

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

- Tempat pelaksanaan penelitian di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Balai Benih Induk Hortikultura Salaman, Magelang.
- Penelitian dilaksanakan mulai bulan Maret – Mei 2003

B. Alat dan Bahan

B.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Laminar Air Flow (LAF), autoklaf, oven, hot plate, magnetik stirer, refrigerator, higrometer, termometer, tabung Erlenmeyer, gelas ukur, cawan petri (petridish), pengaduk, pH meter, neraca analitik, skalpel, pinset, botol kultur, parafilm, dan aluminium foil.

B.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : umbi kentang varietas granola, komposisi medium MS (Murashige dan Skoog) (Lampiran 5), GA₃, kinetin, alkohol, HCl 1 N, NaOH 1 N, fungisida, bakterisida, antibiotik, larutan klorox 20 %, air steril, akuades, dan deterjen.

C. Cara Kerja

C.1 Persiapan

C.1.1 Sterilisasi alat dan bahan

- Alat-alat dari gelas dan logam dicuci dengan deterjen dan dibilas dengan air mengalir. Kemudian dibungkus dengan aluminium foil, lalu disterilkan dengan oven pada suhu 160° - 180° C, selama 2 jam.
- Bahan seperti medium dan akuades disterilisasi dengan otoklaf pada suhu 121° C, 2 atm selama 20 menit.

C.1.2 Sterilisasi Eksplan

- Eksplan diambil dari umbi kentang, lalu dikupas dan dibilas dengan air mengalir
- Eksplan direndam dalam larutan yang berisi deterjen 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 klorox 20 % selama 5 menit, setelah itu umbi tersebut dibelah menjadi dua lalu umbi dipotong-potong dengan ukuran 1 x 1 cm dengan tebal 2 mm.

C.2 Pembuatan Medium Murashige dan Skoog (MS)

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 5)

C.2.2 Pembuatan media

Dalam pembuatan media ini dibuat 9 perlakuan yang berbeda-beda, yaitu pada perbedaan konsentrasi GA₃ dan kinetin yang ditambahkan pada media MS.

Pembuatan media sebanyak 0,1 liter untuk masing-masing perlakuan :

- Untuk membuat 0,1 liter media, digunakan tabung Erlenmeyer 200 ml
- Mula-mula dimasukan stok makro 5 ml, stok mikro 1 ml, stok Fe-EDTA 1 ml, dan stok vitamin 1 ml (masing-masing 4 kali pengukuran stok A, B, C, D yang kemudian dimasukan pada 9 tabung Erlenmeyer yang berbeda.
- Setelah itu masing-masing ditambahkan larutan stok zat pengatur tumbuh GA₃ dan kinetin sesuai dengan kombinasi perlakuan sebagai berikut :
 - a. S₀I₀: stok ZPT dengan GA₃ 0 mg/l dan kinetin 0 mg/l
 - b. S₁I₀: stok ZPT dengan GA₃ 1 mg/l dan kinetin 0 mg/l
 - c. S₂I₀: stok ZPT dengan GA₃ 2 mg/l dan kinetin 0 mg/l
 - d. S₀I₃: stok ZPT dengan GA₃ 0 mg/l dan kinetin 3 mg/l
 - e. S₁I₃: stok ZPT dengan GA₃ 1 mg/l dan kinetin 3 mg/l
 - f. S₂I₃: stok ZPT dengan GA₃ 2 mg/l dan kinetin 3 mg/l
 - g. S₀I₆: stok ZPT dengan GA₃ 0 mg/l dan kinetin 6 mg/l
 - h. S₁I₆: stok ZPT dengan GA₃ 1 mg/l dan kinetin 6 mg/l
 - i. S₂I₆: stok ZPT dengan GA₃ 2 mg/l dan kinetin 6 mg/l
- Dilakukan pengaturan pH medium agar mencapai 5,8 dengan cara penambahan NaOH 1 N atau HCl 1N kemudian ditambahkan akuades steril hingga volumenya 100 ml.
- Kemudian ditambahkan sukrosa 3 g dan agar sebanyak 0,8 g.

- Media dipanaskan sampai mendekati titik didih sambil terus diaduk sampai larut seluruhnya dengan menggunakan pengaduk, lalu diangkat dan dimasukkan ke dalam botol kultur serta ditutup dengan kertas aluminium foil.
- Media disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121° C, tekanan 2 atm selama 20 menit.

C.3 Penanaman Eksplan dan Inkubasi

- Penanaman eksplan dilakukan di dalam 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 suhu 25° C dan intensitas cahaya 1000 lux.

C.4 Pengamatan

- Eksplan diamati sampai terjadi inisiasi kalus. Pemanenan dilakukan bersama-sama. Kemudian masing-masing kalus dikeluarkan dari botol kultur.
- Dilakukan penimbangan berat basah dan berat kering setelah kalus dibersihkan dari medium dan air dengan tisu.

D. Parameter

Parameter yang diamati :

1. Berat basah kalus

Berat basah dalam gram diperoleh dengan menimbang kalus dan eksplan dalam keadaan basah pada akhir penelitian.

2. Berat kering kalus

Berat kering dalam gram diperoleh dengan menimbang kalus dan eksplan dalam keadaan kering setelah dioven pada suhu 70° C selama 2 x 24 jam sehingga diperoleh berat yang konstan.

3. Waktu tumbuh kalus dalam hari diamati pada saat pertama tumbuh kalus.

E. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan RAL pola faktorial 3×3 , dengan perlakuan ZPT GA_3 dan kinetin. Konsentrasi GA_3 terdiri dari 3 taraf uji, yaitu 0 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l. Konsentrasi kinetin terdiri dari 3 taraf uji, yaitu 0 mg/l, 3 mg/l, 6 mg/L (George dan Sherrington, 1984), pada tiap perlakuan dilakukan 4 kali perulangan.

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan Konsentrasi GA_3 dan Kinetin

GA_3	Kinetin		
	0 mg/L	3,0 mg/L	6,0 mg/L
0 mg/L	$S_0 I_0$	$S_0 I_3$	$S_0 I_6$
1,0 mg/L	$S_1 I_0$	$S_1 I_3$	$S_1 I_6$
2,0 mg/L	$S_2 I_0$	$S_2 I_3$	$S_2 I_6$

Data yang diperoleh dianalisis dengan ANOVA pada taraf uji 5 %. Jika terdapat beda nyata dilanjutkan dengan uji Duncan dengan taraf signifikan 5 % untuk mengetahui perbedaan pengaruh masing-masing perlakuan.