

III. TATACARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur *In Vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan Februari-April 2016.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan berupa Air rebusan kentang, kalus Jati dan medium WPM.

Alat penelitian yang digunakan meliputi: alat sterilisasi seperti, lampu Bunsen, Autoklaf, alat inokulasi seperti LAF, pinset, plastik wrap, lampu bunsen, aluminium *foil*, alat pengukur yaitu pH stik, gelas ukur, pipet ukur, timbangan analitik dan peralatan glassware.

C. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan faktor tunggal terdiri dari lima perlakuan yaitu konsentrasi air rebusan kentang (K) dalam medium WPM yang mengandung BAP, 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mg/l dan NAA 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/l. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 10 kali, sehingga didapat 50 unit percobaan. Adapun perlakuan yang diuji sebagai berikut :

A = BAP 0,5 mg/l + NAA 0,1 mg/l + K 100 ml/l.

B = BAP 1,0 mg/l + NAA 0,2 mg/l + K 200 ml/l.

C = BAP 1,5 mg/l + NAA 0,3 mg/l + K 300 ml/l.

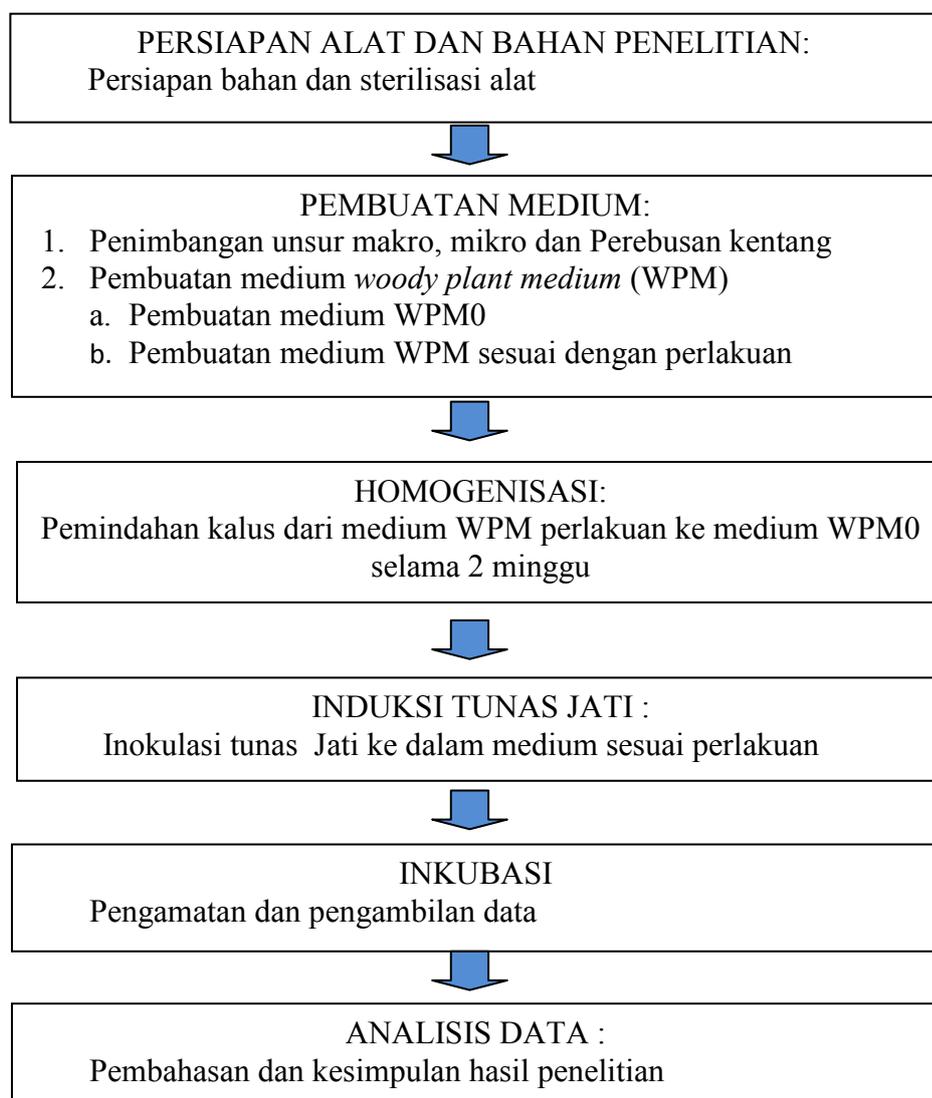
D = BAP 2,0 mg/l + NAA 0,4 mg/l + K 400 ml/l.

E = BAP 2,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l + K 500 ml/l.

D. Cara Penelitian

1. Tahapan Penelitian

Penelitian ini terdiri atas beberapa tahapan yaitu: (1) Persiapan alat dan bahan, (2) Pembuatan medium, (3) Homogenisasi Eksplan, (4) Induksi tunas Jati, (5) Inkubasi, (6) Analisis data (Gambar 1).



Gambar 1. Tahapan Pengujian Efektivitas Air Rebusan Kentang untuk Induksi Tunas Jati Emas Secara *In Vitro*.

2. Persiapan Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian terdiri dari : Eksplan berupa kalus Jati dari hasil penelitian sebelumnya ; medium inokulasi berupa medium WPM, Air rebusan kentang, BAP, NAA. Alat-alat yang digunakan meliputi : *Laminar Air Flow* cabinet, lampu Bunsen, autoklaf, pinset, plastik wrap, lampu bunsen, *aluminium foil*, pH stik, gelas ukur, pipet ukur, timbangan analitik, dan peralatan glassware (lampiran 7 Gambar 1).

