

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Pelaksanaan

- Tempat pelaksanaan Penelitian di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Balai Penelitian Tanaman Obat (BPTO) Tawangmangu, Surakarta.
- Waktu : Bulan Februari - Agustus 2001.

B. Alat dan Bahan

1. Alat : 'Laminar Air Flow', almari pendingin, neraca analitik, alat-alat dari gelas (botol kultur, erlenmeyer, gelas piala, gelas ukur, petridish), alat tanam (pinset, gunting, skalpel), alat untuk sterilisasi (autoclave, 'milipore filter', bunsen, sprayer), oven, pH meter, 'hot plate' dan 'magnetik stirer' dan alat pemotret
2. Bahan-bahan :
 - Bahan eksplan berupa tunas apikal tanaman stevia yang berumur 6 bulan dengan ukuran 20 mm yang mempunyai 3 helai daun
 - Bahan-bahan kimia antara lain : bahan-bahan penyusun medium Murashige dan Skoog (MS) antara lain : larutan stok makro nutrien , stok mikro nutrien, stok Fe-EDTA, vitamin, stok ZPT NAA dan BAP, dan stok mio-inositol
 - Bahan-bahan untuk sterilisasi antara lain: Aquadest steril, alkohol 70%, clorox 10%, larutan fungisida, dan deterjen
 - Bahan penutup botol kultur seperti alumunium foil dan kertas "cling wrap", serta kertas payung sebagai bahan penutup alat-alat logam dan gelas sebelum disterilisasi dengan autoclave.

C. Cara Kerja

1. Pencucian alat

- Alat-alat dicuci dengan deterjen kemudian dibilas dengan air mengalir sampai bersih.

3. Sterilisasi alat

Sterilisasi alat meliputi sterilisasi dengan panas kering (menggunakan oven) dan sterilisasi dengan uap bertekanan tinggi (menggunakan autoclave).

- Sterilisasi panas kering yaitu dengan menggunakan oven pada suhu 160-180°C untuk alat-alat dari gelas seperti erlenmeyer, petridish dan botol kultur.
- Sterilisasi dengan uap bertekanan tinggi yaitu dengan menggunakan autoclave pada suhu 121⁰ C tekanan 2 atm selama 15 menit untuk alat-alat logam dan alat-alat tanam seperti pinset dan sebagian alat gelas seperti petridish yang sebelumnya dibungkus dahulu dengan kertas payung.

3. Sterilisasi ruangan

- Ruang penanaman atau ruang kultur disterilisasi dengan menggunakan lampu germicidal yang memancarkan radiasi ultra violet selama 1 jam, kemudian ruang tersebut disemprot dengan alkohol 70%.

4. Pembuatan larutan stok media MS

- Pembuatan larutan stok berdasarkan pengelompokan dalam stok makronutrien, stok mikronutrien, stok Fe-EDTA, stok vitamin, stok mio-inositol dan stok hormon (Lampiran 5).

- Setelah semua larutan stok tersedia, untuk membuat 1 liter medium, setiap stok diambil sesuai dengan ukurannya, kemudian dilakukan pengukuran pH yaitu pH media antara 5.0 – 6.0 dengan cara menambahkan larutan NaOH 1 N atau dengan HCl 1N. Selanjutnya sukrosa sebanyak 30 g dan agar sebanyak 8 g dilarutkan dalam aquadest, kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai mendidih. Larutan agar ini kemudian dituangkan kedalam media yang telah disiapkan dalam erlenmeyer sambil diaduk supaya agar dan media tercampur kemudian dituangkan ke dalam botol-botol kultur ukuran 100 ml dengan volume media 10 ml dan ditutup dengan aluminium foil.
- Masing-masing bagian diberi zat pengatur tumbuh NAA dan BAP sesuai dengan konsentrasi yang dibutuhkan dalam perlakuan (kombinasi perlakuan NAA dan BAP dapat dilihat pada Tabel 01).

5. Sterilisasi medium

- medium yang telah dibuat dimasukkan dalam botol-botol kultur dan ditutup rapat dengan kertas aluminium foil.
- untuk sterilisasi medium dilakukan dengan menggunakan autoclave dengan suhu 121° C, tekanan 2 atm selama 15 menit.

