

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilakukan di laboratorium *Plant Physiology and Culture* Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Juni-Agustus 2013.

#### **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 tiga ulangan, sehingga terdapat 36 buah unit percobaan.

1. Faktor 1: konsentrasi 2,4-D
  - a. D0: 0 mg/L 2,4-D
  - b. D1: 1 mg/L 2,4-D
  - c. D2: 2 mg/L 2,4-D
  - d. D3: 3 mg/L 2,4-D
2. Faktor 2: konsentrasi air kelapa
  - a. A1: 10% air kelapa (AK)
  - b. A2: 15% air kelapa (AK)
  - c. A3: 20% air kelapa (AK)

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

### 3.3 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan antara lain oven, gelas ukur, pipet, gelas beker, timbangan analitik, *freezer*, pH meter, *hot plate and magnetic stirrer*, botol kultur, plastik tahan panas, karet, autoklaf, tisu, lampu *flouresence*, *Laminar Air Flow* (LAF), *dispossable syringe*, alat diseksi (pinset, *blade*, skalpel), cawan petri, lampu bunsen, korek api, aluminium foil, *wrap plastic*, rak kultur dan kertas label (Lampiran 7).

Bahan utama yang digunakan adalah bagian daun muda nomor 1,2 dan 3 dari tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebagai eksplan yang akan ditanam pada media. Bahan untuk sterilisasi adalah deterjen, aquades, fungisida, alkohol 70%, alkohol 90%, desinfektan, aquades steril dan antiseptik. Media dasar yang digunakan adalah media MS (Murashige & Skoog). ZPT yang digunakan yaitu 2,4-D dikombinasikan dengan air kelapa. Bahan-bahan lain untuk pembuatan media adalah gula dan agar-agar (Lampiran 7).

### 3.4 Sterilisasi Alat-alat

#### 1. Sterilisasi Basah

- a. Alat-alat direndam dengan tipol selama 1 hari (24 jam).

- b. Setelah 24 jam alat-alat tersebut digosok dan dibilas dengan air mengalir, bilasan terakhir menggunakan aquades.
- c. Dimasukkan ke dalam oven untuk dikeringkan pada suhu 50°C sampai kering.
- d. Dikeluarkan dari oven dan kemudian satu per satu alat dibungkus dengan alumunium voil.
- e. Dimasukkan ke dalam autoklaf untuk disterilkan dengan suhu 121°C pada tekanan 1 atm selama 30 menit.
- f. Dikeluarkan dari autoklaf dan dimasukkan kembali ke oven untuk dikeringkan dengan suhu 50°C sampai kering.

## 2. Sterilisasi Kering

- a. Alat-alat direndam dengan tipol selama 1 hari (24 jam).
- b. Setelah 24 jam alat-alat tersebut digosok menggunakan penggosok cuci.
- c. Dibilas dengan air mengalir, bilasan terakhir menggunakan aquades.
- d. Dimasukkan ke dalam oven untuk dikeringkan pada suhu 50°C sampai kering.
- e. Dikeluarkan dari oven dan kemudian satu per satu alat dibungkus dengan alumunium voil.
- f. Dimasukkan ke dalam oven untuk disterilkan dengan suhu 125°C selama 3 jam.

