

### **III. TATA CARA PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur *In Vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian dimulai pada bulan April sampai bulan Agustus 2016.

#### **B. Bahan dan Alat Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari : tunas sarang semut hasil kultur *in vitro*, medium MS, arang aktif, IBA, alkohol, dan aquades steril. Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu : botol kultur, gelas ukur, erlenmayer, *aluminium foil*, kertas payung, plastik, karet pengikat, pembakar spiritus, petridish, skalpel, LAF (*Laminar Air Flow*) dan Autoklaf.

#### **C. Metode Penelitian**

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode eksperimental yang disusun dalam Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) dengan rancangan perlakuan faktorial 2 x 4. Faktor 1 adalah konsentrasi arang aktif yaitu 0 g/L dan 2 g/L arang aktif. Faktor 2 adalah penambahan IBA yaitu: 0 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L, 6 mg/L. Setiap perlakuan tersebut diulang 5 kali, sehingga terdapat 40 unit percobaan. Penelitian dilakukan dua tahap yaitu tahap pertama homogenisasi planlet dan tahap kedua peningkatan kuantitas akar. Tahap homogenisasi dilakukan selama 2 minggu untuk mendapatkan planlet yang seragam. Planlet yang telah dihomogenisasikan kemudian disubkultur pada

medium perlakuan MS dengan penambahan Arang aktif (0 g/L dan 2 g/L) dan IBA (0 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L, 6 mg/L).

Tabel 1. Perlakuan Konsentrasi Arang Aktif dan Konsentrasi IBA untuk Induksi Akar Sarang Semut

IBA \ Arang aktif	0 mg/L (B1)	2 mg/L (B2)	4 mg/L (B3)	6 mg/L (B4)
0 g/L (A1)	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>3</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>4</sub>
2 g/L (A2)	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>3</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>4</sub>

Keterangan: A<sub>1</sub>B<sub>1</sub> = Arang aktif 0 g/L + IBA 0 mg/L  
 A<sub>1</sub>B<sub>2</sub> = Arang aktif 0 g/L + IBA 2 mg/L  
 A<sub>1</sub>B<sub>3</sub> = Arang aktif 0 g/L + IBA 4 mg/L  
 A<sub>1</sub>B<sub>4</sub> = Arang aktif 0 g/L + IBA 6 mg/L  
 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub> = Arang aktif 2 g/L + IBA 0 mg/L  
 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> = Arang aktif 2 g/L + IBA 2 mg/L  
 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub> = Arang aktif 2 g/L + IBA 4 mg/L  
 A<sub>2</sub>B<sub>4</sub> = Arang aktif 2 g/L + IBA 6 mg/L

#### D. Cara Penelitian

##### 1. Sterilisasi Alat

Sterilisasi dilakukan dengan dua cara, yaitu sterilisasi basah atau uap air yang bertekanan dan sterilisasi bakar. Sterilisasi basah menggunakan tekanan dilakukan dengan memasukkan alat-alat yang telah dibungkus dengan kertas payung dalam autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C bertekanan 1 atm selama 30 menit. Alat-alat yang disterilkan antara lain: botol-botol kultur, pinset, skalpel, aluminium foil, petridish, dan Erlenmeyer. Sterilisasi bakar digunakan lampu spiritus yang dilakukan di LAF. Cara yang digunakan yaitu dengan mencelupkan alat yang digunakan dalam alkohol 70% kemudian membakar pada lampu spiritus. Alat yang dibakar yaitu pinset dan skalpel yang berfungsi pada saat penanaman

eksplan. Penyepteran LAF dilakukan dengan menyemprotkan alkohol 70% ke seluruh permukaan kemudian dilap hingga kering dan dinyalakan lampu UV selama satu jam sebelum LAF digunakan.

## 2. Pembuatan Medium Tanam

Medium tanam yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium padat yaitu menggunakan medium MS0 dan MS dengan arang aktif yang dikombinasikan dengan IBA dalam jumlah yang bervariasi sesuai perlakuan. Persiapan pembuatan medium dimulai dengan mempersiapkan alat yang akan digunakan yaitu timbangan analitik, tabung Erlenmeyer, gelas ukur, pengaduk kaca, cawan timbang, sendok, kertas pH, botol medium, aluminium foil, dan kompor. Selanjutnya dilakukan penimbangan bahan sesuai perlakuan, untuk medium MS0 menggunakan bahan medium MS, sukrosa, agar, dan aquades sedangkan untuk medium MS perlakuan memerlukan bahan yaitu medium MS, sukrosa, agar, mio-inositol, vitamin, aquades, arang aktif (0 g/L dan 2 g/L) serta IBA (0 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L dan 6 mg/L).

