalam penelitian ini adalah mempersiapkan bahan dan alat yang akan digunakan. Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini harus disterilisasi terlebih dahulu. Sterilisasi alat dilakukan dengan cara sterilisasi uap panas yang dilaksanakan di ruang persiapan dan sterilisasi bakar dilaksanakan di dalam LAF. Alat-alat gelas seperti cawan petri dan alat – alat logam seperti pinset, gunting, skalpel dibungkus dengan alumunium foil serta botol kultur disterilisasi didalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 20-30 menit (Daisy dan Ari, 1994). Botol kultur yang sudah steril selanjutnya disimpan pada tempat yang bersih dan siap digunakan. Alat-alat tanam seperti pinset dan skalpel dapat disterilkan kembali di dalam LAF dengan pemanasan di atas bunsen, setelah dicelupkan pada alkohol 70% sebelum penanaman dilakukan.

2. Pembuatan Media

Media yang digunakan adalah media MS (Murashige dan Skoog). Pembuatan media tumbuh yang dipersiapkan disesuaikan dengan jumlah perlakuan yaitu 6 perlakuan ditambah 1 kontrol, dari perlakuan tersebut didapat 70 unit percobaan, dan masing-masing botol kultur dibuat sebanyak 30 ml media. Untuk pembuatan media MS 1 liter harus mengambil larutan stok A, B, C (Tabel 2) yang masing-masing dibuat 40 kali kepekatan pembuatan yang dipekatkan menjadi 1 liter.

Tabel 2. Pengambilan Larutan Stok Untuk Pembuatan Media MS 300 ml Setiap Perlakuan

Bahan	Kebutuhan dalam 1 liter media	Dalam membuat media 300 ml dibutuhkan :
Stok A	25 ml	7,5 ml
Stok B	25 ml	7,5 ml
Stok C	25 ml	7,5 ml
Vitamin	10 ml	3 ml
Sukrosa	30 gram	9 gram
Agar	7 gram	2,1 gram

Langkah-langkah membuat media yaitu pertama menimbang semua komponen yang di butuhkan seperti agar dan gula, menyiapkan semua larutan stok, vitamin, ZPT, gelas ukur, aquades, serta botol-botol kultur. Langkah selanjutnya untuk membuat media MS sebanyak 300 ml yaitu dengan memasukkan larutan stok A, B, C, stok vitamin sesuai dengan takarannya dan memasukkan ZPT sesuai perlakuan pada gelas piala yang telah disiapkan. Selanjutnya memasukkan gula sebanyak 9 gram dan menambahkan aquades sebanyak 200 ml lalu dihomogenisasi menggunakan *stirrer* sekaligus mengukur pH.

Pengukuran pH menggunakan pH meter yang dimasukkan kedalam larutan media (pH normal berkisar antara 5,7-5,8), jika pH terlalu rendah maka tambahkan NaOH jika pH terlalu tinggi maka tambahkan HCl. Kemudian ditambahkan aquadest sehingga mencapai 300 ml, lalu menuangkan agar bubuk sebanyak 2,1 gram dan dimasukkan ke dalam *microwave* sekitar 6 menit, kemudian panaskan media menggunakan *hotplate* dan *distirrer* 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. Media MS dalam botol disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 30 menit, kemudian media disimpan di dalam ruang inkubasi selama 48 jam untuk memastikan bahwa media telah steril dan tidak terkontaminasi oleh mikroorganisme.

3. Sterilisasi Eksplan

Eksplan nodus bambu petung yang sudah dipotong dengan ukuran 3-5 cm dimasukkan kedalam botol yang berisi aquades, selanjutnya di bawa ke ruang persiapan. Eksplan dipindahkan ke dalam wadah yang telah terisi larutan deterjen lalu eksplan disikat dengan sikat gigi sehingga bulu-bulu yang menempel pada permukaan kulit bambu hilang. Langkah berikutnya eksplan yang sudah disikat langsung dipindah kedalam botol yang berisi aquades (bilas), botol diisi kembali dengan aquades dan ditambahkan tween 4-5 tetes didalamnya, *distirrer* selama 1 jam (bilas), kemudian dimasukkan larutan fungisida 200 mg dan *distirrer* selama 30 menit lalu dibilas, dimasukkan larutan bakterisida 200 mg dan *distirrer* selama 30 menit kemudian dibilas. Langkah terakhir eksplan langsung dibawa ke LAF.

Laminary Air Flow (LAF) sebelum digunakan terlebih dahulu disemprot menggunakan alkohol 70% dan dilap dengan menggunakan tisu. Alat-alat dan media yang akan digunakan di UV selama 30 menit, kemudian lampu neon dan *blower* dinyalakan. Tahapan sterilisasi di dalam LAF yaitu eksplan direndam dalam HgCl₂ 0,01% selama 10 menit lalu dibilas menggunakan aquades selama 5 menit, selanjutnya eksplan direndam dalam larutan NaClO 20% selama 7 menit

lalu dibilas dengan aquades selama 5 menit, kemudian eksplan direndam di dalam larutan NaClO 10% selama 7 menit dan dibilas dengan aquades selama 5 menit, langkah terakhir yaitu eksplan direndam kembali menggunakan larutan NaClO 5% selama 7 menit dan dibilas menggunakan aquades selama 5 menit. Langkah selanjutnya yaitu memindahkan eksplan ke dalam *petridish* lalu selubung yang menutupi bakal tunas dikelupas menggunakan skalpel dan pinset yang sudah direndam didalam alkohol 95% lalu dibakar di atas bunsen dan proses ini harus dilakukan dengan hati-hati. Langkah tersebut bertujuan supaya tunas lebit cepat muncul dan terlihat sehingga saat pengamatan bisa dilakukan dengan mudah. Langkah terakhir yaitu eksplan direndam kedalam aquades untuk dibilas kembali lalu eksplan diletakkan didalam *petridish* yang telah dilapisi kertas saring untuk dikeringanginkan, lalu ditutup kembali dengan *petridish*, selanjutnya eksplan siap untuk inisiasi.

