

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang pada bulan Desember 2004 sampai Februari 2005.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat gelas terdiri dari : gelas piala, gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri, batang pengaduk, botol kultur. Alat-alat logam terdiri dari : skalpel, pinset, gunting. Alat sterilisasi terdiri dari : autoklaf, oven, lampu spiritus, dan penyemprot alkohol. "Laminair Air Flow Cabinet", neraca (ketelitian 0,001 g), pipet, pH meter, rak kultur, higrometer, termometer, lampu TL, kertas label, kertas payung, "hot plate", kertas tisu, aluminium foil.

3.2.2 Bahan

Bahan media MS terdiri dari : larutan stok mikronutrien; larutan stok makronutrien; larutan stok sumber besi; larutan stok zat pengatur tumbuh NAA dan BAP; akuades steril; agar; larutan stok zat organik yaitu sukrosa, vitamin dan asam amino. Bahan sterilisasi terdiri dari : alkohol 70%, spirtus, detergen cair, HgCl₂ 1%. Bahan buffer pH yaitu : NaOH 0,1 N dan HCl 0,1 N. Bahan eksplan

yaitu : tunas rimpang *Curcuma mangga* (Vall.et.Zyp) umur 12 bulan yang diperoleh dari BPTP Ungaran.

3.3 Cara Kerja

1. Sterilisasi Alat

- Alat-alat dissecting set (skalpel, pinset, gunting), alat-alat dari gelas dan logam dicuci dengan detergen dan dibilas dengan air bersih beberapa kali kemudian dikeringanginkan.
- Alat-alat gelas ditutup aluminium foil sedangkan alat-alat logam dan cawan petri dibungkus dengan kertas payung, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 30 menit.

2. Pembuatan Media Kultur

- Larutan stok media MS (Lampiran 5) satu per satu dimasukkan ke dalam gelas piala 1000 mL, kemudian secara berurutan dimasukkan sukrosa 30 gram, larutan stok NAA dan BAP sesuai perlakuan, akuades hingga volume menjadi 1 liter dan terakhir ditambah agar 7 gram.
- Media dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk, kemudian diangkat.
- Keasaman media diatur pada pH 5,8 dengan menggunakan pH meter, jika pH kurang dari 5,8 maka ditambahkan larutan NaOH 0,1 N dan jika pH lebih dari 5,8 maka ditambahkan larutan HCl 0,1 N.
- Kemudian media diisikan ke dalam botol kultur sebanyak 20 mL.
- Setiap botol kultur ditutup dengan tutup plastik.

3. Sterilisasi Media

Media dalam setiap botol kultur disterilisasi dengan cara diautoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15-20 menit.

4. Sterilisasi Ruang Tanam

-Ruang tanam disterilisasi dengan sinar UV selama 1 jam sebelum LAF digunakan kemudian ketika LAF akan digunakan maka sinar UV harus dimatikan dan di dalam "Laminair Air Flow" disemprot dengan alkohol 70% terlebih dahulu sebelum dilakukan penanaman.

- Alat-alat yang dimasukkan ke dalam LAF harus disemprot dengan alkohol 70% terlebih dahulu.

- *Air flow* dihidupkan baik sebelum digunakan, saat digunakan, maupun sesudah digunakan yaitu dengan menghidupkan *blower*.

5. Persiapan dan Sterilisasi Eksplan

- Rimpang temu mangga yang dipanen dari tanaman berumur 12 bulan dicuci bersih kemudian diletakkan pada tempat yang lembab untuk memperpendek masa dormansi mata tunas. Rimpang temu mangga yang sudah muncul tonjolan-tonjolan tunas $\pm 0,5$ cm diambil dan dipotong dengan ukuran sekitar 1 cm³.

- Kulitnya dibersihkan dari kotoran dengan cara disikat, dicuci dengan larutan deterjen cair dan dibilas dibawah air bersih keran yang mengalir. Kemudian diletakkan di dalam botol steril yang berisi akuades steril sampai siap sterilisasi berikutnya di dalam LAF.

- Dalam LAF eksplan direndam dalam alkohol 70% selama 2 menit, kemudian dibilas dengan akuades steril selama 2 x 5 menit. Setelah itu eksplan direndam dalam larutan HgCl₂ 1% selama 10 menit, kemudian dibilas dengan akuades steril selama 2 x 5 menit. Tahap selanjutnya eksplan diletakkan di atas kertas tisu steril dalam cawan petri untuk mengurangi kadar air dalam eksplan. Kemudian eksplan ditanam dalam botol kultur yang berisi media MS + Zat Pengatur Tumbuh sesuai perlakuan.

6. Pemeliharaan Eksplan

- Eksplan yang telah ditanam dalam botol kultur diatur pada rak kultur yang diberi penyorotan dengan lampu TL selama 24 jam.
- Eksplan diinkubasi dalam ruang kultur pada suhu 20-25°C dan kelembaban ruang 60-75% selama 45 hari.

3.4 Parameter Penelitian

Parameter utama yang diamati adalah:

1. Jumlah tunas (buah) : diperoleh dengan cara menghitung setiap tunas yang muncul dari eksplan pada akhir penelitian.
2. Berat basah tunas (g) : diperoleh dengan cara menimbang tunas dalam keadaan segar saat pemanenan.
3. Berat kering tunas (g) : diperoleh dengan cara mengoven tunas pada suhu 70°C-80°C sampai mencapai berat yang konstan (Salisbury & Ross, 1995).

Parameter pendukung yang diamati adalah faktor lingkungan yaitu kelembaban ruang kultur (%) dan suhu ruang kultur ($^{\circ}\text{C}$).

3.5 Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan lima perlakuan pemberian zat pengatur tumbuh NAA dan BAP.

Tabel 1. Perlakuan NAA dan BAP pada berbagai konsentrasi

BAP (mg/L)	0	2,5	5	7,5	10
NAA (mg/L)					
0.1	P0	P1	P2	P3	P4

Keterangan : P0 = NAA 0,1 mg/L + BAP 0 mg/L
 P1 = NAA 0,1 mg/L + BAP 2,5 mg/L
 P2 = NAA 0,1 mg/L + BAP 5 mg/L
 P3 = NAA 0,1 mg/L + BAP 7,5 mg/L
 P4 = NAA 0,1 mg/L + BAP 10 mg/L

Masing-masing perlakuan diulang lima kali. Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis sidik ragam pada taraf uji 5% dan apabila terdapat beda nyata dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf uji 5% (Gomez & Gomez, 1995).