

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimen. Penelitian eksperimen merupakan metode penelitian yang digunakan untuk mengetahui pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain dalam kondisi yang terkendalikan (Sugiyono, 2011).

B. Desain Penelitian

Desain penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan acak lengkap dapat didefinisikan sebagai rancangan dengan beberapa perlakuan dan disusun secara random untuk seluruh unit percobaan. Pada penelitian ini, kontrol yang digunakan yaitu pada medium Murishage dan Skoog (MS) tanpa penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT). Perlakuan yang diberikan adalah penambahan zat pengatur tumbuh yaitu Benzyl amino purine (BAP), a-Naphtalene acetic acid (NAA), 2,4-Diklorofenoksiacetic acid dan Kinetin.

Perlakuan yang diberikan pada penelitian ini menggunakan kombinasi jenis auksin dan sitokinin yang berbeda-beda sebagai berikut :

1. NAA (0 dan 0,3 mg/L) dan BAP (0, 2.5, 2.75, 3, 3.25mg/L) dengan jumlah pengulangan sebanyak dua kali dan dilanjutkan dengan subkultur sebanyak dua tiga kali (Tabel 3.1).
2. 2,4-D (0, 1.75, 2, 2.25, 3 mg/L) dan kinetin (0 mg/L) dengan jumlah pengulangan sebanyak empat kali dan dilanjutkan dengan subkultur sebanyak dua kali (Tabel 3.2).
3. Kinetin (0, 0.2, 0.3 mg/L) dan BAP (0, 0.75, 1 mg/L) dengan jumlah pengulangan sebanyak dua kali dan dilanjutkan dengan subkultur sebanyak tiga kali (Tabel 3.3).
4. IBA (1 mg/L)

Penentuan banyaknya jumlah pengulangan dalam penelitian ini menurut Gomez & Gomez (1995) dengan rumus sebagai berikut :

$$T(R-1) \geq 20$$

Keterangan :

T = Jumlah Perlakuan

R = jumlah pengulangan

Dini Fatwa Kania, 2015

RESPONS POTONGAN JARINGAN TANAMAN EDELWEISS (Al 20 = deraiat bebas
MURASHIGE-SKOOG DENGAN PENAMBAHAN ZAT PENGATUR TUMBUH

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Tabel 3.1 Kombinasi Konsentrasi ZPT pada Potongan Jaringan Buku

Kode	Penanaman Awal		
	NAA (mg/L)	BAP (mg/L)	Respons
A	0	0	
B	0	2,5	
C	0	2,75	
D	0	3	
E	0	3,25	
F	0,3	0	
G	0,3	2,5	
H	0,3	2,75	
I	0,3	3	
J	0,3	3,25	

Tabel 3.2 Kombinasi Konsentrasi ZPT pada Potongan Jaringan Daun

Kode	Penanaman Awal		
	2,4-D (mg/L)	Kinetin (mg/L)	Respons
K	0	0	
L	1,75	0	
M	2	0	
N	2,25	0	
O	2,5	0	

Tabel 3.3 Kombinasi Konsentrasi ZPT pada Potongan Jaringan Pucuk

Kode	Penanaman Awal		
	BAP (mg/L)	Kinetin (mg/L)	Respons
P	0	0	
Q	0	0,2	
R	0	0,3	
S	0,75	0	
T	0,75	0,2	
U	0,75	0,3	
V	1	0	
W	1	0,2	
X	1	0,3	
Y	2	0	
Z1	2	0,2	
Z2	2	0,3	

Respons terbaik dari setiap potongan jaringan akan dilanjutkan dengan subkultur. Kombinasi konsentrasi subkultur disesuaikan dengan respons yang dihasilkan dari setiap potongan jaringan (Tabel 4.3). Subkultur dilakukan selama tiga minggu sekali.