Deterjen merupakan surfaktan yang mampu menghilangkan kotoran yang berada di permukaan eksplan. Bakterisida dan fungisida digunakan untuk menghilangkan kontaminan jamur dan bakteri. Larutan pemutih (Bayclin) mengandung bahan aktif Natrium Hipoklorit (NaClO) sebesar 5,25%. NaClO yang terionisasi menjadi ion klorida (Cl^-) akan mengoksidasi protein membran sel mikrobial sehingga terjadi denaturasi protein yang mengakibatkan mikrobial mengalami kematian. Penggunaan HgCl_2 (Merkuri klorida) ini harus hati-hati karena bersifat racun (Daisy dan Ari. 1994).

4. Inisiasi

LAF disemprot alkohol 70%, lampu UV dinyalakan selama 1 jam sebelum digunakan, kemudian *blower* dinyalakan 10 menit sebelum kegiatan inisiasi dilaksanakan. Eksplan bambu petung yang telah melalui tahapan sterilasi di dalam LAF siap untuk ditanam didalam botol kultur yang telah berisi media MS. Tahapan inisiasi ini harus dilakukan dengan hati-hati menggunakan pinset steril yang sebelumnya sudah dibakar di atas bunsen. Setiap botol ditanam sebanyak 1 eksplan. Pada saat penanaman mulut botol menghadap kearah bunsen. Sebelum maupun setelah penanaman pinggir mulut botol didekatkan dengan api bunsen untuk mencegah kontaminasi. Botol yang telah ditanam ditutup kembali dengan aluminium foil dan dilapisi dengan plastik *wrapping* kemudian disimpan di dalam ruang kultur.

5. Inkubasi

Botol kultur diletakkan pada rak-rak yang telah disterilkan dengan menyemprotkan alkohol 70%. Suhu ruang inkubasi sekitar 21 - 23°C dengan kelembaban berkisar 70% yang dilengkapi lampu-lampu neon dengan penyinaran selama 16 jam setiap harinya.

6. Pengamatan

Pengamatan terhadap persentase kontaminasi, jumlah tunas dan tinggi eksplan dilakukan setiap tiga kali dalam seminggu, pengamatan dilakukan sampai umur eksplan mencapai 4 minggu setelah tanam.

E. Parameter yang Diamati

1. Persentase Eksplan Hidup (%)

Jumlah eksplan yang hidup dihitung setiap minggu. Kriteria eksplan hidup apabila warna hijau atau tumbuh tunas pada eksplan.

$$\text{Rumus : \% eksplan hidup} = \frac{\text{Jumlah eksplan hidup}}{\text{Jumlah total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

2. Persentase Eksplan Terkontaminasi (%)

Eksplan yang terkontaminasi dihitung setiap minggu. Eksplan dikatakan terkontaminasi apabila ada jamur atau bakteri pada eksplan atau media kultur tersebut.

Rumus :

$$\% \text{ eksplan kontaminasi} = \frac{\text{Jumlah eksplan kontaminasi}}{\text{Jumlah total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

3. Persentase Eksplan Mati (%)

Eksplan yang mati dihitung setiap minggu, kriteria eksplan mati apabila eksplan berwarna coklat atau kehitaman pada eksplan lebih dari separuh eksplan dan tidak mengalami pertumbuhan.

$$\text{Rumus : \% eksplan mati} = \frac{\text{Jumlah eksplan kontaminasi}}{\text{Jumlah total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

4. Waktu Munculnya Tunas (hari)

Tunas yang muncul pertama kali pada masing-masing perlakuan diamati mulai hari pertama penanaman sampai munculnya tunas dan pengamatan dilakukan setiap hari selama 4 minggu.

5. Jumlah Tunas

Jumlah tunas yang baru muncul dari eksplan tunas aksiler bambu petung diamati dengan cara menghitung tunas yang tumbuh dari setiap tanaman yang hidup. Eksplan yang telah diinokulasi kemudian dihitung jumlah tunas yang terbentuk setiap seminggu sekali selama 4 minggu.

6. Tinggi Tunas (cm)

Tinggi tunas diukur menggunakan penggaris, pengukuran dilakukan dari pangkal tunas tempat munculnya tunas sampai ujung tunas yang tertinggi, dilakukan seminggu sekali hingga minggu ke-4. Tunas yang diukur adalah tunas yang tertinggi.

F. Analisis Data Penelitian

Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis menggunakan program *Statistical Analysis System* (SAS) dengan metode *Analysis Of Variance* (ANOVA) pada taraf $\alpha = 5\%$. Apabila terdapat beda nyata antar perlakuan maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf $\alpha = 5\%$. Selanjutnya dilakukan uji kontras untuk mengetahui perbedaan pengaruh antara perlakuan faktorial (perlakuan yang diberi kombinasi ZPT) dengan perlakuan kontrol (B_0N_0). Hasil analisis disajikan dalam bentuk tabel, grafik, atau histogram.