

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), Sleman. Penelitian ini dilaksanakan selama 3 bulan pada bulan Juni sampai Agustus tahun 2017.

B. Alat dan Bahan Penelitian

B.1. Alat :

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain timbangan analitik, pH meter, *Laminar Air Flow* (LAF), *autoclave*, *magnetic stirrer*, dan alat pendukung lainnya.

B.2. Bahan :

B.2.1 Bahan tanaman

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah eksplan tanaman jati (*Tectona grandis L.*) klon 13 dari *grafting* umur 6 bulan.

B.2.2 Media

Media yang digunakan adalah media MS (Murashige dan Skoog), sukrosa, agar, BAP, Kinetin, Giberelin, alkohol 70% dan alkohol 96%.

C. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode percobaan laboratorium, bentuk rancangan perlakuan faktor tunggal yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan terdiri dari 4 aras dengan perbedaan konsentrasi GA₄ sebagai

faktor perlakuan. Perlakuan yang diberikan adalah media MS + 0,15 mg/l Kinetin + 0,05 mg/l BAP dengan penambahan konsentrasi GA₄ yaitu 0 mg/l GA₄; 0,1 mg/l GA₄; 0,3 mg/l GA₄; dan 0,5 mg/l GA₄. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 10 kali, sehingga didapatkan unit penelitian sebanyak 40 unit.

D. Cara Penelitian

Tahapan kegiatan untuk mendukung penelitian elongasi jati meliputi: Sterilisasi alat, pembuatan medium, inokulasi, inkubasi, pengamatan dan analisis data.

D.1. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat berfungsi membersihkan alat-alat yang akan digunakan dalam proses kultur *in vitro*. Sterilisasi alat dilakukan melalui dua cara yaitu sterilisasi panas kering dan sterilisasi panas basah. Sterilisasi panas kering dilakukan menggunakan *mini sterilizer*. Alat inokulasi disterilisasi dengan memanaskan alat inokulasi (*dissecting kit*) pada suhu 200°C selama 5 menit sebelum digunakan. Sterilisasi panas basah terdapat dua macam yaitu dengan penggunaan uap bertekanan dan tanpa uap bertekanan. Sterilisasi panas basah pada uap bertekanan dilakukan dengan autoklaf. Alat-alat yang digunakan untuk penanaman dicuci dengan deterjen hingga bersih kemudian disterilkan di dalam autoklaf dengan tekanan 1 atm dan suhu 121°C selama 30 menit. Alat-alat yang disterilkan dengan metode panas uap adalah botol kultur, alat tanam, skalpel, *aluminium foil*, *petridish*, dan erlenmeyer. Sterilisasi LAF dilakukan dengan menyemprotkan alkohol 70% ke seluruh permukaan LAF kemudian

dikeringkan dengan tisu dan penyalaan lampu UV selama satu jam sebelum LAF digunakan.

D.2. Pembuatan medium

Medium MS (Lampiran 1.) digunakan untuk 40 botol perlakuan. ZPT 0,15 mg/l Kinetin dan 0,05 mg/l BAP ditambahkan pada media MS. GA₄ ditambahkan sesuai perlakuan. Masing-masing botol berisi sekitar 20 ml sehingga dibutuhkan 800 ml medium yang terbagi menjadi 4 perlakuan. Pembuatan media dilakukan berdasarkan perlakuan, sehingga media dibuat sebanyak 200 ml/perlakuan.

Larutan stok media MS (Lampiran 1.) dibuat untuk memudahkan pembuatan media. Larutan stok disimpan dalam 4 jenis larutan stok yaitu stok A sebagai stok senyawa makro, stok B untuk senyawa mikro, stok C untuk senyawa NaEDTA dan (FeSO₄.7H₂O), serta stok vitamin. Senyawa pada stok A terdiri dari ammonium nitrat (NH₄NO₃), kalium nitrat (KH₂PO₄), monopotassium nitrat (KNO₃) dan magnesium sulfat (MgSO₄). Stok B terdiri dari tembaga(II) sulfat (CuSO₄.5H₂O), seng sulfat (ZnSO₄.7H₂O), *sodium molybdate* (Na₂MoO₄.2H₂O), *cobalt(II) chlorida* (CoCl₂.6H₂O) dan *calcium chlorida* (CaCl₂.2H₂O). Larutan stok C terdiri dari senyawa asam etilena diamina tetra asetat (NaEDTA) dan besi(II) sulfat (FeSO₄.7H₂O) yang disimpan dalam botol berwarna gelap atau botol yang ditutup dengan aluminium foil. Stok C disimpan dalam botol kedap cahaya agar terhindar dari oksidasi karena senyawa pada stok C khususnya Fe bersifat mudah teroksidasi karena sinar. Larutan stok Vitamin terdiri dari senyawa *pyridoxine HCL*, *thiamine HCL*,

nicotinic acid, dan *glysine*. Jumlah larutan stok yang diambil untuk membuat media MS dalam pembuatan media MS untuk 100 ml media disajikan pada tabel 1 :

Tabel 1. Pengambilan larutan stok untuk media MS 200 ml.

