

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

##### 4.1.1. Tempat

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Balai Pengembangan Budidaya Tanaman Obat PT. Sido Muncul, Karang Jati, Semarang.

##### 4.1.2. Waktu

Penelitian dilakukan pada bulan April sampai Oktober 2001

#### 4.2. Alat dan Bahan

##### 4.2.1. Alat

- a. Alat sterilisasi: autoklaf, oven, dan lampu bunsen
- b. Alat-alat gelas: erlenmeyer, gelas piala, gelas ukur, botol kultur dan cawan petri
- c. Alat-alat logam: pinset, pisau steril, gunting, dan sendok pengaduk
- d. Neraca analitik
- e. pH meter
- f. "Magnetik stirer"
- g. "Hot Plate Stirer"
- h. "Laminar Air Flow" (LAF)
- i. Lemari pendingin

- j. Rak kultur
- k. Almari steril
- l. Pipet

#### 4.2.2. Bahan

- a. Bahan Kimia: komponen-komponen medium MS (Lampiran 06.), akuades, akuades steril, HCl 0,1 N, NaOH 0,1 N, alkohol 70% dan 96%, hormon 2,4-D, deterjen, dan natrium klorida (NaClO) 0,5%.
- b. Bahan Tanaman: ibu tangkai daun purwoceng, berumur empat bulan yang diambil dari Dataran Tinggi Dieng.
- c. Alumunium foil, kertas label, kertas payung dan tissue.

#### 4.3. Cara Kerja

##### 4.3.1. Persiapan

- a. Pencucian alat

Alat-alat yang terbuat dari gelas dan logam dicuci dengan deterjen dan dibilas dengan air kemudian dikeringkan.

- b. Sterilisasi alat dan bahan

1. Alat-alat dari gelas dan logam dibungkus dengan kertas payung kemudian disterilkan dengan oven pada suhu 160-180<sup>0</sup>C selama 2 jam.
2. Medium dan akuades yang berada dalam erlenmeyer ditutup dengan alumunium foil kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C, 2 atmosfer selama 20 menit.

### c. Sterilisasi ruang tanam

Ruang tanam disterilisasi dengan penyemprotan alkohol 70%. Sterilisasi LAF dilakukan satu jam sebelum penanaman yaitu dengan radiasi sinar ultraviolet dan selama penanaman eksplan, sterilisasi dilakukan dengan menghidupkan “blower”.

### 4.3.2. Pembuatan Medium

Medium yang digunakan untuk induksi kalus adalah medium MS. Untuk membuat 1 liter medium, maka 400 ml akuades dimasukkan ke dalam gelas piala 1000 ml kemudian ditambahkan stok A kecuali amonium nitrat, stok B1, stok B2, stok C, stok D, stok E, dan mio-inositol, kemudian ditambahkan zat pengatur tumbuh 2,4-D sebanyak 3,75 ppm untuk memacu pertumbuhan kalus. Setelah itu pH larutan diukur dengan pH meter 5,8 dengan menambahkan NaOH 0,1 N atau HCl 0,1 N, kemudian amonium nitrat dimasukkan sesuai dengan perlakuan. Bubuk agar yang ditambahkan sebanyak 8,5 g/l serta ditambah sukrosa 30 g/l. Setelah itu volume akuades ditambahkan sampai 1000 ml.

### 4.3.3. Pelaksanaan Kultur

#### a. Persiapan eksplan

Eksplan diambil dari ibu tangkai daun purwoceng urutan ketiga dari pucuk. Ibu tangkai daun dicuci dengan air mengalir, direndam dalam 200 ml air yang diberi tiga tetes sabun cair selama lima menit, kemudian dibilas dengan akuades sebanyak tiga kali. Setelah itu eksplan dimasukkan dalam larutan sunclin 10 % sambil di gojog selama 60 detik, kemudian dibilas dengan akuades sebanyak

tiga kali. Hal yang sama juga dilakukan terhadap eksplan di dalam “Laminar Air Flow” dan akuades yang digunakan adalah akuades steril.

b. Penanaman eksplan

Ibu tangkai daun yang sudah steril dipotong dengan ukuran 1 cm. Eksplan dimasukkan ke dalam botol kultur yang berisi medium MS padat dan kultur dipelihara dalam ruang inkubasi pada suhu 25°C.

#### 4.4. Pengamatan

Pengamatan dilakukan setiap hari sampai kalus mulai teramati kemudian pengamatan dilakukan setiap 2 hari sekali, untuk melihat ada atau tidak adanya kontaminasi dan pencoklatan (“browning”). Kultur yang terkontaminasi segera dikeluarkan dari ruang kultur. Setelah eksplan berumur 4 minggu (30 hari), kalus dipanen.

#### 4.5. Parameter yang Diamati

##### 4.5.1. Parameter Utama

Parameter utama yang diamati meliputi:

a. Berat basah kalus

Berat basah kalus diperoleh dengan menimbang kalus dari eksplan yang telah diinkubasi selama 30 hari. Kalus dipanen serta dibersihkan dari medium yang melekat dengan tissue kemudian kalus ditimbang.

b. Berat kering kalus

Berat kering kalus diperoleh setelah kalus dikeringkan dalam oven pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$ . Kalus ditimbang sampai mencapai berat yang konstan, yaitu sekitar tiga hari setelah dikeringkan dalam oven.

#### 4.5.2. Parameter Pendukung

Parameter pendukung yang diamati meliputi:

a. Hari pertama kali kalus teramati

Waktu induksi kalus merupakan hari pertama kali kalus teramati. Waktu pertama kali kalus teramati dihitung pada hari saat kalus mulai tumbuh.

b. Faktor lingkungan

Suhu dan kelembaban relatif ruang inkubasi kultur merupakan parameter pendukung yang diamati. Suhu dan kelembaban relatif diamati selama penelitian.

#### 4.6. Rancangan Penelitian

Penelitian menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) faktor tunggal dengan perlakuan kadar amonium nitrat yang berbeda dalam medium MS padat. Masing-masing perlakuan terdiri dari lima ulangan dengan variabel bebas kadar amonium nitrat sedangkan variabel tergantungnya adalah berat basah dan berat kering kalus. Adapun perlakuan tersebut adalah:

1. P1 = Kadar amonium nitrat 1300 ppm
2. P2 = Kadar amonium nitrat 1475 ppm
3. P3 = Kadar amonium nitrat 1650 ppm

4. P4 = Kadar amonium nitrat 1825 ppm
5. P5 = Kadar amonium nitrat 2000 ppm (George and Sherrington, 1984).

#### 4.7. Analisis Data

Analisis menggunakan ANOVA (“Analysis of Varians”) dengan taraf uji signifikansi 5%. Apabila data dari masing-masing perlakuan yang ditunjukkan terdapat paling sedikit satu perlakuan yang berbeda, maka akan dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji DMRT (“Duncan’s Multiple Range Test”) dengan taraf uji signifikansi 5% (Gomez and Gomez, 1995).