Bahan yang telah ditimbang sesuai perlakuan dimasukkan kedalam labu erlenmeyer satu persatu mulai dari aquades, MS, sukrosa, mio-inositol, vitamin, dan IBA sambil diaduk sampai larut. Selanjutnya pH diukur menggunakan kertas pH, dan dilihat angkanya pada skala warna. Bila pH masih dibawah 5.7 maka ditambahkan KOH secara perlahan, tetapi bila pH melebihi 6.0 ditambahkan HCl secara perlahan sampai pH mencapai 5,8. Setelah dilakukan pengecekan pH selanjutnya agar dan arang aktif dimasukkan secara berurutan, kemudian ditambahkan aquadest sampai volume yang ditentukan sambil menggoyangkan

botol memutar sehingga bahan-bahan larut. Labu elenmeyer yang berisi bahan medium kemudian dipanaskan menggunakan kompor gas sambil diaduk menggunakan pengaduk kaca sampai mendidih dan agarnya larut semua. Medium yang telah mendidih dituang kedalam botol kultur sebanyak 20 ml/botol kemudian ditutup menggunakan plastik bening dan diikat dengan karet. Botol yang sudah berisi media selanjutnya dimasukkan kedalam autoklaf untuk disterilisasi  $\pm 2$  jam. Botol berisi medium yang telah steril diangkat kemudian dipindahkan dan disusun di ruang inkubasi dan diamati sampai  $\pm 3$  hari untuk melihat apakah terjadi kontaminasi pada medium atau tidak.

### 3. Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan bertujuan untuk menghilangkan mikroorganisme penyebab kontaminasi seperti bakteri dan jamur. Sterilisasi eksplan dilakukan dengan cara mengeluarkan eksplan sarang semut dari botol kultur. Tunas eksplan dipotong kemudian dimasukkan ke dalam larutan Clorox 1% selama lima menit. Kemudian eksplan tersebut ditempatkan pada petridish yang telah diberi larutan antiseptik (4 – 5 tetes dilarutkan dalam aquadest secukupnya). Setelah itu eksplan tersebut dibilas pada petridish yang berisi aquadest kemudian ditiriskan pada kertas saring dalam petridish.

### 4. Inokulasi

Pada penelitian ini inokulasi dilakukan dua tahap, tahap pertama yaitu inokulasi tunas sarang semut pada medium MS0 kemudian yang kedua adalah inokulasi tunas sarang semut dari medium MS0 ke medium perlakuan. Inokulasi

atau penanaman dilakukan di dalam LAF (*Laminar Air Flow*) yang telah disterilkan dengan alkohol 70% dan disinari dengan ultraviolet selama 60 menit. Alat tanam yang digunakan dalam proses inokulasi yaitu *dissecting kits* (skalpel, pinset dan gunting) dimana alat-alat tersebut harus dalam keadaan steril dan dimasukkan dalam botol jam yang berisi alkohol 70%. Jika akan digunakan untuk melakukan inokulasi, maka alat tersebut terlebih dahulu dibakar di atas pembakar bunsen dan ditunggu hingga dingin, kemudian digunakan untuk mengambil eksplan yang akan ditanam. Eksplan yang telah diambil dan direndam dalam antiseptik selanjutnya dimasukkan ke dalam botol berisi medium sesuai perlakuan yang sudah disterilkan. Selanjutnya botol yang sudah diinokulasi ditutup aluminium foil, diikat karet dan dibungkus plastik wrap.

#### 5. Inkubasi

Pada proses inkubasi, botol-botol yang sudah diinokulasi segera diletakkan di rak-rak ruang inkubasi. Ruang inkubasi dilengkapi lampu neon (TL) dengan kekuatan 40 watt yang dinyalakan selama 24 jam sebagai pengganti sinar matahari. Suhu ruang inokulasi diatur menggunakan AC yang bersuhu 20-28<sup>0</sup> C. Rak-rak yang berada di ruang inkubasi dibersihkan dengan menyemprotkan alkohol 70%. Inkubasi dilakukan selama 12 minggu dimulai setelah inokulasi selesai.

#### **E. Parameter yang Diamati**

Pengamatan dilakukan setiap minggu selama 12 minggu. Variabel pengamatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: persentase eksplan hidup, persentase eksplan terkontaminasi, persentase eksplan *browning*,

pertambahan tinggi tunas, pertambahan jumlah daun, jumlah akar, akar terpanjang dan diameter akar.

