

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan 2 faktor perlakuan, yaitu :

1. Faktor pertama adalah konsentrasi 2,4-D yang terdiri dari 4 taraf :
 - a. D1 = 0 mg/l 2,4-D
 - b. D2 = 1mg/l 2,4-D
 - c. D3 = 2 mg/l 2,4-D
 - d. D4 = 4 mg/l 2,4-D
2. Faktor kedua adalah konsentrasi BAP yang terdiri dari 3 taraf :
 - a. B1 = 0 mg/l BAP
 - b. B2 = 0,5 mg/l BAP
 - c. B3 = 1 mg/l BAP

Dengan demikian, dalam penelitian ini terdapat 12 kombinasi perlakuan dan masing-masing perlakuan dilakukan 3 kali ulangan. Dimana diuraikan menurut tabel 3.1.

Tabel 3.1. Kombinasi perlakuan ZPT

ZPT		2,4-D			
		D1	D2	D3	D4
BAP	B1	D1B1	D2B1	D3B1	D4B1
	B2	D1B2	D2B2	D3B2	D4B2
	B3	D1B3	D2B3	D3B3	D4B3

Keterangan: kontrol adalah perlakuan tanpa penambahan ZPT.

3.2 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang, pada bulan Mei-Agustus 2014.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah botol kultur, cawan petri, alat diseksi (*scalpel*, pinset, dan *spatula*), *autoklav*, *Laminar Air Flow* (LAF), *oven*, timbangan analitik, gelas ukur, *beaker glass*, lampu spirtus, *handsprayer*, pH meter, lemari pendingin, rak kultur, kamera, lampu *fluorence*, *lux meter*, kertas label, plastik, karet, *hot plate* and *stirrer*, tisu, korek api, *alumunium foil*, *waterbath*, pipet tetes, batang pengaduk, dan kompor gas (Lampiran 7).

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksplan filodia (daun semu) akasia yang masih muda yang ditumbuhkan dalam rumah kaca (Gambar

3.1), medium MS, zat pengatur tumbuh 2,4-D (0 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l, dan 4 mg/l), BAP (0 mg/l, 0,5 mg/l, dan 1 mg/l), aquades, gula, agar, alkohol 70% dan 96%, *spiritus*, *thypol*, *detergent*, NaOCl, NaOH 0,1 N dan HCl 0,1% N (Lampiran 7).



Gambar 3.1 eksplan daun semu (filodia) akasia yang masih muda

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat diseksi (*scalpel*, pinset, *spatula*) dan alat-alat dari gelas atau logam dicuci dengan detergen dan dibilas dengan air bersih beberapa kali kemudian dikeringkan dan disterilisasi menggunakan *oven*. Setelah itu alat-alat diseksi (*scalpel*, pinset, *spatula*) dibungkus dengan aluminium foil dan alat-alat dari gelas dibungkus dengan kertas dan disterilisasi menggunakan *autoklav* pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi. Alat diseksi (pinset, *spatula*, *scalpel*) setiap kali akan digunakan didalam LAF sebelumnya dicelupkan kedalam *alcohol* 96% dan dibakar dengan nyala api spirtus (Lampiran 2).

3.4.2 Pembuatan Media

Bahan media yaitu MS 4,43 gr, gula 30 gr, larutan stok 2,4-D (0 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l, dan 4 mg/l), larutan stok BAP (0 mg/l, 0,5 mg/l, dan 1 mg/l) dan aquades 1 liter dicampur dan dihomogenkan menggunakan magnet *stirrer*. Kemudian keasaman media diatur pada pH 5,8 menggunakan pH meter. Jika pH<5,8 maka ditambahkan larutan NaOH 1 N dan jika pH>5,8 maka ditambahkan larutan HCl 1 N. Setelah itu larutan media ditambahkan agar sebanyak 7 gram dan dipanaskan di atas kompor hingga mendidih sambil diaduk. Media yang telah jadi kemudian dimasukkan dalam 40 botol kultur dan ditutup dengan plastik dan diikat menggunakan karet.

3.4.3 Sterilisasi Media

Media dalam botol kultur disterilisasi menggunakan *autoklav* pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama \pm 45 menit (Lampiran 2).

3.4.4 Sterilisasi Ruang Tanam

Laminar Air Flow (LAF) disemprot dengan alkohol 70 % terlebih dahulu. Kemudian alat-alat diseksi (*scalpel*, pinset, *spatula*) dan alat-alat gelas dimasukkan kedalam LAF yang sebelumnya telah disemprot dengan alkohol 70%. Setelah itu ruang tanam disterilisasi menggunakan sinar UV selama 1 jam sebelum LAF digunakan (Lampiran 2).

3.4.5 Persiapan dan Sterilisasi Eksplan

Eksplan daun semu akasia yang masih muda dicuci dengan *detergent* cair lalu dibilas dengan air mengalir hingga bersih. Selanjutnya eksplan direndam dalam fungisida 5% selama 1 jam kemudian dibilas dengan air mengalir. Sterilisasi selanjutnya dilakukan didalam LAF dengan cara : eksplan direndam dalam larutan NaOCl 30%, 20%, 10% masing-masing 10 menit, lalu dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali, dan selanjutnya direndam pada larutan *iodine* selama 1 menit.

3.4.6 Inisiasi Eksplan

Daun semu dipotong terlebih dahulu dengan *scalpel* diatas cawan petri. Kemudian ditanam pada media MS dengan kombinasi 2,4-D (0 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l, dan 4 mg/l) dan BAP (0 mg/l, 0,5 mg/l, dan 1 mg/l). Masing-masing botol diisi 3 potongan daun semu. Selanjutnya botol-botol hasil inisiasi tersebut diinkubasi dalam ruang kultur pada suhu 25°C dengan pencahayaan 36 watt dan kelembapan ruang 70% selama 8 minggu atau 56 hari.

3.4.7 Pengamatan

a. Pengamatan Kuantitatif

Pengamatan kuantitatif meliputi pengamatan munculnya kalus dan persentase eksplan berkalus. Pengamatan munculnya kalus diamati setiap hari hingga hari ke-56. Sedangkan pengamatan persentase eksplan berkalus dilakukan pada akhir pengamatan yaitu hari ke 56 dan dihitung dengan menggunakan rumus dibawah ini :

$$\text{Persentase terbentuknya kalus (\%)} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang membentuk kalus}}{\text{Jumlah total eksplan}} \times 100\%$$

b. Pengamatan Kualitatif

- Pengamatan warna kalus

Warna kalus diamati mulai hari pertama sampai hari ke 56, dengan ketentuan kalus meliputi warna putih (P) dan putih kehijauan (PH).

- Pengamatan tekstur kalus

Tekstur kalus diamati mulai hari pertama sampai hari ke-56, dengan ketentuan kalus berbentuk remah (R) atau kompak (K).

3.4.8 Analisis Data

Data dianalisis dengan menggunakan uji ANAVA (Analisis Varinasi) bila terdapat perbedaan yang signifikan, maka dilakukan uji lanjut dengan uji DMRT pada selang kepercayaan sebesar 5 %.