

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Maret-Juni 2014.

3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 2 faktor perlakuan, yaitu konsentrasi 2,4-D dan air kelapa. Masing-masing kombinasi perlakuan empat ulangan, sehingga terdapat 48 buah unit percobaan.

Faktor 1 : Konsentrasi 2,4-D

- a. D0 : 0 mg/L
- b. D1 : 1 mg/L
- c. D2 : 2 mg/L
- d. D3 : 3 mg/L 2

Faktor 2 : Konsentrasi air kelapa (AK)

- a. AI : 10%
- b. A2 : 15%
- c. A3 : 20%

Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan

Konsentrasi 2,4-D (mg/L)	Konsentrasi Air Kelapa (%)		
	10	15	20
0	A1D0	A2D0	A3D0
1	A1D1	A2D1	A3D1
2	A1D2	A2D2	A3D2
3	A1D3	A2D3	A3D3

Keterangan : Kontrol adalah perlakuan tanpa 2,4-D

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat-alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri, batang pengaduk, botol kultur, alat-alat diseksi (scalpel, pinset, gunting), LAF (*Laminar Air Flow*), timbangan analitik, oven, autoklaf, lampu bunsen, penyemprot alkohol (*sprayer*), pH meter (indikator pH), lemari pendingin, rak kultur, AC (*Air Conditioner*), lampu, *hot plate and magnetik stirrer*, rak kultur, tisu, aluminium foil, plastik wrap, kertas label, karet, plastik, kompor, dan panci pemanas (Lampiran 8).

3.3.2 Bahan-bahan

Bahan utama yang digunakan adalah kotiledon dari tanaman Alfalfa (*Medicago sativa* L.) sebagai eksplan yang akan ditanam pada media. Bahan untuk sterilisasi biji Alfalfa adalah NaCl 1% dan akuades steril serta alkohol 70% dan 96% untuk sterilisasi LAF dan alat-alat diseksi. Bahan media yang digunakan adalah Media MS (Murashige & Skoog), agar-agar 7%, dan gula 0,3%. Zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan adalah 2,4-D yang dikombinasikan dengan air kelapa (Lampiran 8).

3.4 Langkah Kerja

3.4.1 Tahap Persiapan

1. Sterilisasi Ruang Tanam

Langkah kerja dalam sterilisasi ruang tanam adalah sebagai berikut:

1. Lantai pada ruang tanam dipel dengan karbol yang telah dicampur dengan air.
2. Lantai dipel dengan karbol murni.
3. Meja LAF (*Laminar Air Flow*) dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian dinyalakan sinar UV selama 1 jam.
4. Saat akan digunakan lampu UV dimatikan, lampu neon dan kipas dinyalakan

2. Sterilisasi Alat

Langkah kerja dalam sterilisasi alat adalah sebagai berikut:

1. Alat-alat *disecting set* (scalpel, pinset, gunting), alat-alat gelas dan botol kultur dicuci dengan detergen cair dan dibilas dengan air bersih.
2. Alat-alat *disecting set*, alat-alat gelas dan botol kultur direndam di dalam tipol selama 1 x 24 jam.
3. Alat-alat *disecting set*, alat-alat gelas dan botol kultur dibilas dengan air bersih.
4. Alat-alat *disecting set*, alat-alat gelas dan botol kultur dikeringanginkan dengan oven selama 2 jam dengan suhu 120°C
5. Alat-alat *disecting set* dibungkus dengan aluminium foil kemudian dalam plastik tahan panas. Sedangkan alat-alat gelas ditutup dengan plastik tahan

panas dan cawan petri dibungkus dengan kertas. Selanjutnya disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 2 jam.

3. Pembuatan Stok Hormon

Pembuatan larutan stok bertujuan untuk memudahkan dalam pembuatan media. Langkah kerja dalam pembuatan larutan stok hormon dengan konsentrasi 100 ppm dalam 100 ml aquades adalah sebagai berikut:

1. Serbuk 2,4-D ditimbang sebanyak 10 mg
2. Ditambahkan aquades sebanyak 100 ml.
3. Dihomogenkan sampai larutan tercampur merata.
4. Digunakan rumus $M1.V1=M2.V2$ untuk pengambilan larutan dari stok (sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan, yaitu 1 mg/L, 2 mg/L, dan 3 mg/L).

Misalkan dalam pembuatan media 250 ml, ZPT yang ditambahkan adalah sebanyak:

$$M1.V1=M2.V2$$

$$100 . X= 1. 250$$

$$X = 250/100$$

$$X = 2,5 \text{ ml}$$

4. Pembuatan Media Dasar

Langkah kerja dalam pembuatan media induksi kalus sebanyak 1 liter adalah sebagai berikut:

1. Media Murasighe & Skoog (MS) ditimbang sebanyak 4,43 gram, gula sebanyak 30 gram, dan agar sebanyak 7 gram.
2. Bahan-bahan seperti media MS, gula, dan zat pengatur tumbuh (ZPT) serta air kelapa dimasukkan pada 1000 ml aquades kemudian dihomogenkan dengan stirer di atas hot plate.
3. Setelah homogen, diukur pH media sebesar 5,8 dengan indikator pH. Jika pH kurang 5,8 maka ditambahkan larutan NaOH 0,1 N dan jika lebih 5,8 maka ditambahkan HCl 0,1 N.
4. Ditambahkan agar sebanyak 7 gram.
5. Media dipanaskan dan diaduk hingga mendidih.
6. Media yang telah masak, dimasukkan ke dalam botol kultur masing-masing sebanyak 25 ml.
7. Botol kultur yang berisi media ditutup dengan plastik dan diikat dengan karet.

