

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur *In Vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, penelitian dilaksanakan pada bulan Mei– Agustus 2014.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari : eksplan hipokotil sarang semut *in vitro*, medium MS, Thidiazuron, NAA, bahan sterilisasi yang digunakan alkohol, akuades steril.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi botol kultur, *aluminium foil*, petridish, pembakar spiritus, pisau, *scalpel*, pinset, gelas piala, *erlenmayer*, pipet, pH meter, autoklaf, neraca analitik, *stirer*, *Laminar Air Flow Cabinet*, oven, plastik, *sprayer* dan karet.

C. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimen yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan rancangan perlakuan faktorial (2x6). Faktor 1 adalah jenis eksplan yaitu : hipokotil dan daun. Faktor 2 adalah konsentrasi Thidiazuron yang terdiri dari 6 aras yaitu : 0 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l, 3 mg/l, 4 mg/l dan 5 mg/l. Setiap perlakuan diulang 5 kali sehingga total unit perlakuan adalah 60 unit.

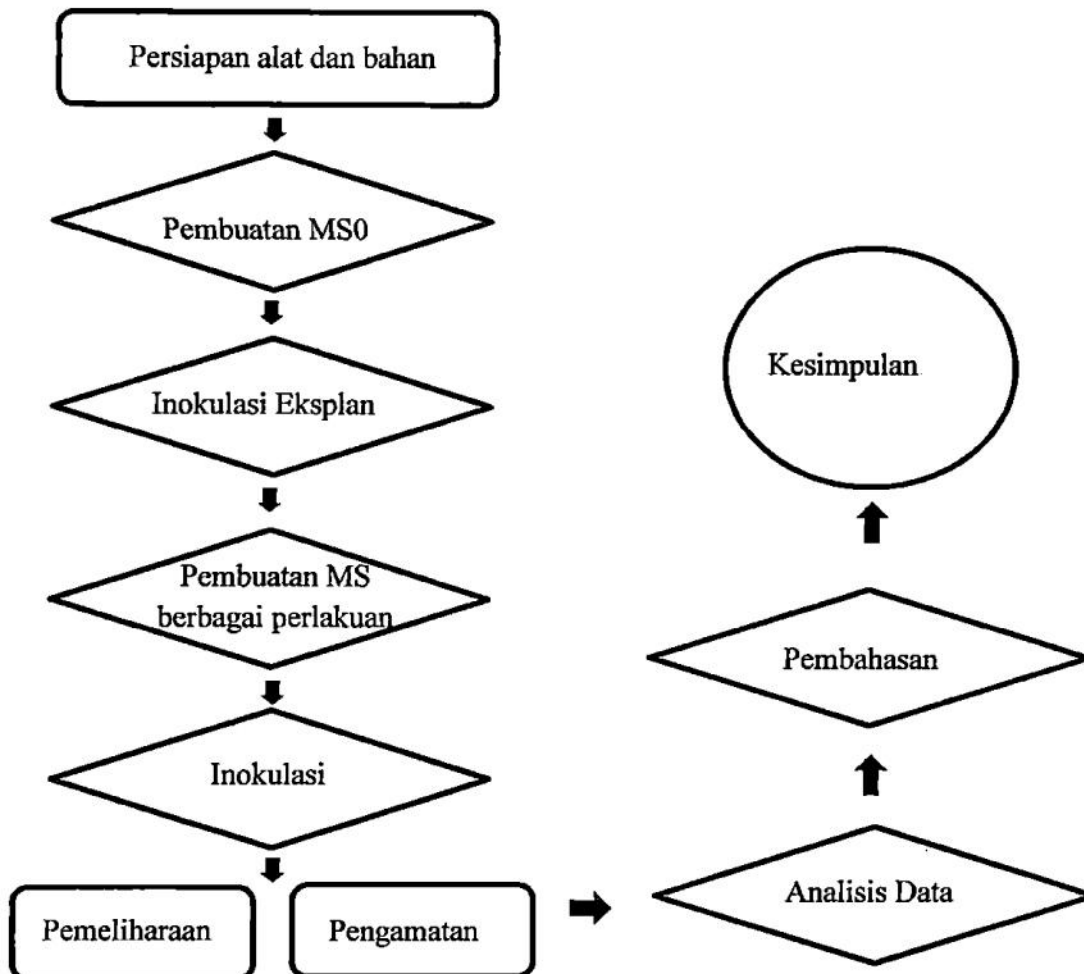
Tabel 1. Perlakuan Jenis Eksplan dan Konsentrasi Thidiazuron Untuk Multiplikasi Tunas Adventif

