

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

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

3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan acak lengkap (RAL). Terdiri dari 2 faktor perlakuan, yaitu konsentrasi zat pengatur tumbuh BAP dan IBA.

1. Faktor Pertama, konsentrasi BAP (B) dengan 5 taraf, yaitu :

- a. B0 = BAP 0 mg/L
- b. B1 = BAP 0,5 mg/L
- c. B2 = BAP 1,0 mg/L
- d. B3 = BAP 1,5 mg/L
- e. B4 = BAP 2,0 mg/L

2. Faktor Kedua, konsentrasi IBA (I) dengan 3 taraf, yaitu :

- a. I0 = IBA 0 mg/L
- b. I1 = IBA 0,5 mg/L
- c. I2 = IBA 1,0 mg/L

Pengamatan dilakukan dengan 3 ulangan. Adapun 15 kombinasi perlakuan sehingga terdapat 45 buah unit percobaan yang ditunjukkan pada tabel berikut :

Tabel 3.1 Tabel Perlakuan Pemberian Kombinasi ZPT

ZPT		BAP				
		0 mg	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg
IBA	0 mg	B0I0	B1I0	B2I0	B3I0	B4I0
	0, 5 mg	B0I1	B1I1	B2I1	B3I1	B4I1
	1 mg	B0I2	B1I2	B2I2	B3I2	B4I2

Keterangan : Kontrol adalah perlakuan dengan kombinasi penambahan zat pengatur tumbuh IBA 0 mg + 0 mg (B0I0).

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1. Alat-alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas ukur, erlenmayer, cawan petri, batang pengaduk, botol kultur, alat-alat seksi (skalpel, pinset, gunting), LAF (*Laminar air flow*), timbangan analitik, pipet, alat sterilisasi (autoklaf, lampu spiritus, dan penyemprot alkohol), pH meter, lemari pendingin, rak kultur, thermometer, kertas label, plastik, karet, *hot plate*, kertas tisu, aluminium foil, *wrapp*.

3.3.2. Bahan-bahan

Bahan penelitian meliputi eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksplan mangium (*Acacia mangium*). Bahan untuk sterilisasi adalah detergen, alkohol 96%, alkohol 70%, Clorox 10 %, dan aquades steril. Media MS (Murashige & Skoog), ZPT berupa IBA dengan konsentrasi 0 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L dan BAP dengan konsentrasi BAP 0 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 1,5 mg/L, 2,0 mg/L.

3.4 Langkah Kerja

3.4.1 Sterilisasi Alat

1. Sterilisasi Basah

- a. Alat-alat direndam dengan tipol selam 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 foil
- 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° sampai kering.
- e. Dikeluarkan dari oven dan kemudian satu per satu alat dibungkus dengan alumunium foil.

- f. Dimasukkan ke dalam oven untuk disterilkan dengan suhu 125°C selama 3 jam.

3.4.2 Pembuatan Media

1. Dimasukkan 300 mL media MS cair : 15 gr gula, ZPT (BAP dan IBA) sesuai dengan perlakuan konsentrasi ke dalam gelas beker dan diletakkan di atas *hot plate*.
2. Ditambahkan aquades sampai volume 500 mL, kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer*.
3. Diukur pH larutan media dalam beker glass (pH 5,6-5,8). pH diatur dengan HCl 1 N atau KOH 1 N.
4. Ditambahkan 3 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.

3.4.3 Sterilisasi Media

Media dalam botol kultur di sterilisasi dengan steilisasi basah yaitu autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

3.4.4 Sterilisasi Ruang Tanam

Lantai pada ruang inisiasi dipel dengan wipol yang telah dicampur dengan air. Setelah itu dipel lantai dengan wipol murni. Diletakkan kapas yang telah diberi formalin dipojok-pojok ruangan. Meja LAF (*Laminar air flow*) disemprot dan dibersihkan dengan alkohol 70% terlebih dahulu. Kemudian dinyalakan sinar UV selama 1x24 jam. 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 Tunas

2.4.5.1 Sterilisasi Eksplan

a. Di Luar LAF

1. Nodus batang yang diambil direndam dengan detergen selama 30 menit sambil dikocok.
2. Kemudian dibilas dengan air mengalir sampai bersih selama 10 menit.
3. Nodus batang muda telah bersih direndam dalam larutan fungisida selama 5 jam.
4. Kemudian dibilas dengan air mengalir selama 5 menit.

b. Di Dalam LAF

1. Nodus batang muda disterilisasi dalam alkohol 70% selama 3 menit lalu dibilas dengan aquades steril selama 5 menit.
2. Kemudian dilanjutkan dengan direndam larutan disinfektan 30%, 20%, dan 10%, masing-masing 10 menit.

3. Dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit.
4. Kemudian eksplan dicelupkan ke dalam larutan betadine yang diencerkan dengan aquades steril ke dalam petridish.
5. Selanjutnya eksplan ditanam ke dalam botol yang telah berisi media MS dengan perlakuan yang berbeda.

3.4.5.2 Penanaman Eksplan

1. Eksplan dipotong dengan ukuran 1.5 cm.
2. Eksplan ditanam didalam botol yang telah berisi media MS dengan perlakuan kombinasi ZPT BAP dan IBA. Selanjutnya botol segera ditutup dengan *wrapp* plastik dan plastik yang diikat dengan karet gelang.
3. Diulangi langkah di atas untuk semua unit percobaan dan diinkubas selama 10 minggu. Penanaman dilakukan seacara aseptik dalam LAF (*Laminar Air Flow*).

3.4.5.3 Tahap Pemeliharaan

Botol-botol yang telah terisi eksplan diletakkan dalam rak kultur dan disemprot dengan alkohol 70% setiap 3 hari sekali. Kondisi lingkungan pemeliharaan menggunakan suhu 20-25°C dan menggunakan pencahayaan 2000 Lux. Setiap harinya mendapatkan 8 jam kondisi gelap dan 12 jam kondisi terang.

3.4.6 Pengamatan

3.4.6.1 Pengamatan Harian

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

1. Satuan parameter hari munculnya tunas adalah minggu keberapa tunas terbentuk pada eksplan, di hitung dari minggu setelah tanam (MST) yang ditandai dengan munculnya tunas pada nodus batang.
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 Akhir

Pengamatan akhir dilakukan di akhir hari pengamatan minggu ke-12. Parameter pengamatan meliputi, panjang tunas, jumlah tunas dan jumlah filodia yang dihasilkan tunas pada masing-masing media perlakuan.

3.5 Analisis Data

Data pengamatan berupa data kuantitatif dan kualitatif. Selanjutnya untuk mengetahui pengaruh antar perlakuan, (data kuantitatif) dilakukan analisis ANOVA *two way* menggunakan SPSS 16.0. bila terdapat perbedaan nyata maka dilakukan uji *Duncan multiple range test* (DMRT) 5% untuk mengetahui konsentrasi ZPT terbaik. Data kualitatif berupa pengamatan visual hasil kultur disajikan secara deskriptif.