

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian telah dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Besar Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan (BBPBPTH), Sleman, Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan selama 5 bulan pada bulan april sampai dengan bulan agustus 2017.

B. Bahan dan Alat Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain timbangan analitik, *Hot Plate Magnetic Stirrer*, botol kultur, pH stik, *petridish*, pipet tetes, gelas ukur, *Laminar Air Flow* (LAF), *dissecting kits*, autoklaf, dan bunsen.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah *plantlet* sengon terseleksi toleran karat tumor. Seleksi berdasarkan tidak munculnya gejala serangan penyakit karat tumor berupa *gall* di seluruh bagian tanaman induk yang digunakan sebagai sumber materi kultur jaringan. Media dasar yang digunakan adalah media MS (*Murashige and Skoog*). Zat pengatur tumbuh BAP dan NAA, sukrosa sebagai sumber karbon, agar sebagai pematid media dan akuades sebagai pelarut. Bahan lain sesuai standar kultur jaringan seperti untuk menjaga lingkungan aseptis adalah spritus, plastik wrap dan alkohol 90 %.

C. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental laboratorium yang disusun dalam Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) dengan kelompok perlakuan adalah jenis klon yang disusun dalam rancangan perlakuan faktorial $3 \times 3 + 1$ Kontrol. 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 tiga aras yaitu 0,5 mg/l, 0,75 mg/l dan 1 mg/l, dengan menggunakan 1 kontrol yaitu media tanpa penambahan zat pengatur tumbuh BAP dan NAA (MS_0). Setiap perlakuan diulang sebanyak 6 kali, setiap ulangan terdiri dari 1 sampel, sehingga unit percobaan yang didapatkan sebanyak 60 unit. Kombinasi perlakuan faktorial disajikan pada tabel 1.

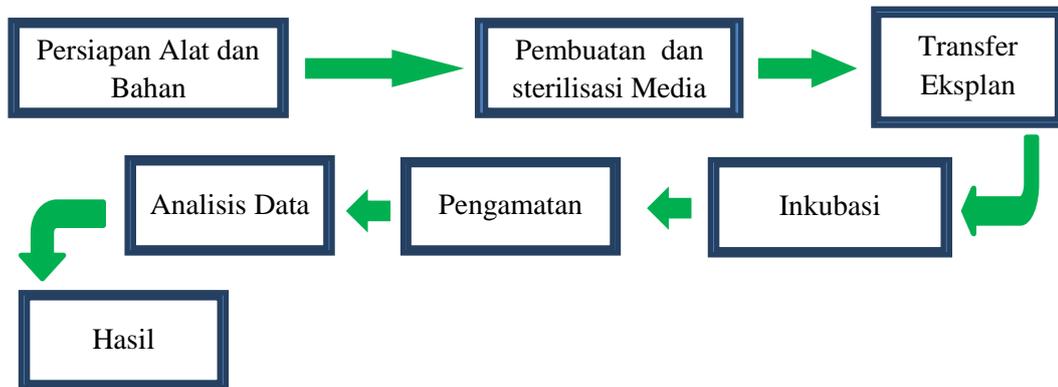
Tabel 1. Kombinasi Perlakuan Faktorial Konsentrasi BAP dan NAA untuk Induksi Tunas Sengon Toleran Karat Tumor.

BAP (mg/l) \ NAA (mg/l)	NAA (mg/l)		
	0,50	0,75	1,00
1	B ₁ N ₁	B ₁ N ₂	B ₁ N ₃
2	B ₂ N ₁	B ₂ N ₂	B ₂ N ₃
3	B ₃ N ₁	B ₃ N ₂	B ₃ N ₃

D. Cara Penelitian

Tata cara dalam penelitian ini mencakup beberapa tahap. Tahapan awal yang dilakukan adalah persiapan alat dan bahan untuk inokulasi eksplan. Tahap selanjutnya adalah pembuatan media yang akan digunakan eksplan sebagai tempat tumbuh. Inokulasi eksplan dilakukan setelah media dibuat. Eksplan diletakkan di tempat yang sesuai lingkungan tumbuh eksplan dan tahap ini adalah inkubasi.

