

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu : Oktober 2000 – Februari 2001

Tempat : - Laboratorium Mikrobiogenetika Jurusan Biologi
F.MIPA UNDIP
- Rumah kaca Jurusan Biologi F.MIPA UNDIP

4.2. Alat dan Bahan

Alat : Alat pengolah tanah (cangkul dan sekop), ember, tabung reaksi, gelas ukur, gelas piala, pipet, neraca analitik *Sartorius* dan *Ohaus*, spektrofotometer, mikroskop, oven, termometer, penggaris, dan jangka sorong.

Bahan : Benih kacang hijau varietas Gelatik; polibag; tanah; pasir; kompos; pupuk Urea, TSP, KCl; aquades; kolkisin; 8-hidroksiquinolin 0,002 M; asam asetat 45 %; HCl 1 N; acetoorcein; gliserin; Reagen Phenol Folin-Ciocalteu; kalium tartrat; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; Na_2CO_3 ; NaOH 0,5 N; serum bovin albumin (BSA).

4.3. Cara Kerja :

- Pembuatan larutan kolkisin dan perlakuan benih kacang hijau
- Sebagai larutan standar dibuat larutan kolkisin 1,0 % (1 g dalam 100 ml aquades), dari larutan standar tersebut dibuat larutan 0,05 % ; 0,10 % ; 0,15 % ; 0,20 % masing-masing sebanyak 30 ml, dan larutan 0 % (aquades) sebagai

kontrol percobaan. Benih kacang hijau yang telah disiapkan direndam dalam air selama 1,5 jam untuk merangsang perkecambahan, setelah ditiriskan kemudian direndam dalam larutan kolkisin selama 10 jam. Setelah perendaman selesai kecambah segera dicuci dengan aquades untuk menghilangkan sisa kolkisin. Pada akhir perendaman ini semua benih telah berkecambah.

- Penanaman dan pemeliharaan tanaman

Kecambah yang telah diperlakukan dengan kolkisin ditanam pada polibag masing-masing 4 kecambah untuk setiap polibag, kemudian dilakukan penjarangan pada umur 10 hari dengan memilih satu tanaman yang baik dan seragam pada setiap ulangan dari masing-masing perlakuan untuk terus dipelihara, sedangkan 3 tanaman yang lain dipotong sehingga hanya ada satu tanaman pada setiap polibag. Tanaman dipelihara di rumah kaca Jurusan Biologi F.MIPA UNDIP. Media tanam berupa campuran tanah, pasir, dan kompos dengan perbandingan volume tanah : pasir : kompos = 1 : 1 : 1 untuk memperoleh media tanam yang cukup remah dan gembur, yang ditempatkan dalam wadah polibag ukuran 15 cm x 20 cm. Pupuk berupa campuran Urea, TSP, dan KCl dengan perbandingan berat 1 : 2 : 1 diberikan ketika tanaman berumur 30 hari setelah tanam sebanyak 30 g setiap tanaman guna mencukupi kebutuhan unsur hara (Rukmana, 1997). Pemeliharaan dilakukan dengan menyiram air setiap hari disesuaikan dengan keadaan media tanam. Pemberantasan hama dan penyakit dilakukan ketika timbul gejala pada tanaman. Pemanenan dilakukan ketika polong sudah masak, berwarna coklat dan keras.

4.4. Desain Penelitian

Penelitian dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap faktor tunggal yaitu konsentrasi larutan kolkisin yang ditentukan dengan mengacu pada Sakhidin *et al.* (1999), Suryo (1995), Eigsti dan Dustin (1957) terdiri dari 5 taraf konsentrasi yaitu : 0 %; 0,05 %; 0,10 %; 0,15 % ; dan 0,20 % yang diperlakukan pada benih kacang hijau. Setiap perlakuan diulang 5 kali, masing-masing dengan satu tanaman.

4.5. Perlakuan

Pada penelitian ini terdapat 5 perlakuan konsentrasi kolkisin, yaitu :

- K0 : Konsentrasi 0 %
- K1 : Konsentrasi 0,05 %
- K2 : Konsentrasi 0,10 %
- K3 : Konsentrasi 0,15 %
- K4 : Konsentrasi 0,20 %

4.6. Parameter

4.6.1. Parameter Pertumbuhan Tanaman Kacang Hijau

Parameter pertumbuhan tanaman yang diamati meliputi : tinggi tanaman, jumlah daun, umur berbunga, berat basah, berat kering, serta kenampakan sel ujung akar pada metafase.

- Tinggi tanaman

Tinggi tanaman diukur dari pangkal batang hingga ujung tertinggi tanaman setiap minggu dari minggu pertama setelah tanam hingga minggu ke-9.

