

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian telah dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Sebelas Maret Surakarta pada bulan Maret 1999 – November 1999.

#### B. Bahan dan Alat

##### 1. Bahan-bahan

###### a. Bahan Eksplan

- Daun semangka tanpa biji kultivar Primasid, umur 15 hari, urutan ke-3.

###### b. Bahan kimia

- Bahan-bahan medium MS ( lampiran 5 )
- Larutan stok NAA dan BAP
- HgCl<sub>2</sub> 0,1 % , alkohol 30 % , dan alkohol 70 %
- Agar
- Sukrosa
- Aquadest steril
- Spiritus
- *Aluminium foil* dan kertas tissue

## 2. Alat-alat

- Timbangan analitik digital
- Botol kultur, gelas piala, gelas ukur, dan petridish.
- *Dissecting set* ( pinset, gunting, dan skalpel )
- pH meter
- Almari pendingin
- Autoklaf, *hand sprayer* dan lampu bunsen
- *Laminar Air Flow Cabinet*
- Pipet dan *magnetic stirer*
- Alat pemotret

## C. Cara Kerja

### 1. Persiapan alat

*Disecting set* ( pinset, gunting, skalpel ) dan alat-alat gelas dicuci dengan larutan detergen dan dibilas air ledeng hingga bersih, kemudian dikering-anginkan. Botol kultur ditutup dengan aluminium foil sedangkan gunting, pinset, dan skalpel dibungkus kertas payung selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf selama 30 menit pada tekanan 2 atm, suhu 121° C. Peralatan *dissecting set* disterilkan terlebih dahulu dengan nyala api bunsen setiap akan digunakan dalam penanaman.

### 2. Pembuatan Larutan Stok NAA

Larutan stok NAA dibuat dari 1 mg NAA dalam 40 ml aquadest steril , selanjutnya untuk melarutkan ditambah beberapa tetes larutan NaOH 0,1 N.

## **2. Pembuatan Larutan Stok NAA**

Larutan stok NAA dibuat dari 1 mg NAA dalam 40 ml aquadest steril , selanjutnya untuk melarutkan ditambah beberapa tetes larutan NaOH 0,1 N.

## **3. Pembuatan Larutan Stok BAP**

Larutan stok BAP dibuat dari 3,6 mg BAP dalam 48 ml aquadest steril , selanjutnya untuk melarutkannya ditambah beberapa tetes larutan HCl 0,1 N.

## **4. Pembuatan Medium MS Perlakuan NAA dan BAP**

Untuk setiap perlakuan dibuat 125 ml media untuk 5 x ulangan. ZPT NAA dan BAP ditambahkan dengan konsentrasi yang disesuaikan dengan perlakuan. Media MS 125 ml dibuat dengan memasukkan larutan stok A,B,C,D,E,F,dan G masing-masing sebanyak 6,25 ml ke dalam gelas piala 250 ml, ditambahkan 3 gr sukrosa, selanjutnya diaduk-aduk. ZPT NAA dan BAP diberikan ke media sesuai dengan konsentrasi dari setiap perlakuan. Aquadest steril ditambahkan hingga mendekati volume 125 ml. pH media diukur dengan pH meter hingga pH mencapai 5,8. Jika pH terlalu tinggi diturunkan dengan penambahan larutan HCl 0,1 N tetapi jika pH terlalu rendah dapat dinaikkan dengan penambahan larutan NaOH 0,1 N. Setelah pH media tercapai, kemudian ditambahkan 0,875 gr agar dan dipanaskan sambil terus diaduk-aduk hingga larutan mendidih. Selanjutnya media dimasukkan ke dalam botol kultur yang sudah disterilkan masing-masing sebanyak 25 ml, kemudian ditutup dengan aluminium foil hingga benar-benar rapat. Media

## 5. Pembuatan dan Sterilisasi eksplan

Eksplan berasal dari daun semangka tanpa biji kultivar Primasid yang diperoleh dari hasil pembibitan di desa Sabrang Lor, Trucuk, Klaten. Sebagai bahan untuk eksplan diambil dari daun urutan ke-3. Selanjutnya dilakukan sterilisasi, yaitu :

1. Daun dicuci dengan larutan detergen dan dibilas dengan air ledeng hingga bersih.
2. Daun disterilkan dengan alkohol 30 % selama 2 menit dan dibilas dengan aquadest steril sebanyak 2x.
3. Sterilisasi selanjutnya dalam larutan HgCl 0,1 % selama 2 menit dan dibilas dengan aquadest steril sebanyak 2x. Selanjutnya daun di iris dengan ukuran 1 x 1 cm, melalui ibu tulang daun. Irisan daun (eksplan) ditanam pada media MS dengan bantuan pinset steril hingga permukaan irisan bersentuhan dengan media. Selanjutnya botol kultur ditutup kembali dengan aluminium foil hingga rapat dan eksplan dikulturkan di ruang inkubasi.

## D. Rancangan Percobaan

Percobaan ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial (4 x 4) dengan 5x ulangan. Perlakuan memakai 2 macam zat pengatur tumbuh, yaitu :

1. Faktor pertama berupa NAA (A)

$$A_0 = 0 \text{ mg/l NAA}$$

$$A_1 = 0,1 \text{ mg/l NAA}$$

$$A_2 = 0,3 \text{ mg/l NAA}$$

$$A_3 = 0,6 \text{ mg/l NAA}$$

2. Faktor kedua berupa BAP (B)

$$B_0 = 0 \text{ mg/l BAP}$$

$$B_1 = 0,3 \text{ mg/l BAP}$$

$$B_2 = 0,6 \text{ mg/l BAP}$$

$$B_3 = 0,9 \text{ mg/l BAP}$$

Sehingga pada penelitian ini terdapat 16 macam kombinasi perlakuan.

Tabel 1. Kombinasi perlakuan zat pengatur tumbuh NAA dan BAP

NAA \ BAP	0 (mg/l) A <sub>0</sub>	0,1 (mg/l) A <sub>1</sub>	0,3 (mg/l) A <sub>2</sub>	0,6 (mg/l) A <sub>3</sub>
0 (mg/l) B <sub>0</sub>	A <sub>0</sub> B <sub>0</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>0</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>0</sub>	A <sub>3</sub> B <sub>0</sub>
0,3 (mg/l) B <sub>1</sub>	A <sub>0</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>3</sub> B <sub>1</sub>
0,6 (mg/l) B <sub>2</sub>	A <sub>0</sub> B <sub>2</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub>
0,9 (mg/l) B <sub>3</sub>	A <sub>0</sub> B <sub>3</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>3</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>3</sub>	A <sub>3</sub> B <sub>3</sub>

### E. Parameter

Parameter yang diamati adalah berat basah kalus. Berat basah kalus ditimbang 2 minggu setelah kalus pertama tumbuh. Dalam hal ini yang ditimbang adalah kalus yang berada di permukaan eksplan.

## F. Analisa Data

Data berat basah kalus ditransformasi dalam  $\sqrt{Y + 0,5}$ . Selanjutnya dilakukan analisa ANOVA untuk mengetahui pengaruh NAA, BAP, serta kombinasinya terhadap pertumbuhan kalus.

Untuk mengetahui beda nyata pada perlakuan-perlakuan yang diujikan maka dilakukan uji lanjut dengan Duncans Multiple Range Test (DMRT) pada taraf uji signifikansi 5 %.