Bahan	Kebutuhan dalam 1 liter media	Dalam membuat media 200 ml dibutuhkan :
Stok A	25 ml	5 ml
Stok B	25 ml	5 ml
Stok C	25 ml	5 ml
Stok Vitamin	10 ml	2 ml
Sukrosa	30 gram	6 gram
Agar	7 gram	1,4 gram

Semua stok dan ZPT sesuai perlakuan dimasukkan ke dalam *erlenmeyer*. Larutan bahan digojok hingga semua bahan larut, aquadest ditambahkan hingga 160 ml. Sukrosa dan agar ditambahkan setelah larutan media homogen. Derajat keasaman atau pH media ditetapkan hingga mencapai pH 5,6-5,7. NaOH 1N digunakan untuk meningkatkan keasaman, sedangkan HCl 1N untuk menurunkan keasaman. Langkah selanjutnya adalah penambahan agar dan aquadest hingga volume larutan menjadi 200 ml. Larutan media dipanaskan di dalam oven sampai larutan panas selama 3 menit. Media dididihkan dengan *hot plate stirrer*. Media yang sudah mendidih kemudian dituangkan ke botol kultur. Botol kultur kemudian ditutup menggunakan aluminium foil. Botol kultur disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 20 menit pada tekanan 1 atm. Media disimpan di dalam ruang inokulasi.

D.3. Inokulasi

Penanaman dilakukan dalam *laminar air flow cabinet* yang telah disterilkan dengan alkohol 70% dan disinari dengan ultraviolet selama 60 menit. Alat tanam yang digunakan harus steril. Pinset dipanaskan dalam *mini sterilizer* selama 5 menit pada suhu 200°C. Pinset diletakkan diatas cawan petri hingga hangat agar tidak merusak jaringan eksplan. Pinset digunakan untuk 5 kali subkultur sebelum disterilisasi kembali. Eksplan yang digunakan adalah tunas hasil induksi tunas yang kemudian ditanam pada medium perlakuan.

D.4. Inkubasi

Eksplan diinkubasi selama 6 minggu dalam ruang inkubasi dengan suhu 23°-25° C dengan kelembaban 60-70%, intensitas cahaya 1000-3000 lux dengan mengatur lampu TL 16 jam menyala dan 8 jam mati menggunakan *timer*. Eksplan selanjutnya diamati berdasarkan parameter yang digunakan dalam penelitian.

E. Parameter yang Diamati

Parameter yang diamati pada penelitian :

E.1. Persentase eksplan hidup (%)

Eksplan diamati setiap minggu selama 6 minggu selama proses inkubasi. Eksplan hidup merupakan eksplan yang jaringannya berkembang dan tidak mengalami pencoklatan. Rumus persentase eksplan hidup:

$$\text{Persentase eksplan hidup} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang hidup per perlakuan}}{\text{Jumlah eksplan per perlakuan}} \times 100\%$$

E.2. Persentase eksplan terkontaminasi (%)

Kontaminasi pada eksplan diamati selama 6 minggu, eksplan terkontaminasi apabila terdapat jamur dan bakteri di dalam medium kultur dan permukaan eksplan dinyatakan dalam persen. Persentase kontaminasi dihitung diakhir pengamatan berdasarkan rumus

$$\text{Persentase eksplan terkontaminasi} = \frac{\text{Jumlah kontaminasi per perlakuan}}{\text{Jumlah eksplan per perlakuan}} \times 100\%$$

E.3. Persentase eksplan *browning* (%)

Eksplan yang mengalami *browning* diamati setiap minggu sekali selama 16 minggu. Kriteria eksplan yang *browning* adalah eksplan yang mengalami pencoklatan lebih dari 50%. Persentase *browning* dihitung dengan rumus :

$$\text{Persentase eksplan } \textit{browning} = \frac{\text{Jumlah } \textit{Browning} \text{ per perlakuan}}{\text{Jumlah eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

E.4. Tinggi tunas

Pengukuran tinggi tunas dilakukan dengan mengukur eksplan dari pangkal sampai pucuk. Pengukuran dilakukan satu kali tiap minggu selama 6 minggu. Tinggi tunas yang diukur adalah tunas awal hasil induksi tunas.

E.5. Jumlah tunas tiap perlakuan

Penghitungan jumlah tunas dilakukan dengan menghitung seluruh tunas yang terbentuk selama proses inkubasi berlangsung. Penghitungan dilakukan satu minggu tiap minggu selama 6 minggu.

E.6. Jumlah daun

Daun tiap eksplan yang terbentuk dan telah membuka dihitung untuk mendapatkan jumlah daun. Pengamatan dilakukan seminggu sekali selama 6 minggu.

F. Analisis Data

Data hasil pengamatan elongasi tunas jati secara *in vitro* kemudian diolah dan dianalisis dengan sidik ragam pada taraf $\alpha = 5\%$. Uji lanjut menggunakan Uji Jarak Duncan (DMRT) pada taraf $\alpha = 5\%$ dilakukan apabila terdapat beda nyata. Hasil olah data disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.