- Jumlah daun

Jumlah daun dihitung pada saat tanaman berumur 40 hari setelah tanam.

- Umur berbunga

Umur berbunga (dalam hari) dihitung dari saat tanam hingga saat munculnya kuncup bunga pertama pada tanaman.

- Berat basah tanaman (Sitompul dan Guritno, 1995)

Berat basah ditentukan dengan menimbang seluruh bagian tanaman segera setelah tanaman dipanen.

- Berat kering tanaman (Sitompul dan Guritno, 1995)

Berat kering ditentukan dengan menimbang seluruh bagian tanaman tersebut setelah dipanaskan pada suhu 80 °C dalam oven selama 48 jam hingga beratnya konstan.

- Kenampakan sel ujung akar pada metafase

Sel yang diamati diambil dari bagian ujung akar yang aktif tumbuh pada tanaman berumur 15 hari sepanjang 1 – 1,5 mm dari belakang ujung akar, disiapkan dengan metode squash (pencet) pada media gliserin. Akar diperlakukan dengan 8-hidroksiquinolin 0,002 M pada suhu 4 °C selama 24 jam, kemudian difiksasi dengan asam asetat 45 % pada suhu 27 °C selama 15 menit dan dilunakkan dengan HCl 1 N pada suhu 30 °C selama 2 menit. Pewarnaan kromosom menggunakan acetoorcein 2 % selama 2 jam. Diamati ukuran sel dan kenampakan kromosom pada saat metafase dengan mikroskop.

4.6.2. Parameter Produksi Tanaman kacang Hijau

Parameter produksi yang diamati adalah jumlah polong bernaas dalam setiap tanaman, jumlah biji dalam setiap polong, berat biji, serta kandungan protein biji.

- Jumlah polong bernaas, jumlah biji dalam setiap polong, dan berat biji

Pemungutan hasil (panen) dilakukan ketika polong menjelang kering, berwarna coklat dan biji di dalamnya telah mengeras. Dari setiap tanaman dihitung keseluruhan jumlah polong bernaas (polong yang berisi biji) yang dihasilkan, jumlah biji yang terdapat dalam setiap polong dan rata-rata berat biji.

- Analisa kandungan protein biji

Kandungan protein biji ditentukan dengan metode Lowrey (Copeland, 1994). Reagen yang diperlukan sebagai berikut :

- Reagen A : 10 g Na_2CO_3 dilarutkan dalam NaOH 0,5 N hingga volume 100 ml.
- Reagen B : 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam aquades hingga volume 100 ml.
- Reagen C : 2 g K tartrat dilarutkan dalam aquades hingga volume 100 ml.
- Reagen D : 15 ml reagen A ditambah 0,75 ml reagen B dan 0,75 ml reagen C, kemudian digojok hingga homogen.
- Reagen E : 5,0 ml reagen Phenol Folin-Ciocalteu 2 N diencerkan hingga volume 50 ml.
- Larutan standar serum bovin albumin 0,3 mg/ml dibuat dengan melarutkan 0,003 g serum bovin albumin dalam 10 ml aquades. Konsentrasi serum bovin albumin yang lain dibuat dengan mengencerkan serum bovin albumin tersebut menjadi konsentrasi yang bersesuaian.

· Penentuan kandungan protein biji sebagai berikut :

1. Sampel sebanyak 1,0 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1,0 ml reagen D, digojok dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit.
2. Ditambahkan 3,0 ml reagen E ke dalam tabung reaksi berisi sampel, digojok secepatnya dan diinkubasi pada suhu ruang selama 45 menit.
3. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm dengan spektrofotometer
4. Sebagai larutan standar, diukur absorbansi dari serum bovin albumin dengan konsentrasi (dalam mg/ml) : 0; 0,03; 0,06; 0,09; 0,12; 0,15; 0,18; 0,21; 0,24; 0,27; dan 0,3 sehingga diperoleh persamaan hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi protein. Dari persamaan ini kandungan protein sampel dapat diketahui.

Sebagai parameter lingkungan diukur suhu rata-rata mingguan selama penelitian berlangsung.

4.7. Analisa Data

Data yang diperoleh dianalisa dengan Anova (Analysis of Varians) pada taraf uji 5 % dan apabila terdapat perbedaan rata-rata antar perlakuan dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf uji yang sama (Steel dan Torry, 1993; Gomes dan Gomes, 1992). Perhitungan data dilakukan dengan program Microsoft Excel 2000 dan SPSS 9.1 for Windows.



== UNIVERSITAS DIPONEGORO ==

=== SEMARANG ===