Tabel 3.4 Kombinasi Konsentrasi Pada Medium Subkultur

Potongan Jaringan	Respons	Medium Subkultur			
		Multiplikasi 1	Multiplikasi 2	Pemanjangan Tunas	Organogenesis
Daun	Kalus	-	-	-	BAP 1, Kinetin 0,3
Buku	Tunas	BAP 3, NAA 0,5	-	BAP 3, NAA 0,5	-
Pucuk	Tunas	BAP 1, Kinetin 0,3	BAP 1, Kinetin 0,3	-	-

Keterangan : Warna menunjukkan konsentrasi yang digunakan

C. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tanaman *Anaphalis javanica* yang berumur lima bulan yang berasal dari Gunung Papandayan Garut Jawa Barat. Sampel pada penelitian ini yaitu pucuk, daun dan buku dari tanaman *Anapalis javanica*.

D. Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi pembuatan medium, sterilisasi alat dan medium, penanaman potongan jaringan serta pemeliharaan kultur dilakukan di Laboratorium Botani dan pembuatan larutan stok MS dilakukan di Laboratorium Fisiologi FPMIPA UPI. Penelitian dilaksanakan dari bulan Februari sampai Juli 2015.

E. Prosedur Penelitian

1. Persiapan

a. Bahan

Bahan potongan jaringan adalah tanaman edelweiss (*Anaphalis javanica*) yang diambil dari bagian buku (tempat melekat daun), daun dan pucuk yang diperoleh dari Gunung Papandayan Garut Jawa Barat (Gambar 3.1).



Gambar 3.1 Tanaman *Anaphalis javanica*
 a. Aklimasi tanaman *Anaphalis javanica* b. Bagian tanaman *Anaphalis javanica*

Tanaman yang digunakan untuk sumber potongan jaringan diaklimatisasi terlebih dahulu diruang kultur dengan suhu 16°C selama ± 48 jam (Gambar 3.1 a).

b. Pembuatan Larutan Stock

Larutan Stok terdiri dari makronutrien, mikronutrien, besi *cheat* dan vitamin kemudian dilarutkan dengan menggunakan akuades. Larutan stok medium MS dikelompokkan menjadi delapan kelompok (Tabel 3.5). Pembuatan larutan stok ini digunakan untuk mempermudah penimbangan bahan, karena bahan yang digunakan biasanya takarannya sangat sedikit. Setelah pembuatan larutan, pada tiap botol diberi identitas berupa nama larutan, banyaknya takaran, dan tanggal pembuatan larutan. Larutan-larutan tersebut ditutup rapat dan disimpan dikulkas.

c. Pembuatan medium

Medium yang digunakan yaitu medium Murashige Skoog (MS) (1962 dalam Pierik, 1987). Pembuatan medium MS digunakan untuk medium pada tahap penanaman dan subkultur. Untuk membuat medium, masing-masing larutan stok diambil sesuai dengan kebutuhan pemakaian. Larutan yang telah tercampur kemudian ditambah dengan agar-agar dan sukrosa serta ZPT berupa BAP, NAA, 2,4-D, kinetin dan IBA. Medium dipanaskan (Gambar 3.2) dan diaduk sampai semua bahan larut, setelah larut dilakukan pengukuran pH hingga mencapai 5.7 atau 5.8 dengan menambahkan NaOH 1 M atau Hcl 1 M. Setelah larut, medium dituangkan kedalam botol sebanyak 10 ml pada masing-masing botol. Botol ditutup dengan menggunakan plastik tahan panas, alumunium foil, karet kemudian diberi label dan ditulis konsentrasi perlakuan dan tanggal penanaman.

Medium yang telah dibuat dan alat-alat untuk menanam disterilkan dalam autoklaf selama ± 50 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15psi.



