

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan termasuk ke dalam penelitian yang bersifat eksperimen karena pada penelitian menggunakan kontrol yaitu pada medium Murashige-Skoog (MS) tanpa penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT) (Nazir, 2003).

B. Desain Penelitian

Percobaan pada penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Medium yang digunakan untuk induksi adalah medium MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh dari golongan auksin adalah 2,4-D (*2,4-Dichlorophenoxyacetic acid*) dengan rentang konsentrasi 0-0,5 mg/L dan dari golongan sitokinin adalah kinetin dengan rentang konsentrasi 0-2 mg/L yang disusun sebanyak 8 kombinasi dan 3 replikasi. Banyaknya replikasi dihitung menggunakan rumus menurut Sug&i dan Sugiarto (1994):

$$t \times r = 20$$

Keterangan : t = perlakuan r = replikasi
20 = faktor nilai derajat kebebasan umum

Untuk mempermudah analisis data, replikasi yang digunakan sebanyak 3 kali, melebihi nilai replikasi minimal 2,5 atau 3. Kombinasi ZPT pada penelitian ini adalah sebagai berikut (Tabel 3.1):

Tabel 3.1 Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh 2-4 D dan Kinetin Dalam Medium MS

Kinetin 2,4-D	0 mg/L	0.5 mg/L	1 mg/L	2 mg/L
0 mg/L	DK ₁	DK ₂	DK ₃	DK ₄
0.5 mg/L	DK ₅	DK ₆	DK ₇	DK ₈

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember sampai bulan Februari 2011 di Laboratorium Fisiologi, Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian kultur jaringan ini adalah sebagai berikut:

Tabel 3.2 Alat-Alat Yang Digunakan Dalam Penelitian

No.	Nama Alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Gelas ukur	100, 1000 ml	@ 1 buah
2.	Gelas kimia	1000 ml	1 buah
3.	Batang pengaduk	Panjang 20 cm	1 buah
4.	Mikropipet	2-20, 20-200 μ l	@ 1 buah
5.	Makropipet	10 ml	1 buah
6.	Gelas kimia	250 ml	5 buah
7.	Autoklaf	ALP/KT 23	1 buah
8.	pH meter	UCHIDA KT-1A	1 buah
9.	Cawan Petri	Diameter 12 cm	3 buah

10.	<i>Hotplate with Magnetic Stirer</i>	EYELA Magnetic Stirer Rch-3	3 buah
11.	Pinset	Bahan logam	3 buah
12.	Botol kultur	Bahan kaca	200 buah
13.	Alumunium, karet, dan kertas label	-	Secukupnya
14.	Spatula	Bahan logam	3 buah
15.	Botol untuk larutan stok	Bahan kaca	9 buah
16.	Timbangan digital	-	1 buah
17.	Tabung Erlenmeyer	250 ml	5 buah
18.	<i>Laminar air flow cabinet</i>	SBC 1000 A SHIMADZU	1 buah
19.	Botol susu untuk akuades	Bahan kaca	5 buah
20.	Steril blad	No.22	5 buah
21.	Skalpel	No.4	3 buah
22.	Spiritus dan korek api	-	Secukupnya
23.	Botol semprot	Bahan plastik	1 buah

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian kultur jaringan ini adalah sebagai berikut:

Tabel 3.3 Bahan Yang Digunakan Dalam Penelitian

No.	Nama Alat	Σ
1.	Akuades	10 L
2.	Zat-zat penyusun medium MS	100 ml
3.	ZPT (2,4-D dan kinetin)	@ 100 mL
4.	Agar batang	6 gram
5.	Sukrosa	250 gram

6.	HCl 0,1 N dan NaOH 0,1 N	@ 10 ml
7.	Eksplan (daun <i>Anredera cordifolia</i>)	30 helai
8.	Alkohol 70%	1 L

Medium yang digunakan adalah medium Murashige-Skoog, komposisi medium ini adalah sebagai berikut:

Tabel 3.4 Komposisi Medium Murashige-Skoog (Pierik, 1987)

No.	Kelompok Stok	Nama Zat	Konsentrasi (mg/L)
1.	Makronutrien	NH_4NO_3	1650
2.		KNO_3	1900
3.		$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,2
4.		H_3BO_3	6,2
5.		KH_2PO_4	170
6.	Mikronutrien	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
7.		$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
8.		$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
9.		$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,9
10.		KI	0,83
11.		$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
12.		$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
13.	Besi chelat	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
14.		Na_2EDTA	37,3
15.	Suplemen Organik	Myo-Inositol	1000
16.		Glycine	2
17.		Nicotic acid	0.5
18.		Pyridoxine HCl	0.5
19.		Thiamin HCl	0.1

E. Langkah Kerja

1. Penyediaan Eksplan

Eksplan yang digunakan adalah potongan dari daun binahong muda yang masih meristematis yang telah diambil dari kebun tanaman obat keluarga di Antapani. Eksplan yang digunakan adalah daun ke tiga dari pucuk dan diambil dari tiga tumbuhan yang berbeda.