#### 1. Persentase Eksplan Hidup (%)

Persentase eksplan hidup menyatakan banyaknya eksplan yang hidup pada setiap satuan percobaan dari seluruh jumlah eksplan yang ditanam. Pengamatan dilakukan setiap minggu selama 12 minggu dengan cara menghitung banyaknya eksplan hidup. Eksplan dapat dikatakan hidup apabila eksplan tersebut berwarna hijau, tidak terkontaminasi, *browning* atau kecoklatan lebih dari 50%. Persentase eksplan hidup dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Persentase eksplan hidup} = \frac{\text{jumlah eksplan yang hidup}}{\text{jumlah eksplan yang ditanam}} \times 100\%$$

#### 2. Persentase Eksplan Kontaminasi (%)

Persentase eksplan terkontaminasi menyatakan banyaknya eksplan yang terkontaminasi pada setiap satuan perlakuan dari seluruh jumlah eksplan yang ditanam. Pengamatan dilakukan setiap minggu selama 12 minggu dengan cara menghitung eksplan yang terkontaminasi baik oleh bakteri maupun jamur. Persentase eksplan terkontaminasi dihitung dengan rumus sebagai berikut:

*Persentase eksplan terkontaminasi*

$$= \frac{\text{jumlah eksplan terkontaminasi}}{\text{jumlah eksplan yang ditanam}} \times 100\%$$

### 3. Persentase Eksplan *Browning* (%)

Persentase eksplan *browning* menyatakan banyaknya eksplan yang *browning* pada setiap satuan percobaan dari seluruh jumlah eksplan yang ditanam. Eksplan dikategorikan *browning* jika pada tiap eksplan mengalami pencoklatan lebih dari 50%. Pengamatan dilakukan setiap minggu selama 12 minggu dengan cara menghitung eksplan yang *browning* (mengalami pencoklatan). Persentase eksplan *browning* dihitung dengan rumus sebagai berikut:

*Persentase eksplan browning*

$$= \frac{\text{jumlah eksplan yang browning tiap satuan percobaan}}{\text{jumlah eksplan yang ditanam}} \times 100\%$$

### 4. Pertambahan Tinggi Tunas

Pengamatan dilakukan dilakukan setiap minggu selama 12 minggu dengan cara mengukur tinggi tunas mulai dari pangkal tunas sampai titik tumbuh tunas pada semua unit percobaan. Tinggi tunas pada minggu ke-1 sampai dengan minggu ke-12 dikurangkan dengan tinggi tunas pada saat inokulasi sehingga diperoleh selisih pertambahan tinggi tunas setiap minggunya. Alat yang digunakan untuk mengukur tinggi tunas yaitu penggaris atau mistar.

### 5. Pertambahan Jumlah Daun

Pengamatan dilakukan setiap minggu selama 12 minggu dengan cara menghitung jumlah daun pada semua unit percobaan. Jumlah daun pada minggu ke-1 sampai dengan minggu ke-12 dikurangkan dengan jumlah daun pada saat inokulasi sehingga diperoleh selisih jumlah daun setiap minggunya.

#### 6. Jumlah Akar

Pengamatan dilakukan pada akhir masa pengamatan (minggu ke-12) dengan cara menghitung jumlah akar pada semua unit percobaan.

#### 7. Akar Terpanjang

Pengamatan dilakukan pada akhir masa pengamatan (minggu ke-12) dengan cara mengeluarkan seluruh eksplan dari dalam botol dan mengukur akar terpanjang pada semua unit percobaan. Akar diukur mulai dari titik pangkal akar sampai ujung akar. Alat yang digunakan untuk mengukur akar terpanjang yaitu penggaris atau mistar.

#### 8. Diameter Akar

Pengamatan dilakukan pada akhir masa pengamatan (minggu ke-12) dengan cara mengukur diameter akar terpanjang menggunakan penggaris yang diletakkan melintang pada sisi akar.

### **F. Analisis Data**

Data dianalisis menggunakan sidik ragam (*Analisis of variance*) pada taraf kesalahan  $\alpha=5\%$  untuk mengetahui pengaruh perlakuan. Bila ada beda nyata antar perlakuan, maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan Uji Jarak Ganda Duncan / UJGD (*Duncan's Multiple Range Test / DMRT*). Hasil analisis ditampilkan dalam bentuk tabel, grafik dan foto.