

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai dengan Mei 2003 di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Benih Induk (BBI) Hortikultura, Salaman, Magelang .

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah : botol kultur, aluminium foil, erlenmeyer 1 liter, gelas ukur, gelas piala, cawan petri, pH meter, “hot plate”, pengaduk, autoklaf, neraca analitik, “hand sprayer”, “skalpel”, oven, pinset, lampu spiritus, “Laminar Air Flow” (LAF), parafilm.

3.2.2 Bahan

Bahan yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah : umbi kentang (*Solanum tuberosum*, L) varietas granola yang diperoleh dari BBI Kledung, medium Murashige-Skoog, aquadest steril, larutan NaOH 0,1 N, larutan HCl 0,1 N, alkohol, detergent, fungisida, bakterisida, antibiotik, dan larutan clorox 20 %.

3.3 Cara Kerja

3.3.1 Persiapan

C.1.1 Sterilisasi alat dan bahan

- Sebelum digunakan, alat-alat dari gelas dan logam dicuci dengan detergent serta air mengalir, kemudian dibungkus dengan aluminium foil, lalu disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 160-180 °C., selama 2 jam.
- Bahan seperti medium dan aquadest yang berada dalam labu erlenmeyer ataupun pada tabung reaksi, ditutup dengan aluminium foil, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C, 2 atm selama 20 menit (Suryowinoto, 1996).

C.1.2 Sterilisasi eksplan

- eksplan diambil dari umbi kentang, lalu dikupas dan dibilas air mengalir.
- eksplan direndam dalam larutan yang berisi detergent dan fungisida selama 1,5 jam, lalu dibilas dengan air mengalir.
- eksplan direndam dalam larutan yang berisi bakterisida dan antibiotik selama 1,5 jam sambil digojog.
- eksplan kemudian dibilas 3 kali dengan air suling.
- dalam LAF eksplan direndam larutan clorox 20 % selama 5 menit, setelah itu umbi tersebut dibelah menjadi dua lalu umbi dipotong-potong dengan ukuran 0,5 X 0,5 cm dan tebal 2 mm.

3.3.2 Pembuatan medium

C.2.1 Pembuatan larutan stok

Pembuatan larutan stok meliputi stok makro (A), stok mikro (B), stok Fe-EDTA (C) dan stok vitamin (D) (Lampiran 7).

C.2.2 Pembuatan media

Dalam pembuatan media ini dibuat 5 perlakuan yang berbeda-beda, yaitu pada perbedaan konsentrasi thiamin yang ditambahkan pada media MS.

Pembuatan media sebanyak 0,2 liter untuk masing-masing perlakuan:

- Untuk membuat 0,2 liter media, digunakan erlenmeyer 300 ml.
- Mula-mula dimasukkan stok makro (A) 10 ml, stok mikro (B) 10 ml, stok Fe-EDTA C 10 ml, (masing-masing 5 kali pengukuran stok A,B,C yang kemudian dimasukkan pada 5 tabung erlenmeyer yang berbeda).
- Setelah itu masing-masing ditambahkan 10 ml stok vitamin (D) yang mengandung thiamin dengan konsentrasi yang berbeda tiap perlakuan, sehingga perlakuannya menjadi sbb :
 1. Perlakuan I : stok vit dengan thiamin 0 mg
 2. Perlakuan II : stok vit dengan thiamin 2,5 mg
 3. Perlakuan III : stok vit dengan thiamin 5,0 mg
 4. Perlakuan IV : stok vit dengan thiamin 7,5 mg
 5. Perlakuan V : stok vit dengan thiamin 10 mg
- Dilakukan pengaturan pH medium dengan cara penambahan NaOH 1 N atau HCl 1 N supaya pH media tersebut mencapai 5,8 dan kemudian ditambahkan aquadest steril sampai 200 ml.
- Lalu ditambahkan sukrosa 6 g dan agar sebanyak 1,6 g.

- Medium dipanaskan sampai mendekati titik didih sambil terus diaduk sampai larut seluruhnya dengan menggunakan stirer, lalu diangkat dan dimasukkan ke dalam botol kultur serta ditutup dengan kertas alumunium foil.
- Disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 2 atm selama 20 menit.

3.3.3 Penanaman eksplan dan inkubasi

- Penanaman eksplan dilakukan dari dalam “Laminar Air Flow” (LAF).
- Masing-masing eksplan ditanam dalam botol kultur dan diinkubasi dalam ruang kultur sampai tumbuh kalus.
- Pelaksanaan inkubasi kultur *in vitro* tanaman kentang dilakukan pada temperatur 25⁰ C (George and Sherington, 1984) dan intensitas cahaya 600 - 1000 lux (Gunawan, 1995) selama 21 hari.

3.3.4 Parameter

a. Parameter Utama

Penimbangan kalus dilakukan setelah 21 hari diinkubasi.

1. Berat basah kalus (g), dengan menimbang kalus pada keadaan segar.
2. Berat kering kalus (g), dengan menimbang kalus dalam keadaan kering setelah di oven pada suhu 70⁰ C sampai diperoleh berat yang konstan.
3. Persentase pencoklatan eksplan, dengan menghitung jumlah eksplan yang mengalami pencoklatan dibandingkan total eksplan tiap perlakuan.

b. Parameter Pendukung

1. Hari mulai tumbuh kalus (hari), diperoleh dengan menghitung jumlah hari dimana pertama kali kalus tumbuh.
2. Kondisi lingkungan, meliputi temperatur (⁰ C) dan kelembaban udara (%) (dilakukan mulai hari pertama pananaman eksplan).

3.3.5 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan faktor tunggal yaitu kadar thiamin dalam medium MS dengan 5 perlakuan yaitu kadar thiamin 0 mg/L (P1); 2,5 mg/L (P2); 5,0 mg/L (P3); 7,5 mg/L (P4); dan 10 mg/L (P5). Pada tiap perlakuan dilakukan 5 kali ulangan, dengan variabel bebas kadar thiamin sedangkan variabel tergangungnya berat basah dan berat kering.

Data yang diperoleh dianalisis dengan “analysis of varian” (ANOVA) pada taraf uji 5 %, bila ada minimal satu perlakuan yang berbeda akan dilakukan uji lanjut dengan uji DMRT (Duncan’s Multiple Range Test) pada taraf uji 5 % (Gomez and Gomez, 1995).

