

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

3.3.1 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, pipet, autoclave, lampu bunsen, penyemprot alkohol, pH meter, lemari pendingin, rak kultur, AC (*Air Conditioner*), lampu fluorescence, oven, kertas lebel, plastik, karet, *hot plate and magnetic stirrer*, kertas tissue, aluminium foil, alat *wrap plastic*, rak kultur dan kertas label (lampiran 7).

3.3.2. Bahan-bahan

Bahan utama yang digunakan adalah bagian daun muda dari tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) sebagai eksplan yang akan ditanam pada media. Bahan untuk sterilisasi adalah deterjen, aquades, fungisida, alkohol 70%, alkohol 90%, desinfektan, aquades steril dan betadin. Bahan media yang digunakan adalah Media MS (Murashige & Skoog), agar-agar 7%, ZPT dan gula 0.3%. ZPT yang digunakan yaitu 2,4-D dikombinasikan dengan air kelapa (lampiran 7).

3.4 Langkah Kerja

3.4.1 Sterilisasi Alat

Adapun langkah kerja dalam sterilisasi alat adalah:

1. Alat-alat *disecting* set (scalpel, pinset, gunting), alat-alat gelas dan botol kultur dicuci dengan detergen cair dan dibilas dengan air bersih.
2. Direndam alat-alat *disecting* set, alat-alat gelas dan botol kultur yang telah bersih di dalam Tepol selama 1 x 24 jam.
3. Kemudian dibilas alat-alat *disecting* set, alat-alat gelas dan botol kultur dengan air bersih.
4. Dikeringanginkan alat-alat *disecting* set, alat-alat gelas dan botol kultur dengan oven selama 2 jam dengan suhu 120⁰ C.
5. Alat-alat *disecting* set dibungkus dengan alumunium foil lalu dimasukkan dalam plastik sedangkan alat-alat gelas ditutup dengan plastik, kemudian disterilkan dalam autoclave dengan suhu 121⁰ C selama 20 menit.

3.4.2 Pembuatan Media

Adapun langkah kerja dalam Pembuatan media induksi kalus sebanyak 1 liter dilakukan dengan cara :

- a. Media MS ditimbang sebanyak 4,43 gr, gula sebanyak 30 gr dan agar-agar sebanyak 7 gr.
- b. Bahan-bahan seperti media MS, gula dan ZPT dimasukkan pada 1 liter aquades lalu dihomogenkan dengan stirer di atas hot plate.

- c. Setelah homogen, diukur pH sebesar 5,8 dengan pH meter, jika pH kurang dari 5,8 maka ditambahkan larutan NaOH 0,1 N dan jika pH lebih dari 5,8 maka ditambahkan HCl 0,1 N.
- d. Media ditambahkan agar jika pH telah sesuai.
- e. Setelah itu, dipanaskan dan diaduk hingga mendidih kemudian diangkat.
- f. Media diisikan ke dalam botol kultur sebanyak 20ml.
- g. Kemudian botol kultur yang berisi media ditutup dengan plastik dan diikat karet.

3.4.3 Sterilisasi Media

Media dalam botol kultur disterilkan dengan cara di masukkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

3.4.4 Sterilisasi Ruang Tanam

Adapun langkah kerja dalam sterilisasi ruang tanam adalah sebagai berikut:

- 1) Lantai pada ruang inisiasi dipel dengan wipol yang telah dicampur dengan air.
- 2) Setelah itu, dipel lantai dengan wipol murni.
- 3) Kapas diberi Formalin kemudian diletakkan dipojok-pojok ruangan.
- 4) Meja LAF (*Laminar Air Flow*) dibersihkan dengan alkohol 70% kemudian dinyalakan sinar UV selama 1x24 jam.

- 5) Setelah 1x24 jam, dimatikan sinar UV dan sebelum melakukan inisiasi dibersihkan lagi meja LAF (*Laminar Air Flow*) dengan alkohol 70%.

3.4.5 Tahap Induksi Kalus

1. Sterilisasi eksplan

Daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) dicuci dengan detergen cair lalu dibilas dengan air mengalir. Eksplan direndam dalam fungisida 5% selama 30 menit. Sterilisasi selanjutnya dilakukan di dalam LAF (*Laminar Air Flow*) dengan cara : eksplan direndam dalam bayclin™ 30%, 20%, dan 10% masing-masing selama 10 menit, lalu dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali, dan terakhir di rendam pada larutan betadine selama 1 menit.

2. Penanaman eksplan

Eksplan yang telah disterilisasi dipotong $\pm 1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ kemudian ditanam pada media MS dengan penambahan ZPT 2,4-D kombinasi air kelapadan diinkubasi selama 4 minggu. Penanaman dilakukan secara aseptik dalam LAF (*Laminar Air Flow*).

3. Tahap pemeliharaan

Botol-botol kultur yang telah terisi eksplan diletakkan dalam rak kultur dan disemprot dengan Alkohol 70% setiap 3 hari sekali. Suhu ruang yang digunakan adalah $25^0 \pm 2^0$ C dengan lama pencahayaan 16 jam/hari dengan lampu flouresence.

3.4.6. Pengamatan

3.4.6.1. 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. Satuan parameter kontaminasi adalah ada atau tidak adanya kontaminasi. Pengamatan kontaminasi dilakukan dengan mengamati secara langsung dengan melihat ciri-ciri umum koloni mikroorganisme (jamur ataupun bakteri).

3.4.6.2. Pengamatan 2 minggu

Pengamatan 2 minggu selama 14 hari dan 28 hari 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), kecoklatan (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 campuran (C).

3.4.6.3. Pengamatan akhir

Pengamatan akhir dilakukan di akhir hari pengamatan atau pada minggu ke-4 (28 hari). 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 (g). Berat seluruh eksplan dan dicari berat rata-ratanya.
2. Satuan parameter persentase eksplan berkalus adalah berapa banyak eksplan yang telah membentuk kalus dalam satuan persen (%), dengan rumus hitung sebagai berikut:

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

3.5. Analisis Data

Data pengamatan berupa data kuantitatif dan kualitatif. Selanjutnya untuk mengetahui pengaruh antar perlakuan, dilakukan analisis (ANOVA) two way menggunakan SPSS 16,0. Bila terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan uji DMRT pada taraf 5% untuk mengetahui konsentrasi ZPT yang terbaik. Data kualitatif berupa pengamatan visual hasil kultur disajikan secara deskriptif.