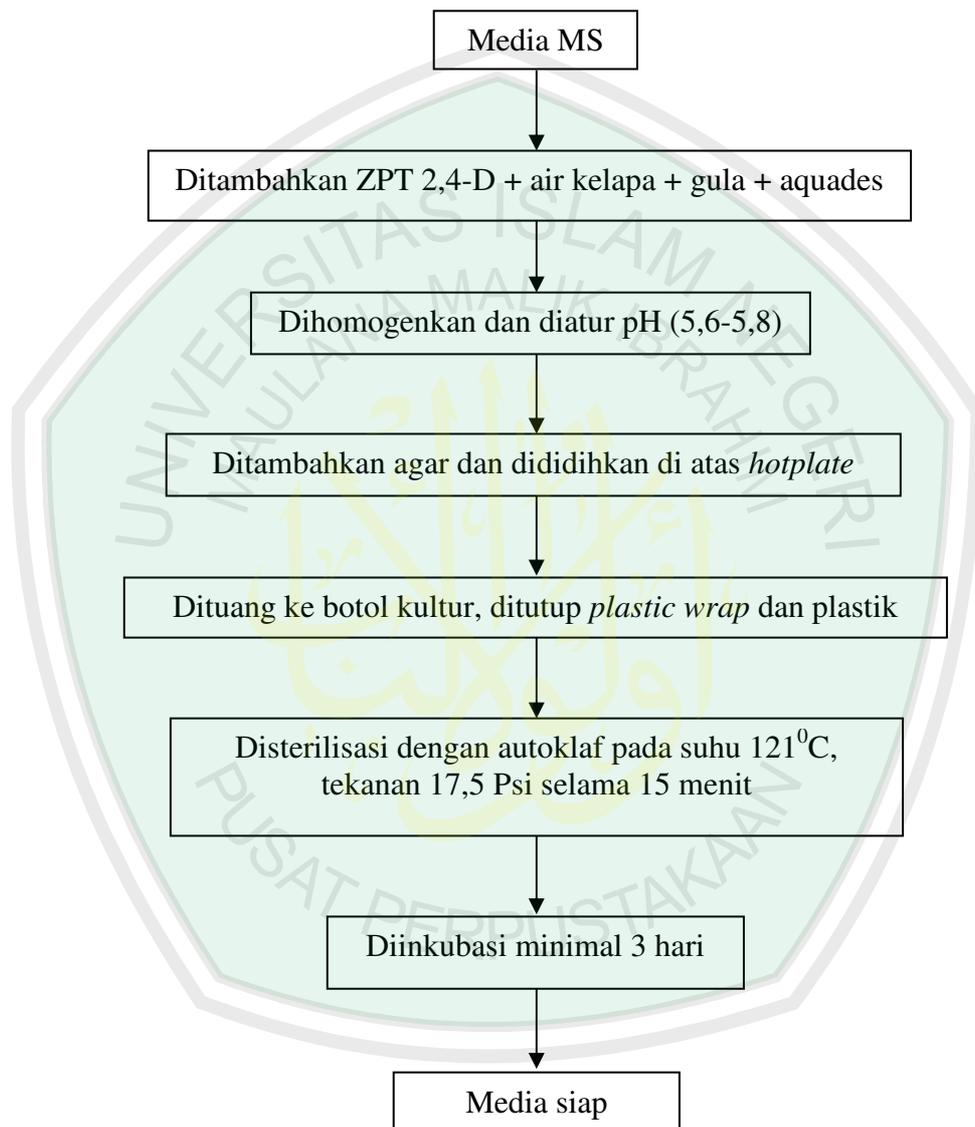
### 3.5 Pembuatan Media

1. Dimasukkan 150 mL media MS cair; 7,5 gr gula; ZPT dan air kelapa (AK) sesuai dengan perlakuan konsentrasi ke dalam gelas beker dan diletakkan di atas *hot plate*.
2. Ditambahkan aquades sampai volume 250 mL, kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer*.
3. Diukur pH larutan media dalam beaker glass (pH 5,6-5,8). pH diatur dengan HCl 1 N atau KOH 1 N.
4. Ditambahkan 1,75 gr agar.
5. Larutan media dididihkan dalam gelas beker sambil terus diaduk.
6. Larutan media MS dituangkan ke dalam botol kultur, masing-masing sebanyak 20 mL.
7. Botol kultur ditutup dengan plastik tahan panas dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm, selama 15 menit.
8. Botol berisi media MS diinkubasi dalam ruang inkubator selama minimal 3 hari.