Gambar 3.2 Pemanasan Medium MS

Tabel 3.5 Komposisi Medium Murashige-Skoog (1962 dalam Pierik, 1987)

Stok	Bahan Kimia	Konsentrasi (g/L)
1.	NH_4NO_3	16,5
2.	KNO_3	19
3.	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3,33
4.	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,00025
	H_3BO_3	0,062
	KI	0,008
	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,0025
	KH_2PO_4	17
5.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,7
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,169
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,086
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,00025
6.	Na.EDTA	0,373
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,278
7.	Thiamin	0,001
	Nikotin	0,005
	Pyridoxin	0,005
	Glycin	0,02
8.	Inositol	1

2. Penelitian Inti

a. Pembuatan Medium Perlakuan

Dini Fatwa Kania, 2015

RESPONS POTONGAN JARINGAN TANAMAN EDELWEISS (Anaphalis javanica) pada MEDIUM MURASHIGE-SKOOG DENGAN PENAMBAHAN ZAT PENGATUR TUMBUH

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Medium perlakuan yaitu medium MS yang ditambah ZPT dengan konsentrasi sebagai berikut :

1). Medium Penanaman Awal

- a). NAA (0 dan 0,3 mg/L) dan BAP (0, 2.5, 2.75, 3, 3.25mg/L) digunakan untuk potongan jaringan buku. Tujuan untuk menghasilkan respons tunas.
- b). 2,4-D (0, 1.75, 2, 2.25, 3 mg/L) dan Kinetin (0 mg/L) digunakan untuk potongan jaringan daun. Tujuan untuk menghasilkan respons kalus.
- c). Kinetin (0, 0.2, 0.3 mg/L) dan BAP (0, 0.75, 1 mg/L) digunakan untuk potongan jaringan pucuk. Tujuan untuk menghasilkan respons tunas.

2). Medium Subkultur 1 (Multiplikasi)

- a). BAP (3 mg/L) dan NAA (0,5 mg/L)

3). Medium Subkultur 2 (Pemanjangan dan pembesaran)

- a). BAP (3mg/L) dan NAA (0.5 mg/L) untuk tunas.
- b). BAP (1mg/L) dan Kinetin (0,3mg/L) untuk kalus daun.

4). Medium Sub Kultur 3 (Pertumbuhan Akar)

- a). IBA (1mg/L) untuk pertumbuhan akar dari semua respons (tunas dan kalus).

b. Sterilisasi

Medium yang telah tersedia kemudian disterilkan dalam autoklaf tipe BI-65 ALF pada tekanan 15 psi selama 50 menit pada suhu 121⁰c. Setelah sterilisasi kemudian medium yang telah dibuat didiamkan didalam ruang kultur selama 2-3 hari sebelum ditanami dengan potongan jaringan edelweiss secara aseptik.

c. Penanaman

Sebelum potongan jaringan ditanam pada medium kultur, semua bahan yang akan digunakan pada proses penanaman disiapkan terlebih dahulu diantaranya medium, potongan jaringan, akuades, alkohol, *scalpel*, *steril blade*, cawan petri, plastik tahan panas, spirtus, pinset, karet, kertas saring dan alumunium foil. Bahan yang telah disiapkan kemudian dimasukan kedalam laminar air flow dan disinari dengan ultra violet selama kurang lebih 30 menit (Gambar 3.3). Alat

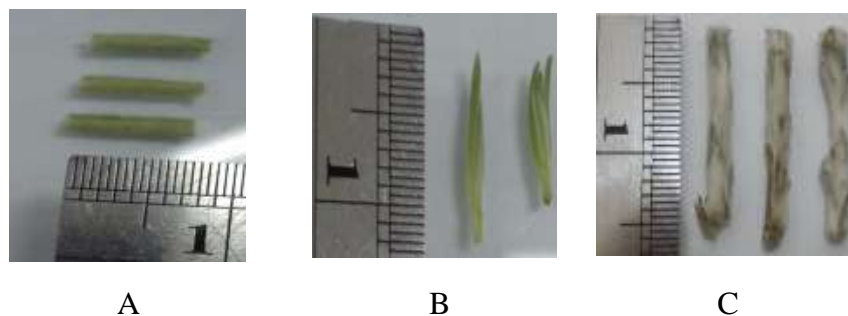
dan bahan yang telah disinari dengan ultra violet selanjutnya siap digunakan untuk penanaman potongan jaringan.