TDZ (mg/l) \ Eksplan	0	1	2	3	4	5
Hipokotil	H 0	H 1	H 2	H 3	H 4	H 5
Daun	D 0	D 1	D 2	D 3	D 4	D 5

Keterangan : Semua perlakuan ditambah 0,5 mg/l NAA

Setiap perlakuan diulang 5 kali, sehingga total unit perlakuan adalah 60 unit.

Tahapan penelitian yang akan dilakukan secara singkat dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Tahap Penelitian Sarang Semut Secara *In Vitro*

D. Cara Penelitian

1. Sterilisasi

a. Sterilisasi Lingkungan Kerja

Sebelum digunakan, *laminar air flow cabinet* harus disterilkan dengan menggunakan *hand sprayer* berisi alkohol 70%. Setelah *laminar Air Flow Cabinet* disemprot, lalu lampu UV dinyalakan kemudian dibiarkan terlebih dahulu ± 10 menit, baru kemudian boleh digunakan.

b. Sterilisasi Alat-alat dan Medium Kultur

Alat-alat *dissecting-set* dan *glass ware* yang akan digunakan untuk inokulasi, setelah dicuci dan dikeringkan kemudian dibungkus dengan kertas koran dan disterilisasi di dalam autoklaf dengan suhu 121°C , tekanan 1 atm, lama sterilisasi 30 menit.

2. Pembuatan Medium

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium MS lengkap dengan ZPT dan tanpa ZPT. Medium MS tanpa ZPT dibuat untuk mensubkulturkan hipokotil sarang semut sebelum di tanam di MS dengan ZPT. Medium MS dengan ZPT dibuat dengan penambahan Thidiazuron (0,1,2,3,4,5 mg/l) dan NAA (0,5 mg/l).

a. Medium MS0

Medium MS0 dibuat sebanyak 600 ml untuk mensubkulturkan eksplan yang akan ditanam sebanyak 30 botol. Setiap botol berisi 20 ml medium MS0.

Bahan yang digunakan untuk membuat MS0 sebanyak 600 ml yaitu : MS yang sudah jadi 2,98 g/l, mioinositol 12 ml, Fe 30 ml, Vitamin 30 ml, Sukrosa 12 g, Gellan gum 1,8 g, PPM 0,6 ml.

b. Medium Perlakuan

Pembuatan medium MS perlakuan untuk 30 botol, masing – masing perlakuan berisi 20 ml sehingga dibutuhkan 600 ml medium yang terbagi dalam 6 perlakuan, dimana setiap perlakuan berisi 100 ml dan terbagi menjadi 5 unit.

Bahan yang digunakan untuk membuat MS 100 ml yaitu : MS yang sudah jadi 0,433g/l, mioinositol 2 ml, Fe 5 ml, Vitamin 5 ml, Sukrosa 3 g, *Gellan gum* 0,3 g , PPM 0,1 ml, NAA 0,5 mg/l dan Thidiazuron (0,1,2,3,4,5 mg/l).

Semua stok dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kecuali gellan gum dan thidiazuron. Setelah semuanya masuk, ditambahkan aquadest hingga 80 ml. Setelah itu pH medium dicek dengan pH stik hingga menunjukkan pH 6, apabila terlalu masam ditambahkan NaOH 1 N dan apabila terlalu basa ditambahkan HCl 1 N. Setelah pH 6 kemudian dimasukan *gellan gum* dan ditambahkan aquadest hingga volume 100 ml. Kemudian larutan medium dipanaskan di *microwave* hingga mendidih. Setelah itu medium diautoklaf selama 20 menit pada suhu 121⁰ C dan tekanan 1 atm. Kecuali larutan medium perlakuan kontrol langsung dimasukkan ke botol dan ditutup dengan plastik kemudian diautoklaf.