Pengamatan dilakukan selama inkubasi dan dilakukan pencatatan periodik agar mendapatkan data. Data dianalisa untuk diolah agar didapatkan hasil penelitian yang telah dilakukan (Gambar 4).



Gambar 4. Bagan alir tahapan pelaksanaan penelitian kajian konsentrasi BAP dan NAA pada induksi tunas *in vitro* sengon (*Falcataria moluccana*) toleran karat tumor.

1. Persiapan Alat dan Bahan

Langkah pertama dalam penelitian ini adalah mempersiapkan bahan dan alat yang akan digunakan. Semua alat dan bahan yang diperlukan disiapkan sejak awal penelitian. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari : Planlet sengon toleran karat tumor, media MS (*Murashige and skoog*), BAP, NAA, sukrosa, agar dan alkohol 90%. Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari : timbangan analitik, *Hot Plate Magnetic Stirrer*, botol kultur, pH stik, pipet tetes, gelas ukur, autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF), aluminium foil dan *dissecting kits*.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini disterilisasi dengan dua cara yaitu sterilisasi basah atau menggunakan uap air bertekanan dan sterilisasi bakar. Sterilisasi basah atau menggunakan uap air bertekanan

dilakukan dengan memasukkan botol kultur, *petridish*, pinset, skalpel, gelas ukur, gelas kimia dan *erlenmeyer* yang telah dibungkus menggunakan kertas payung ke dalam autoklaf pada suhu 121°C bertekanan 1 atm selama 1 jam. Sterilisasi bakar dilakukan menggunakan nyala api bunzen di dalam LAF (*Laminar Air Flow*) dengan cara mencelupkan alat yang akan disterilisasi ke dalam larutan alkohol 90%, kemudian dibakar pada nyala api bunzen. Alat yang dibakar adalah skalpel, pisau dan pinset yang digunakan untuk memotong dan menanam eksplan.

2. Pembuatan dan Sterilisasi Media

Media yang digunakan pada penelitian ini adalah media *Murashige and Skoog* (MS). Media MS yang dibuat sebanyak 1000 ml yang digunakan untuk 10 perlakuan setiap perlakuan terdiri dari 5 botol, setiap botol kultur diisi sebanyak 20 ml media MS. Media MS mengandung senyawa-senyawa mikro dan makro, sehingga dalam pembuatannya dilakukan pembuatan larutan stok. Larutan stok yang digunakan telah tersedia. Larutan stok yang digunakan adalah larutan stok A, stok B, stok C dan stok Vitamin. Larutan stok A terdiri dari senyawa amonium nitrat (NH_4NO_3), kalium nitrat (KNO_3), magnesium sulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) dan monopotassium fosfat (KH_2PO_4), kalium iodide (KI), asam borat (H_3BO_3), mangan sulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), *zinc sulfat* ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), *sodium molybdate* ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), tembaga(II) sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), kobalt(II) klorida ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Larutan stok B terdiri dari senyawa kalsium klorida ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Larutan stok C terdiri dari senyawa asam etilena diamina tetra asetat (NaEDTA) dan besi(II) sulfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

dibuat dalam botol berwarna gelap atau botol yang ditutup dengan aluminium foil. Hal tersebut bertujuan untuk menghindarkan larutan stok Fe dari paparan sinar matahari, karena senyawa besi (Fe) sangat peka terhadap sinar matahari. Larutan stok Vitamin terdiri dari senyawa *pyridoxine HCL*, *thiamine HCL*, *nicotinic acid*, dan *glysine*. Komposisi media MS disajikan dalam lampiran I. Dalam pembuatan media MS untuk 100 ml media, jumlah larutan stok yang diambil untuk membuat media MS disajikan pada tabel 2

Tabel 2. Pengambilan larutan stok untuk media MS 100 ml.