2. Pembuatan Larutan Stok dan Medium

Medium yang digunakan adalah medium Murashige-Skoog (Tabel 3.4). Zat-zat tersebut ditimbang menggunakan timbangan digital dan dibuat larutan stoknya, yaitu pada konsentrasi 10^{-3} M. Zat-zat makronutrien masing-masing ditempatkan dalam botol yang terpisah. Zat-zat mikronutrien, besi chelat dan suplemen organik, masing-masing dalam satu botol.

Selain itu, dibuat juga stok untuk zat pengatur tumbuh 2-4 D dan kinetin. Larutan stok dibuat untuk mempermudah dalam penimbangan karena biasanya zat yang digunakan dalam medium sangat sedikit. Pembuatan larutan stok diharapkan dapat mempertahankan ketelitian dalam penimbangan. Semua larutan stok disimpan dalam lemari es agar tahan lama.

Medium untuk induksi pertumbuhan dibuat dalam medium padat dengan penambahan agar (8000 mg/L). Sebagai sumber karbon ditambahkan pula sukrosa (30.000 mg/L). Adapun pembuatan medium

adalah sebagai berikut: untuk pembuatan medium 800 ml, langkah pertama yang dilakukan adalah memasukkan larutan stok (kecuali ZPT), masing-masing 8 ml ke dalam gelas ukur (1000 ml). Setelah itu ditambahkan sukrosa 24 gram yang sudah dilarutkan dalam 50 ml akuades. Tambahkan akuades hingga mencapai 800 ml. Kemudian diaduk. Dari campuran tersebut diambil 100 ml untuk setiap kombinasi ZPT (Tabel 3.1). Setelah penambahan kombinasi ZPT pada 100 ml larutan, kemudian diukur pH-nya sampai sekitar 5,6 – 5,8. Bila pH terlalu rendah ditambahkan NaOH 0,1 N, bila pH terlalu tinggi ditambahkan HCl 0,1 N. Kemudian larutan dipanaskan setelah ditambahkan agar 800 mg pada *hotplate with magnetic stirrer* sampai agar larut. Setelah agar larut, tuangkan ke dalam 10 botol kultur masing-masing 10 ml, tutup dengan aluminium foil dan beri label.

B

3. Sterilisasi Alat dan Medium

a. Sterilisasi Alat

Alat-alat disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Alat-alat yang disterilisasi untuk penanaman eksplan yaitu cawan Petri berisi kertas saring, skalpel, botol yang berisi akuades, pinset, spatula, gelas ukur 100 ml, tabung erlenmeyer 250 ml, dan botol untuk alkohol 70%. Semua alat dibungkus dengan menggunakan kertas. Botol akuades dan tabung erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil.

b. Sterilisasi Medium

Botol kultur yang telah berisi medium kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

4. Penanaman Eksplan

Laminar air flow cabinet yang digunakan sebagai tempat penanaman eksplan disterilisasi dengan menggunakan alkohol 70%, kemudian diberi sinar UV selama 15 menit sebelum digunakan untuk menanam. Sebelum menanam, semua bahan yang akan digunakan disiapkan, diantaranya media, eksplan, alkohol 70%, akuades steril, bayclin, spirtus, pinset, erlenmeyer, skalpel, steril blade no.22, korek api, cawan Petri dan aluminium foil. Semua bahan dan alat kecuali eksplan yang akan digunakan dimasukkan ke dalam *laminar air flow* (Gambar 3.1).



Gambar 3.1. Persiapan Penanaman Eksplan
(Sumber: dokumen pribadi)

Eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah dari kebun tanaman obat (lapangan), oleh karena itu eksplan harus disterilisasi agar terhindar dari kontaminasi. Sterilisasi eksplan dilakukan di luar dan di dalam *Laminar air flow cabinet*. Sterilisasi di luar yaitu dengan mencuci eksplan di air mengalir selama 30 menit. Sterilisasi di dalam yaitu dengan menggunakan bayclin 25% selama 15 menit, kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali masing-masing 5 menit.

