

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai Oktober 2001 di Laboratorium Pengembangan dan Budidaya Tanaman Obat PT Sido Muncul, Semarang.

4.2 Alat dan bahan

a. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : erlenmeyer, gelas ukur, gelas piala, sikat, "hot plate stirrer", pH meter, autoklaf, cawan petri, skalpel, pipet, pinset, "hand sprayer", lampu spiritus, LAF (Laminar Air Flow), oven, neraca analitik, aluminium foil, plastik parafilm, botol kultur.

b. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : ibu tangkai daun purwoceng (*Pimpinella alpina* Kds.) yang diperoleh dari Dieng, Jawa Tengah, sabun cair, larutan clorox 0,5 %, larutan Tween 20, kertas payung, NaOH 0,1 N, HCl 0,1 N, medium Murashige-Skoog, alkohol.

4.3 Cara kerja

a. Pembuatan medium perlakuan Murashige-Skoog

1. 300 ml air suling ditempatkan dalam gelas piala 1000 ml.
2. dimasukkan 50 ml stok makronutrien, 5 ml stok mikronutrien, 1 ml stok vitamin, dan 2 ml stok besi ke dalam gelas piala.
3. ditambahkan sukrosa sesuai dengan kadar yang diinginkan (1 %, 2 %, 3 %, 4 %, dan 5 % (w/v) atau setara dengan 10 gram/liter, 20 gram/liter, 30 gram/liter, 40 gram/liter, dan 50 gram/liter).
4. ditambahkan air suling sampai mendekati 1000 ml kemudian pH diatur pada 5,8, jika pH medium terlalu asam maka ditambahkan NaOH 0,1 N dan jika terlalu basa maka ditambahkan HCl 0,1 N, setelah pH tepat kemudian ditambahkan air suling sampai 1000 ml.
5. ditambahkan 8 gram agar.
6. medium dipanaskan sambil diaduk sampai mendidih dan semua agar larut.
7. medium dituang ke dalam botol kultur.
8. botol ditutup dengan aluminium foil, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 2 atm, selama 15 – 20 menit.

b. Sterilisasi alat

Alat-alat yang akan digunakan untuk penanaman eksplan harus disterilkan lebih dahulu. Pipet, skalpel, pinset, cawan petri, dan botol disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 2 atm, selama 20 menit (Suryowinoto, 1996).

c. Persiapan dan penanaman eksplan

1. eksplan diambil dari ibu tangkai daun urutan ke-3 dihitung dari yang paling muda.
2. eksplan dicuci dengan sabun cair dengan ditambahkan 2 – 3 tetes Tween 20, kemudian dibilas 3 kali dengan air mengalir.
3. eksplan direndam dengan larutan clorox 0,5 % dalam erlenmeyer selama 3 menit, sambil digojog.
4. eksplan dibilas 3 kali dengan air suling.
5. alat-alat yang diperlukan untuk penanaman dimasukkan ke dalam LAF.
6. sebelum menanam lampu UV dalam LAF dinyalakan selama 1 jam.
7. dalam LAF eksplan direndam dengan larutan clorox 0,5 % dalam erlenmeyer selama 1 menit sambil digojog pelan, kemudian dibilas 3 kali dengan air suling yang steril.
8. eksplan dipotong-potong masing-masing 1 cm.
9. eksplan ditanam dalam botol berisi media kultur, botol ditutup dengan aluminium foil kemudian dirapatkan dengan plastik parafilm.

c. Inkubasi kultur

Inkubasi dilakukan selama 4 minggu dalam ruangan bersuhu 23 - 27 °C, dilakukan penyinaran selama 16 jam per hari dengan lampu “fluorescent” berkekuatan 30-70 W/m² (Narayanasamy, 1989 dalam Reinert, J and Y. P. S. Bajaj, 1977; Pierik, 1987; Staba, 1980). Selama masa inkubasi dilakukan pengamatan setiap hari untuk hari tumbuh kalus.

4.4 Parameter

Pada penelitian ini parameter yang diamati adalah :

a. Parameter utama

1. berat basah kalus, diperoleh dengan menimbang kalus dalam keadaan segar
2. berat kering kalus, diperoleh dengan menimbang kalus dalam keadaan kering setelah dioven pada suhu 70 - 80 °C sampai diperoleh berat yang konstan

b. Parameter pendukung

1. hari mulai tumbuh kalus, diperoleh dengan menghitung jumlah hari pada saat kalus mulai tumbuh
2. kondisi lingkungan, meliputi suhu dan kelembaban udara

4.5 Rancangan percobaan

Penelitian ini menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan faktor tunggal yaitu kadar sukrosa dalam medium kultur jaringan dengan 5 taraf perlakuan yaitu kadar sukrosa 1 % (P1), 2 % (P2), 3 % (P3) (kontrol), 4 % (P4), 5 % (P5) (Pierik, 1987). Kadar sukrosa 3 % (kontrol) merupakan kadar standar yang ada dalam medium MS. Masing-masing taraf perlakuan dilakukan 4 kali pengulangan.

Data yang diperoleh dianalisa dengan Sidik Ragam pada taraf uji 5 %, jika terdapat perbedaan antar perlakuan kemudian dilanjutkan dengan Uji Duncan pada taraf uji 5 %.