Bahan	Kebutuhan dalam 1 liter media	Dalam membuat media 100 ml dibutuhkan :
Stok A	25 ml	2,5 ml
Stok B	25 ml	2,5 ml
Stok C	25 ml	2,5 ml
Stok Vitamin	10 ml	1 ml
Sukrosa	30 gram	3 gram
Agar	9 gram	0,9 gram

Tabel 3. Perhitungan penambahan ZPT

Perlakuan	Konsentrasi (mg/l)		Pengambilan untuk 100 ml media	
	BAP	NAA	BAP	NAA
B1N1	1	0,50	0,1 mg	0,050 mg
B1N2	1	0,75	0,1 mg	0,075 mg
B1N3	1	1,00	0,1 mg	0,100 mg
B2N1	2	0,50	0,2 mg	0,050 mg
B2N2	2	0,75	0,2 mg	0,075 mg
B2N3	2	1,00	0,2 mg	0,100 mg
B3N1	3	0,50	0,3 mg	0,050 mg
B3N2	3	0,75	0,3 mg	0,075 mg
B3N3	3	1,00	0,3 mg	0,100 mg

Setelah semua larutan stok dimasukkan dalam 10 botol media, masing-masing botol ditambahkan ZPT sesuai perlakuan, seperti yang tersaji pada tabel 3. Kemudian ditambah sukrosa sebanyak 3 gram dan ditambahkan aquades hingga volume mencapai 100 ml. Kemudian pH media ditepatkan menjadi pH 5,74, kemudian ditambahkan agar-agar sebanyak 0,9 gram untuk memadatkan media dan dipanaskan dalam microwave selama 6 menit. Selanjutnya media dituang ke dalam botol media. Masing-masing botol berisi 20 ml. Media MS dalam botol disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 30 menit. Selanjutnya media disimpan dalam ruang inkubasi selama 2 hari untuk memastikan bahwa media telah steril dan tidak terkontaminasi oleh mikroorganisme.

3. Transfer Eksplan

Pada penelitian ini eksplan yang digunakan berupa planlet sengon, sehingga dilakukan proses stek mikro terlebih dahulu. Pada prinsipnya stek mikro memiliki kesamaan dengan stek makro (stek pada tanaman pada umumnya). Tahapan ini dilakukan dengan cara memotong planlet menggunakan skalpel, sengon dipotong 2 nodul paling atas. Umumnya eksplan yang berasal dari jaringan tanaman yang masih muda (juvenil) lebih mudah tumbuh dan beregenerasi dibandingkan dengan jaringan yang telah terdiferensiasi lanjut. Jaringan muda umumnya memiliki sel-sel yang aktif membelah dengan dinding sel yang belum kompleks sehingga lebih mudah dimodifikasi dalam kultur dibandingkan jaringan tua. Oleh karena itu, dipilih 2 nodul paling atas, kemudian ditanam (diinoulasi) pada media yang telah

disiapkan. Tahap ini dilakukan secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* yang sebelumnya telah disterilkan menggunakan alkohol 70% dan lampu UV selama 1 jam.

4. Inkubasi

Tahap ini adalah tahapan menyimpan botol steril yang berisi eksplan pada lingkungan yang steril. Dalam ruang inkubasi diusahakan paparan cahaya yang diterima semua perlakuan sama. Suhu ruangan inkubasi antara 24-27°C dengan kelembaban sekitar 90%. Lay out penelitian disajikan pada lampiran II.

5. Pengamatan

Pengamatan terhadap parameter penelitian dilakukan setiap 1 kali dalam seminggu, pengamatan dilakukan sampai umur eksplan mencapai 8 minggu setelah tanam.