Setelah eksplan disterilisasi, kemudian daun binahong (eksplan) dipotong-potong ± 1 cm dalam cawan Petri. Bagian permukaan atas dan bawahnya dilukai (tidak sampai terpotong), agar nutrisi dari medium dapat lebih diserap oleh eksplan (Gambar 3.2). Setelah ditanam pada botol medium, kemudian disimpan di ruang kultur.



Gambar 3.2. Eksplan Daun Binahong
(Sumber: dokumen pribadi)

5. Pengamatan

Pengamatan dilakukan secara visual perminggu selama 6 minggu. Pengamatan difokuskan pada respons yang terjadi pada setiap kultur. Parameter respons potongan daun binahong yang diamati adalah terbentuknya kalus dan akar. Kalus yang terbentuk kemudian ditimbang berat basahnya perminggu, kemudian dibuat kurva tumbuhnya.

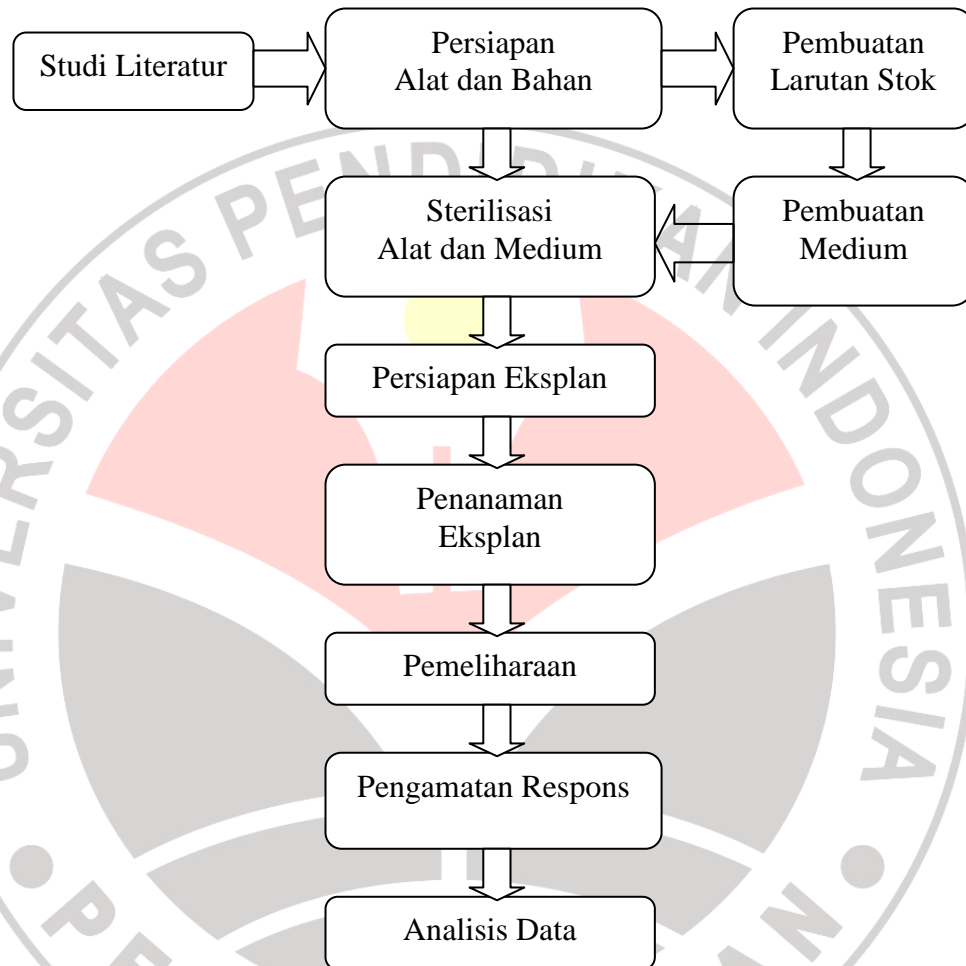
6. Analisis Data

Data yang telah diperoleh dibuat persentasenya dengan menggunakan rumus di bawah ini:

$$\% \text{ Respons} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang merespon}}{\text{Jumlah seluruh eksplan yang ditanam}} \times 100\%$$

F. Alur Penelitian

Berdasarkan uraian yang telah dijelaskan sebelumnya, bagan alur penelitian (Gambar 3.3) dari penelitian ini adalah sebagai berikut:



Gambar 3.3. Alur Penelitian