Sterilisasi alat-alat berupa *glassware* yang akan digunakan untuk inokulasi eksplan dilakukan menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dan suhu 121⁰ C selama 20 menit sedangkan sterilisasi bakar dilakukan pada peralatan *dissecting kits* (Pinset, gunting dan skalpel) di dalam LAF dengan cara mencelupkan alat pada alkohol 70% dan membakarnya di atas bunsen sebelum digunakan. Sterilisasi LAF dilakukan sebelum sterilisasi basah dan bakar dimulai, dengan menyalakan lampu UV selama 15 menit.

3. Pembuatan Medium

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium WPM. Pembuatan medium diawali dengan penimbangan komposisi medium Makro, mikro, ZPT, agar, sukrosa dan perebusan kentang. Air rebusan kentang didapatkan dengan merebus kentang yang telah dikupas terlebih dahulu dan di potong-potong menjadi bagian kecil dengan perbandingan kentang yaitu 1:1 (1 Liter aquades, 1 kg kentang), kemudian kentang direbus dan diambil airnya tanpa disaring (lampiran 3 dan Gambar 2). Bahan yang digunakan terdiri dari unsur makro, mikro ZPT, Air rebusan kentang, agar dan sukrosa untuk

medium WPM. Semua bahan tersebut ditimbang terlebih dahulu sesuai takaran berdasarkan perlakuan. Bahan-bahan tersebut dicampur dengan menambahkan zat pengatur tumbuh BAP dan NAA sesuai perlakuan kemudian diencerkan dengan aquades sampai campuran bahan-bahan mencapai 400 ml. Kemudian ditambahkan sukrosa sebanyak 30 g/l. Agar campuran tersebut merata, diaduk sampai homogen, selanjutnya yaitu pengukuran pH larutan. pH larutan disesuaikan menjadi 6 yaitu dengan penambahan NaOH 1 N untuk menaikkan pH atau HCl 1 N untuk menurunkan pH. Apabila pH telah sesuai, maka pada larutan ditambahkan bahan pematat medium, yaitu agar-agar sebanyak 3g/l dan ditunggu sampai mendidih. Setelah mendidih, larutan dituangkan ke botol-botol kultur, kurang lebih 20 ml setiap botolnya. (Lampiran 7 Gambar 4).

Botol ditutup dengan plastik PP, kemudian dilakukan sterilisasi dengan cara *autoclave* pada suhu 121° C, pada tekanan 1 atm selama 30 menit. Kemudian, botol diangkat dari *autoclave*, tutup dirapatkan dan didinginkan agar medium menjadi padat. Botol-botol kultur berisi medium selanjutnya disimpan pada rak-rak kultur.

4. Persiapan Eksplan

Eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kalus Jati dari hasil penelitian sebelumnya, persiapan yang dilakukan sebagai berikut:

a. Homogenisasi

Homogenisasi eksplan dilakukan dengan cara memindahkan eksplan dari penelitian sebelumnya ke medium WPM0 dengan masa inkubasi

minimal dua (2) minggu sebelum dipindahkan ke medium yang diberi perlakuan. Tujuan dari homogenisasi adalah untuk menyeragamkan eksplan terlebih dahulu sebelum dipindahkan ke medium perlakuan dengan taraf konsentrasi yang berbeda, sehingga diharapkan efek dari perlakuan sebelumnya tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan eksplan pada perlakuan yang berbeda.

b. Induksi Tunas

Induksi kalus dilakukan dengan memacu pembelahan sel secara terus-menerus menggunakan zat pengatur tumbuh, kalus selanjutnya akan beregenerasi melalui organogenesis hingga menjadi tanaman baru, induksi tunas dilakukan dengan memindahkan kalus dari medium homogenisasi (WPM0) ke dalam medium perlakuan dengan berat kalus yang sama 0,5 gram per botol kultur (Lampiran 7 gambar 3).

E. Parameter Pengamatan

1. Persentase Eksplan Hidup (%)

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

Rumus:

$$\% \text{ eksplan hidup} = \frac{\Sigma \text{eksplan hidup}}{\Sigma \text{total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

2. Persentase Eksplan Kontaminasi (%)

Eksplan yang terkontaminasi dihitung setiap minggu, eksplan dikatakan terkontaminasi apabila terdapat pertumbuhan jamur dan bakteri.

Rumus:

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

3. Persentase Eksplan *Browning* (%)

Eksplan yang mengalami pencoklatan/*Browning* dihitung setiap minggu, kriteria eksplan *Browning* apabila pencoklatan pada eksplan lebih dari separuh eksplan.

Rumus :

$$\% \text{ eksplan } *Browning* = \frac{\sum \text{eksplan } *browning*}{\sum \text{total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

4. Jumlah Calon Tunas

Calon tunas dihitung sejak terbentuknya tonjolan-tonjolan atau bakal tunas pada eksplan. Eksplan yang diamati yaitu eksplan telah menunjukkan kemunculan calon tunas dengan dicirikan terbentuknya tonjolan-tonjolan berwarna hijau pada kalus, pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah calon tunas yang terbentuk dengan kaca pembesar (Lup).

F. Analisis Data

Setelah data hasil penelitian diperoleh, kemudian dilakukan analisis menggunakan sidik ragam (*Analysis of variance*) dengan software SAS, bila ada beda nyata antar perlakuan maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji DMRT (Duncan's Multiple Range Test) dengan taraf 5%. Hasil analisis data disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.