E. Parameter yang Diamati

Variabel yang diamati pada penelitian ini antara lain:

1. Persentase eksplan hidup

Parameter ini menunjukkan jumlah eksplan yang hidup dalam media MS. Persentase eksplan hidup dihitung pada minggu ke 8 setelah tanam dengan rumus :

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

2. Persentase eksplan terkontaminasi

Parameter ini menunjukkan jumlah eksplan yang mengalami kontaminasi akibat aktivitas mikroorganisme seperti jamur dan bakteri yang mengakibatkan kerusakan atau kematian pada eksplan. Kontaminasi pada eksplan akibat jamur ditandai dengan munculnya hifa pada eksplan, sementara ciri-ciri eksplan yang terkontaminasi bakteri adalah timbul lender di sekitar eksplan. Perhitungan persentase eksplan terkontaminasi dilakukan setelah umur eksplan mencapai 8 minggu dengan menggunakan rumus :

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

3. Persentase eksplan mati

Parameter ini menunjukkan jumlah eksplan yang mati dalam media MS. Persentase eksplan mati dihitung pada minggu ke 8 setelah tanam dengan rumus :

$$\text{Persentase eksplan hidup} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang mati}}{\text{Jumlah eksplan total}} \times 100\%$$

4. Jumlah tunas

Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah tunas yang tumbuh setiap 1 kali dalam seminggu, mulai dari hari penanaman eksplan sampai minggu ke-8 setelah tanam untuk melihat pertambahan tunas baru pada eksplan.

5. Tinggi tunas.

Tinggi tunas diamati dengan menggunakan penggaris. Parameter ini menunjukkan pertumbuhan tunas dalam media. Setiap penambahan tinggi tunas

dicatat. Pengamatan tinggi tunas dilakukan setiap 1 kali dalam seminggu bersamaan dengan pengamatan jumlah tunas.

6. Persentase eksplan bertunas

Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah eksplan yang membentuk tunas baru dan dinyatakan dalam persen untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi ZPT BAP dan NAA terhadap pertumbuhan tunas. Persentase eksplan bertunas dihitung pada minggu ke-8 setelah tanam dengan rumus :

$$\text{Persentase eksplan bertunas} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang bertunas}}{\text{Jumlah eksplan total}} \times 100\%$$

7. Persentase eksplan berkalus

Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah eksplan yang muncul kalus pada pangkal ekplan dan dinyatakan dalam persen untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi ZPT BAP dan NAA terhadap pertumbuhan eksplan. Persentase eksplan berkalus dihitung pada minggu ke-8 setelah tanam dengan rumus :

$$\text{Persentase eksplan berkalus} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang berkalus}}{\text{Jumlah eksplan total}} \times 100\%$$

8. Waktu muncul kalus

Parameter ini menunjukkan kapan eksplan mulai berkalus. Pengamatan ini dilakukan setiap minggu 1 kali hingga minggu ke-8 setelah tanam.

9. Jumlah daun

Pengamatan dilakukan dengan menghitung pertambahan daun baru pada eksplan. Pengamatan dilakukan setiap 1 kali dalam seminggu dimulai dari saat tanam hingga minggu ke-8 setelah tanam.

10. Persentase eksplan berakar

Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah eksplan yang membentuk akar dan dinyatakan dalam persen untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi ZPT BAP dan NAA terhadap pertumbuhan akar. Persentase eksplan berakar dihitung pada minggu ke-8 setelah tanam dengan rumus :

$$\text{Persentase eksplan berakar} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang berakar}}{\text{Jumlah eksplan total}} \times 100\%$$

11. Jumlah akar

Pengamatan dilakukan dengan menghitung pertambahan akar baru pada eksplan. Pengamatan dilakukan setiap 1 kali dalam seminggu dimulai dari saat tanam hingga minggu ke-8 setelah tanam.

12. Saat muncul atau tumbuh akar

Parameter ini menunjukkan kapan eksplan mulai berakar. Pengamatan ini dilakukan bersamaan dengan pengamatan jumlah akar.

F. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) pada taraf $\alpha = 5\%$. Bila ada 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 (MS_0). Hasil analisis disajikan dalam bentuk grafik, histogram, tabel dan gambar.