Thidiazuron tidak disterilisasi dalam autoklaf karena bersifat termolabil sehingga sterilisasi dilakukan dengan metode sterilisasi filter. Cara sterilisasi Thidiazuron menggunakan milipore yang berukuran 0,2 yang telah disterilisasi dan *syringe* tanpa jarum.

3. Persiapan Eksplan

Eksplan yang digunakan adalah hipokotil sarang semut steril yang diperoleh dari penelitian Supriyadi (2014). Hipokotil yang berasal dari medium dengan penambahan ZPT berbeda dihomogenkan dengan mensubkulturkan planlet sarang semut pada medium MS0 selama 2 minggu. Setelah 2 minggu dalam medium MS0, hipokotil siap diinokulasi pada medium perlakuan. Sebelum diinokulasi hipokotil dipotong dan direndam dalam larutan betadin.

4. Inokulasi

Penanaman dilakukan dalam *Laminar Air Flow* yang telah dibersihkan dengan alkohol 70% dan disinari dengan ultraviolet selama 30 menit. Pisau dan pinset dimasukkan dalam botol berisi alkohol dan sebelum digunakan dibakar dahulu. Eksplan yang digunakan adalah potongan dari hipokotil dan daun sarang semut yang sebelumnya telah ditanam pada medium MS0.

5. Inkubasi

Eksplan yang telah diinokulasi diinkubasi selama 8 minggu dalam ruangan inkubasi dengan suhu 23° - 25° C dengan pencahayaan lampu TL 40 watt selama 24 jam.

E. Parameter yang Diamati

1. Persentase Eksplan Hidup (%)

Pengamatan dilakukan dengan mengamati banyaknya eksplan hidup setiap hari selama 8 minggu. Eksplan dapat dikatakan hidup apabila eksplan tersebut berwarna hijau, tidak mengalami kontaminasi, maupun *browning* atau berwarna kecoklatan lebih dari 50%. Persentase hidup dapat dihitung dengan rumus:

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

2. Persentase Eksplan Kontaminasi (%)

Pengamatan dilakukan dengan mengamati banyaknya eksplan yang mengalami kontaminasi setiap hari selama 8 minggu dan diamati penyebab terjadinya kontaminasi. Persentase kontaminasi ini dapat dihitung dengan rumus :

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

3. Persentase Eksplan *Browning* (%)

Eksplan yang mengalami kecoklatan dihitung setiap hari selama dua minggu. Eksplan dikategorikan *browning* jika pada tiap eksplan mengalami pencoklatan lebih dari 50 %. Eksplan yang mengalami pencoklatan dihitung pada akhir pengamatan dengan rumus :

$$\% \text{ eksplan } \textit{browning} = \frac{\sum \text{eksplan } \textit{browning}}{\sum \text{eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

4. Persentase Eksplan Vitrifikasi

Pengamatan dilakukan dengan mengamati banyaknya eksplan yang mengalami vitrifikasi setiap hari selama 8 minggu. Eksplan dikategorikan vitrifikasi apabila eksplan tersebut sudah tampak hilang klorofilnya dan tampak transparan.

$$\% \text{ eksplan vitrifikasi} = \frac{\sum \text{eksplan yang vitrifikasi}}{\sum \text{eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

5. Saat Muncul Tunas

Munculnya tunas diamati saat (hari ke berapa) terbentuk tunas dan diamati setiap hari selama 8 minggu, selanjutnya pada akhir pengamatan dilakukan perhitungan

6. Persentase Eksplan Bertunas (%)

Pengamatan dilakukan dengan mengamati banyaknya eksplan hidup setiap minggu selama 8 minggu. Eksplan dapat dikatakan hidup apabila eksplan tersebut berwarna hijau, tidak mengalami kontaminasi, maupun *browning* atau berwarna kecoklatan lebih dari 50%. Persentase eksplan bertunas dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ eksplan bertunas} = \frac{\sum \text{eksplan yang bertunas}}{\sum \text{eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

7. Jumlah Tunas

Jumlah tunas yang terbentuk diamati pada masing-masing botol, pengamatan dilakukan tiap minggu sekali selama 8 minggu.