### 3.6 Pelaksanaan

- a. Sterilisasi luar LAF
  1. Daun muda pegagan (*C. asiatica*) diambil dan dicuci dengan deterjen.
  2. Daun yang telah dicuci dimasukkan ke dalam botol berisi larutan deterjen dan dikocok.
  3. Kemudian dibilas dengan air mengalir sampai bersih.

4. Dibilas dengan aquades.
5. Daun muda yang telah bersih direndam dalam 300 mg/L fungisida selama 60 menit.



Gambar 3.1 Diagram alir cara pembuatan media.

b. Sterilisasi dalam LAF

1. Daun muda pegagan direndam dalam larutan desinfektan 30%, 20% dan 10%, masing-masing 10 menit.

2. Dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali, masing-masing 3 menit.
3. Dichelupkan ke dalam larutan antiseptik.
4. Eksplan dipotong dengan ukuran 5 mm x 5 mm.
5. Eksplan ditanam dalam botol kultur berisi media MS yang telah ditambahkan ZPT. Selanjutnya botol segera ditutup dengan *wrap plastic* dan plastik yang diikat dengan karet gelang.
6. Diulangi langkah di atas untuk semua unit percobaan.
7. Ditimbang setiap botol kultur dan dicatat.
8. Botol-botol kultur yang telah ditanami disimpan dalam ruang inkubator pada suhu 23°C (dapat dilengkapi dengan AC). Keadaan ruang inkubator harus steril.

### **3.7 Pengamatan**

#### **3.7.1 Pengamatan harian**

Pengamatan harian dilakukan setiap hari dimulai setelah penanaman untuk mengamati hari tumbuhnya kalus pertama dan kontaminasi.

1. Satuan parameter hari munculnya kalus adalah hari keberapa kalus terbentuk pada eksplan, dihitung dari hari setelah tanam (HST) yang ditandai dengan membengkaknya eksplan dan munculnya bintik-bintik putih.
2. Pengamatan kontaminasi adalah ada atau tidak adanya kontaminasi. Pengamatan dilakukan dengan mengamati secara langsung dengan melihat ciri-ciri umum koloni mikroorganisme (jamur ataupun bakteri).

#### **3.7.2 Pengamatan 2 minggu**

Pengamatan 2 minggu ini dilakukan pada warna kalus dan tekstur kalus yang terbentuk.

1. Satuan parameter warna kalus adalah dilihat dari warna kalus yang terbentuk, misalnya warna kalus hijau muda keputihan (HMP), kekuningan (K), kecokelatan (C) dan hijau (H).
2. Satuan parameter tekstur kalus adalah dilihat dari bentuk kalus yang nampak. Misalnya tekstur kalus remah (R), tekstur kompak (K) dan Intermediet (I).

### 3.7.3 Pengamatan akhir

Pengamatan akhir dilakukan di akhir hari pengamatan atau pada minggu ke-4. Parameter pengamatan meliputi berat basah kalus dan persentase eksplan berkalus.

1. Satuan parameter berat basah kalus adalah massa kalus basah yang diukur menggunakan timbangan analitik dengan satuan gram (gr). Berat seluruh eksplan berkalus dicari berat rata-ratanya. Hal ini dilakukan dengan mengambil kalus secara langsung (destruktif) dari botol untuk kemudian ditimbang.
2. Satuan parameter persentase eksplan berkalus adalah berapa banyak eksplan yang telah membentuk kalus dalam satuan persen (%), dengan rumus hitung sebagai berikut:

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

## 3.8 Analisis Data

Data pengamatan berupa data kuantitatif dan kualitatif. Selanjutnya untuk mengetahui pengaruh antar perlakuan, dilakukan uji statistik menggunakan ANAVA *Two-Way*. Bila terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan uji DMRT pada taraf 5% untuk mengetahui konsentrasi kombinasi 2,4-D dan air kelapa terbaik menggunakan SPSS 16.0. Data kualitatif berupa pengamatan visual hasil kultur disajikan secara deskriptif.

