

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Balai Pengembangan Budidaya Tanaman Obat, PT. Sido Muncul, Klepu, Semarang. Penelitian dilaksanakan mulai bulan Mei sampai Oktober 2001.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

- a. Alat sterilisasi: autoklaf, oven, lampu bunsen, “sprayer”.
- b. Alat-alat gelas: Erlenmeyer, gelas ukur, cawan petri, sendok pengaduk.
- c. Alat-alat logam: pinset, pisau steril, gunting.
- d. Alat timbang: neraca analitik.
- e. pH meter
- f. “Hot plate stirrer” dan “Magnetic stirrer”
- g. “Laminar Air Flow” (LAF)
- h. Lemari pendingin
- i. Rak kultur
- j. Almari steril
- k. Pipet
- l. “Air Conditioning” (AC)
- m. Lampu neon
- n. Sikat halus

2. Bahan

- a. Bahan tanaman : eksplan berupa ibu tangkai daun Purwoceng (*Pimpinella alpina*) nomor tiga dari pucuk dengan tanaman berumur \pm 4 bulan.
- b. Bahan kimia : medium MS (Murashige dan Skoog), sukrosa, agar, myoinositol, akuades, HCL 0,01 N, NaOH 0,1 N, alkohol 70%, zat pengatur tumbuh 2,4-diclorophenoxy acetic acid (2,4-D) dan 6-benzilaminopurin (BAP), natrium klorida, deterjen.
- c. Bahan habis pakai lainnya : alumunium foil, kertas label, tissue.

C. Cara Kerja

1. Sterilisasi alat :

- Alat-alat gelas dicuci bersih, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 20 menit.
- Alat-alat logam, dibungkus dengan alumunium foil dan disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu $160-180^{\circ}\text{C}$. Pada saat penanaman eksplan, alat-alat logam disemprot dengan alkohol 70% dan dilewatkan pada api bunsen.

2. Sterilisasi ruang tanam

Ruang tanam disterilisasi dengan penyemprotan alkohol 70%, permukaan "laminar air flow" disterilisasi dengan radiasi sinar ultraviolet selama 1 jam sebelum penanaman dilakukan.

3. Sterilisasi eksplan

Tangkai daun purwoceng dicuci dibawah air kran, direndam dalam air yang diberi sedikit deterjen selama 5 menit kemudian dibilas dengan akuades sebanyak 3 kali. Setelah itu direndam dalam larutan natrium klorida 0,5 % selama 3 menit dan dibilas dengan akuades 3 kali. Eksplan direndam lagi dengan larutan natrium klorida 0,5 % selama 1 menit dalam "Laminar Air Flow", kemudian dibilas menggunakan akuades steril 3 kali.

4. Pembuatan media

Untuk membuat 1 liter media disiapkan alat-alat yang akan digunakan yaitu : timbangan analitik, Erlenmeyer, gelas ukur, pipet, pengaduk kaca, "stirrer", "hot plate", pH meter, cawan petri, alumunium foil dan bahan-bahan berupa: stok media MS (lampiran 1), akuades, sukrosa, myoinositol, agar, dan zat pengatur tumbuh 2,4-D serta BAP. Akuades sebanyak \pm 300 ml disiapkan dalam erlenmeyer. Kemudian satu persatu bahan dimasukkan, mulai stok mikro, stok besi dan EDTA, stok makro, vitamin, myoinositol, dan sukrosa sambil diaduk diatas "magnetic stirrer", kemudian dimasukkan zat pengatur tumbuh BAP dan 2,4-D yang sudah diencerkan (lampiran 3) sesuai dengan perlakuan sebagai berikut:

1. 0 ppm 2,4-D + 0 ppm BAP (B1D1)
2. 1 ppm 2,4-D + 0 ppm BAP (B1D2)
3. 2 ppm 2,4-D + 0 ppm BAP (B1D3)
4. 3 ppm 2,4-D + 0 ppm BAP (B1D4)
5. 0 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP (B2D1)

6. 1 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP (B2D2)
7. 2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP (B2D3)
8. 3 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP (B2D4)
9. 0 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP (B3D1)
10. 1 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP (B3D2)
11. 2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP (B3D3)
12. 3 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP (B3D4)

Setelah pemberian zat pengatur tumbuh pH diukur, apabila dibawah 5,8 maka ditambahkan NaOH, sedang diatas 5,8 ditambahkan HCl. Ditambahkan akuades sampai 1000 ml. Dimasukkan agar kedalam erlenmeyer dan diaduk dengan “magnetic stirrer” diatas “hot plate”. Media dituang kedalam botol kultur dan ditutup dengan alumunium foil kemudian disterilisasi.

5. Sterilisasi bahan

Media dimasukkan ke dalam botol-botol media kemudian ditutup dengan alumunium foil, disterilkan dengan autoklaf pada temperatur 121⁰C, tekanan 2 atm selama 20 menit.

6. Penanaman eksplan

Penanaman eksplan dilakukan didalam LAF (“Laminar Air Flow”). Masing-masing eksplan dipotong dengan panjang \pm 1 cm. Kemudian eksplan ditanam dalam botol kultur dan diinkubasi dalam ruang kultur.

7. Pengamatan

Eksplan dipanen pada umur ± 4 minggu setelah tumbuh kalus, kemudian masing-masing kalus dengan perlakuan konsentrasi berbeda dikeluarkan dari botol kultur, diletakkan di atas tissue dan dibersihkan dari media yang menempel kemudian ditimbang berat basahnya. Setelah itu kalus dioven pada suhu $60-70^{\circ}\text{C}$ selama 2×24 jam sampai mencapai berat konstan kemudian ditimbang berat kering.

D. Parameter

Parameter yang diamati :

1. Berat basah kalus

Berat basah kalus diperoleh dengan menimbang kalus dari eksplan yang berumur 4 minggu dan telah dipanen. Penimbangan dilakukan setelah kalus dibersihkan terlebih dahulu dari media yang melekat.

2. Berat kering kalus

Berat kering kalus diperoleh setelah kalus dikeringkan dalam oven pada suhu $60-70^{\circ}\text{C}$, kemudian ditimbang selama 2×24 jam hingga mencapai berat konstan.

E. Rancangan Penelitian

Penelitian menggunakan RAL (rancangan acak lengkap), pola faktorial (4 x 3).

Faktor I : pemberian Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D pada medium MS dengan 4 konsentrasi yaitu : 0 ppm (D1), 1 ppm (D2), 2 ppm (D3), 3 ppm (D4).

Faktor II : pemberian Zat Pengatur Tumbuh BAP pada medim MS dengan 3 konsentrasi yaitu : 0 ppm (B1), 0,5 ppm (B2), 1 ppm (B3).

Masing-masing perlakuan diulang 3 kali.

Tabel 1. Skema kombinasi perlakuan

2,4-D \ BAP	D1 (0 ppm)	D2 (1 ppm)	D3 (2 ppm)	D4 (3 ppm)
B1 (0 ppm)	B1D1	B1D2	B1D3	B1D4
B2 (0,5 ppm)	B2D1	B2D2	B2D3	B2D4
B3 (1 ppm)	B3D1	B3D2	B3D3	B3D4

F. Analisis Data

Data yang diperoleh ditransformasi dalam $\sqrt{y+0,5}$, kemudian dianalisis menggunakan ANOVA. Bila terdapat perbedaan antar perlakuan dilakukan uji DMRT (Duncan's Multiple Range Test), dengan taraf signifikansi 5%.