6. Persiapan eksplan

a. Pengambilan, penimbangan, dan sterilisasi eksplan

- Setiap eksplan ditimbang dengan menggunakan neraca analitik untuk mendapatkan berat basah awal dari eksplan, apabila terdapat pemotongan pada bagian pangkal eksplan setelah sterilisasi maka hasil

potongan tersebut ditimbang lagi kemudian dikurangkan dengan berat basah eksplan pada awal penimbangan untuk mendapatkan berat basah awal eksplan.

- Eksplan dicuci dengan air mengalir sampai bersih, direndam dalam larutan fungisida 0.1% selama 30 menit, dibilas dengan aquadest dilanjutkan dengan perendaman dengan deterjen 3-5 menit sambil digosok pelan-pelan dengan menggunakan kuas kemudian dibilas lagi sampai bersih dengan aquadest steril.
 - Eksplan kemudian direndam dalam larutan clorox 10% selama 5 menit sambil digojok pelan-pelan
 - Eksplan dibilas dengan aquadest steril beberapa kali di dalam 'laminar air flow' atau secara aseptis
- b. Penanaman eksplan.
- eksplan yang telah disterilkan, di dalam 'laminar air flow' diletakkan pada petridish steril
 - bagian pangkal eksplan bekas sterilisasi dibuang dengan memotongnya menggunakan pisau steril ('blades')
 - eksplan ditanam dengan menggunakan pinset steril pada medium yang telah ditambahkan dengan NAA dan BAP sesuai perlakuan (Tabel 01)
 - eksplan yang telah ditanam diinkubasi dalam ruang kultur yaitu diletakkan pada rak-rak bertingkat dengan intensitas cahaya 1000 - 2000 lux pada temperatur 22 - 26 ° C selama 4 minggu.

7. Pemanenan tunas

- setelah eksplan diinkubasi selama 4 minggu kemudian dilakukan pemanenan tunas hasil multiplikasi kemudian dihitung jumlah tunas, jumlah daun dan berat basah tunasnya.

D. Rancangan Percobaan

Percobaan ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap pola faktorial 4 x 5 yaitu perlakuan konsentrasi NAA terdiri dari 4 taraf uji yaitu 0; 0,25; 0,5 dan 0,75 mg/l, sedangkan konsentrasi BAP terdiri dari 5 taraf uji yaitu 0; 0,5; 1,0; 1,5 dan 2,0 mg/l, masing-masing perlakuan dengan 3 x ulangan.

Tabel 01. Kombinasi perlakuan konsentrasi NAA dengan BAP

| BAP \ NAA | 0 mg/l (B0) | 0.5 mg/l (B1) | 1.0 mg/l (B2) | 1.5 mg/l (B3) | 2.0 mg/l (B4) |
|-------------------|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 0 mg/l (N0) | N0B0 | N0B1 | N0B2 | N0B3 | N0B4 |
| 0.25 mg/l (N1) | N1B0 | N1B1 | N1B2 | N1B3 | N1B4 |
| 0.5 mg/l (N2) | N2B0 | N2B1 | N2B2 | N2B3 | N2B4 |
| 0.75 mg/l (N3) | N3B0 | N3B1 | N3B2 | N3B3 | N3B4 |

Keterangan : N0 = Perlakuan tanpa NAA
 N1 = NAA konsentrasi 0.25 mg/l
 N2 = NAA konsentrasi 0.5 mg/l
 N3 = NAA konsentrasi 0.75 mg/l

B0 = Perlakuan tanpa BAP
 B1 = BAP konsentrasi 0.5 mg/l
 B2 = BAP konsentrasi 1 mg/l
 B3 = BAP konsentrasi 1.5 mg/l
 B4 = BAP konsentrasi 2 mg/l

E. Parameter yang diamati

1. Parameter utama :

- jumlah tunas, yaitu dihitung jumlah tunas aksilar hasil multiplikasi dari eksplan pada akhir penelitian
- berat basah, yaitu dihitung berat basah eksplan sebelum ditanam dan berat basah pada akhir penelitian
- jumlah daun, dihitung jumlah daun pada akhir penelitian

2. Parameter lingkungan :

Parameter pendukung berupa faktor-faktor lingkungan seperti : suhu, intensitas cahaya, dan kelembaban relatif ruang kultur (diukur tiap hari).

F. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan ANOVA pada taraf uji 5%, apabila terdapat beda nyata dilanjutkan dengan uji DMRT ('Duncan's Multiple Range Test') dengan taraf signifikansi 5% untuk mengetahui perbedaan pengaruh masing-masing perlakuan.