8. Tinggi Tunas

Tinggi tunas diukur mulai dari pangkal sampai pucuk tiap minggu sekali selama 8 minggu dengan satuan sentimeter. Tunas yang diukur tingginya adalah tunas paling tinggi.

9. Jumlah daun

Pengamatan yang dilakukan dengan menghitung jumlah daun yang tumbuh pada setiap eksplan. Pengamatan dilakukan setiap minggu selama 12 minggu.

10. Warna Tunas

Warna tunas diamati secara visual setiap minggu selama 8 minggu dengan menggunakan *Munsell Plant Tissue Colour Chart*. Hasil pengamatan dinyatakan dalam *hue*, *value* dan *chroma*. Hasil pengamatan diskoring (tabel 2) dan dihitung berdasarkan rumus (Muttaqin, 2010).

Tabel 2. Skoring Warna Tunas

Tingkatan	Warna
6	5 GY 7/4 - 7/8
5	5 GY 6/4 - 6/10
4	5 GY 5/4 - 5/10
3	2,5 GY 8/2 - 8/12
2	2,5 GY 6/2 - 7/10
1	2,5 GY 5/2 - 5/8

$$\text{Warna Tunas} = \frac{N \times V}{Z \times n} \times 100 \%$$

Keterangan

N = jumlah sampel yang memiliki skor sama

V = nilai skor yang menunjukkan tingkat warna

Z = nilai skor tertinggi

n = jumlah sampel

(Sumber : Muttaqin, 2010)

11. Saat Muncul kalus

Pengamatan dilakukan setelah penanaman (inokulasi) eksplan sampai tumbuh kalus dan diamati setiap hari selama 8 minggu.

12. Persentase Eksplan Berkalus (%)

Pengamatan persentase kalus dilakukan untuk mengetahui kalus yang tumbuh pada medium. Pengamatan dilakukan seminggu sekali selama 8 minggu.

$$\% \text{ eksplan berkalus} = \frac{\sum \text{eksplan yang bekalus}}{\sum \text{eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

13. Skoring Persentase Kalus Menutupi Eksplan

Skoring kalus dilakukan untuk mengetahui seberapa banyak pertumbuhan kalus menutupi eksplan dan diamati seminggu sekali selama 8 minggu. Persentase kalus diskoring (tabel 3) kemudian dihitung berdasarkan rumus (Muttaqin, 2010).

Tabel 3. Skoring Persentase Kalus Menutupi Eksplan

Skoring	Luas kalus pada eksplan %	Pertumbuhan kalus
1	0	Tidak berkalus
2	>0 – 25	Sedikit
3	>26 – 50	Sedang
4	>51 – 75	Banyak
5	>76 – 100	Sangat banyak

$$\text{Skoring Kalus} = \frac{N \times V}{Z \times n} \times 100 \%$$

Keterangan

N = jumlah sampel yang memiliki skor sama

V = nilai skor yang menunjukkan tingkat luas

Z = nilai skor tertinggi

n = jumlah sampel

(Sumber : Muttaqin, 2010)

14. Warna Kalus

Warna kalus diamati secara visual setiap minggu selama 8 minggu dengan menggunakan *Munssel Plant Tissue Colour Chart*. Hasil pengamatan dinyatakan dalam *hue*, *value* dan *croma*. Hasil pengamatan diskoring (tabel 4) dan dihitung berdasarkan rumus (Muttaqin, 2010).

Tabel 4. Skoring Warna Kalus

Tingkatan	Warna
6	5 GY 7/4 - 7/8
5	5 GY 6/4 - 6/10
4	5 GY 5/4 - 5/10
3	2,5 GY 8/2 - 8/12
2	2,5 GY 6/2 - 7/10
1	2,5 GY 5/2 - 5/8

$$\text{Warna Kalus} = \frac{N \times V}{Z \times n} \times 100 \%$$

Keterangan

N = jumlah sampel yang memiliki skor sama

V = nilai skor yang menunjukkan tingkat warna

Z = nilai skor tertinggi

n = jumlah sampel

(Sumber : Muttaqin, 2010)

F. Analisis Data

Data dianalisis dengan menggunakan sidik ragam pada taraf α 5%, dan apabila hasilnya berbeda nyata dilakukan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf α 5%. Hasil analisis disajikan dalam bentuk tabel dan histogram.