5. Sterilisasi Media

Media kultur yang telah dibuat, kemudian disterilkan dengan cara diautoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

3.4.2 Tahap Pelaksanaan

1. Sterilisasi Biji Alfafa (*Medicago sativa* L.)

Langkah kerja dalam sterilisasi biji Alfalfa adalah sebagai berikut:

1. Biji Alfalfa dicuci dengan air biasa kemudian direndam dalam clorox 1% selama 15 menit.
2. Biji yang telah direndam, dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali kali masing-masing selama 3 menit.

2. Perkecambahan Biji Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Langkah kerja dalam mengecambahkan biji Alfalfa adalah sebagai berikut:

1. Biji dikecambahkan dalam media MS tanpa penambahan zat pengatur tumbuh selama 7 hari.
2. Biji yang telah berkecambah, kemudian dipotong bagian kotiledonnya dan siap digunakan sebagai eksplan.

3 . Penanaman (Inisiasi)

Penanaman (inisiasi) eksplan dilakukan di dalam LAF (*Laminar Air Flow*). Adapun langkah kerja dalam pelaksanaan penanaman (inisiasi) adalah sebagai berikut:

1. Tangan disemprot dengan alkohol 70% di luar *Laminar Air Flow* (LAF) dibersihkan dengan tisu dan alkohol 70%..
2. Alat- alat seperti pinset, scalpel, gunting yang diperlukan dalam kultur dicelupkan dalam alkohol 96% dan dibakar dengan api bunsen.

3. Setelah itu diletakkan di atas tutup kotak *stainless steel* (dimasukkan ke dalam aquades steril) dan dibiarkan dingin.
4. Anggota tubuh yang masuk dalam LAF disemprot dengan alkohol 70%.
5. Eksplan yang ditanam dalam media kultur dipotong dengan menggunakan scalpel dan diambil bagian kotiledonnya.
6. Eksplan ditanam dalam media perlakuan dengan menggunakan pinset atau scalpel.
7. Botol kultur yang telah dinisiasi eksplan ditutup dengan plastik wrap, plastik tahan panas dan diikat dengan karet.
8. Botol-botol yang telah ditanami eksplan diinkubasi dalam ruang kultur pada suhu 23⁰C serta diamati setiap hari selama 8 minggu. Keadaan ruang kultur harus steril.

3.5 Pengamatan

3.5.1 Pengamatan Pertumbuhan

Pengamatan pertumbuhan dilakukan setiap hari setelah penanaman. Untuk mengamati hari tumbuhnya kalus pertama dan kontaminasi.

1. Hari munculnya kalus dihitung dari hari setelah tanam (HST) yang ditandai dengan munculnya bintik-bintik putih (kalus) pada eksplan.
2. Pengamatan kontaminasi dilakukan dengan mengamati secara langsung dengan melihat ada atau tidaknya ciri-ciri umum koloni mikroorganisme (jamur ataupun bakteri).

3.5.2 Pengamatan Akhir

Pengamatan akhir dilakukan di akhir hari pengamatan (hari ke-30). Parameter pengamatan meliputi persentase eksplan berkalus, warna kalus, tekstur kalus, dan berat basah kalus, serta kandungan klorofil total kalus.

1. Persentase eksplan berkalus dihitung dengan membandingkan banyaknya eksplan yang telah membentuk kalus dengan total eksplan yang ditanam, selanjutnya dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Persentase pertumbuhan kalus (\%)} = \frac{\text{Eksplan berkalus tiap perlakuan}}{\text{Total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

2. Berat basah kalus ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik, membandingkan berat basah kalus yang tumbuh dengan total eksplan yang ditanam, selanjutnya dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Berat basah kalus (gram)} = \frac{\text{Berat basah kalus tiap perlakuan}}{\text{Total eksplan tiap perlakuan}}$$

3. Warna kalus dilihat dari warna yang berbentuk, meliputi warna kalus putih transparan (P), hijau keputihan (HMP), kekuningan (K), warna coklat kecoklatan (C), dan hijau (H).
4. Tekstur kalus dilihat dari bentuk kalus yang nampak, meliputi tekstur yang kalus kompak (K) atau tekstur remah (R).
5. Analisis kandungan klorofil kalus Alfalfa (*Medicago sativa* L.) menggunakan alat Spektrofotometer.

$$\text{Klorofil total (ppm)} = \frac{17,30 \times A_{645} + 7,18 \times A_{663}}{\text{g bahan}} \times fp$$

$$fp = 5$$

3.6 Analisa Data

Data pengamatan berupa data kualitatif (tekstur dan warna kalus) dan kuantitatif (waktu inisiasi kalus, berat basah kalus, persentase tumbuh kalus, dan kandungan klorofil kalus). Selanjutnya untuk mengetahui pengaruh antar perlakuan, dilakukan analisa *Analysis of Varian* (ANOVA) *two way* menggunakan SPSS 16,0. Apabila terdapat perbedaan nyata dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5% untuk mengetahui konsentrasi ZPT yang terbaik. Data kualitatif berupa pengamatan visual hasil kultur disajikan secara deskriptif.