Gambar 3.3 Persiapan sterilisasi laminar sebelum penanaman

Potongan jaringan yang digunakan adalah buku, daun dan pucuk dari tanaman edelweiss, buku yang digunakan merupakan buku ke 8 dari pucuk begitupula dengan daun. Potongan jaringan buku yang ditanam pada medium perlakuan berjumlah dua dalam tiap botol kultur dengan jumlah botol sebanyak empat botol (delapan potongan jaringan buku). Potongan jaringan daun jumlah pengulangannya tiga, potongan jaringan daun ditanam pada medium perlakuan sebanyak tiga potongan jaringan setiap botol dengan jumlah botol 3 (sembilan potongan jaringan daun). Pucuk jumlah pengulangannya berjumlah dua, dengan jumlah penanaman pada medium perlakuan sebanyak dua potongan jaringan dalam setiap botol, jumlah botol 4 (delapan potongan jaringan pucuk).

Ukuran potongan jaringan yang akan ditanam dalam medium MS dapat dilihat pada Gambar 3.4 sebagai berikut:



A

B

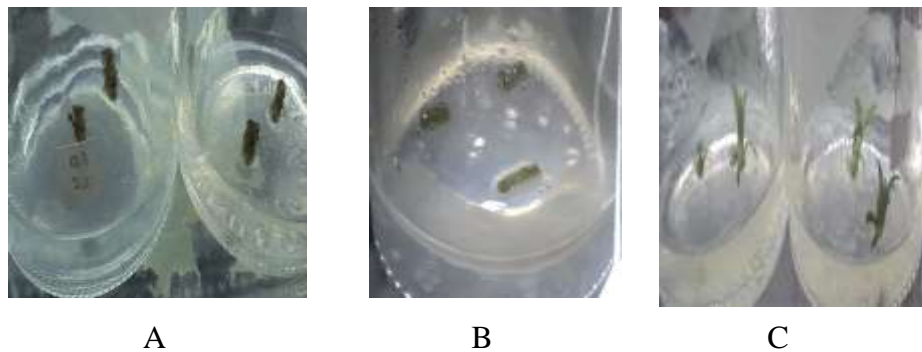
C

Gambar 3.4 Ukuran Jenis Potongan Jaringan Tanaman *Anaphalis javanica*. A. Panjang potongan jaringan daun 0,7cm B. Tinggi potongan jaringan pucuk 0,8-1cm C. Tinggi potongan jaringan buku 1,5cm

Potongan jaringan yang telah dipotong sesuai ukuran dilanjutkan dengan sterilisasi potongan jaringan dengan cara sebagai berikut:

- 1). Potongan jaringan dicuci air mengalir selama 15 menit.
- 2). Potongan jaringan dimasukkan ke dalam Bayclin 10% ditambah tween dua sampai tiga tetes selama 10 menit.
- 3). Potongan jaringan dicuci dengan akuades steril selama lima menit.
- 4). Pemasangan bagian ujung potongan jaringan yang akan ditanam.
- 5). Potongan jaringan dimasukkan ke dalam bayclin 5% ditambah tween dua sampai tiga tetes.
- 6). Potongan jaringan dicuci dengan akuades sebanyak tiga kali, tiap pencucian dilakukan selama lima menit.
- 7). Pemotongan kembali bagian ujung potongan jaringan yang akan ditanam.
- 8). Hasil pemotongan potongan jaringan dikeringkan dalam kertas saring sampai kering.
- 9). Potongan jaringan ditanam dalam medium MS
- 10). Botol kultur ditutup menggunakan aluminium foil dan plastik yang diikat dengan karet (Komunikasi Langsung, 2015).

Potongan jaringan yang telah ditanam pada medium MS kemudian disimpan di ruang kultur yang steril. Suhu yang digunakan pada ruang kultur $\pm 21^{\circ}\text{C}$. Lemari penyimpanan botol kultur dilap dan disemprot menggunakan alkohol 70% dengan tujuan supaya steril.



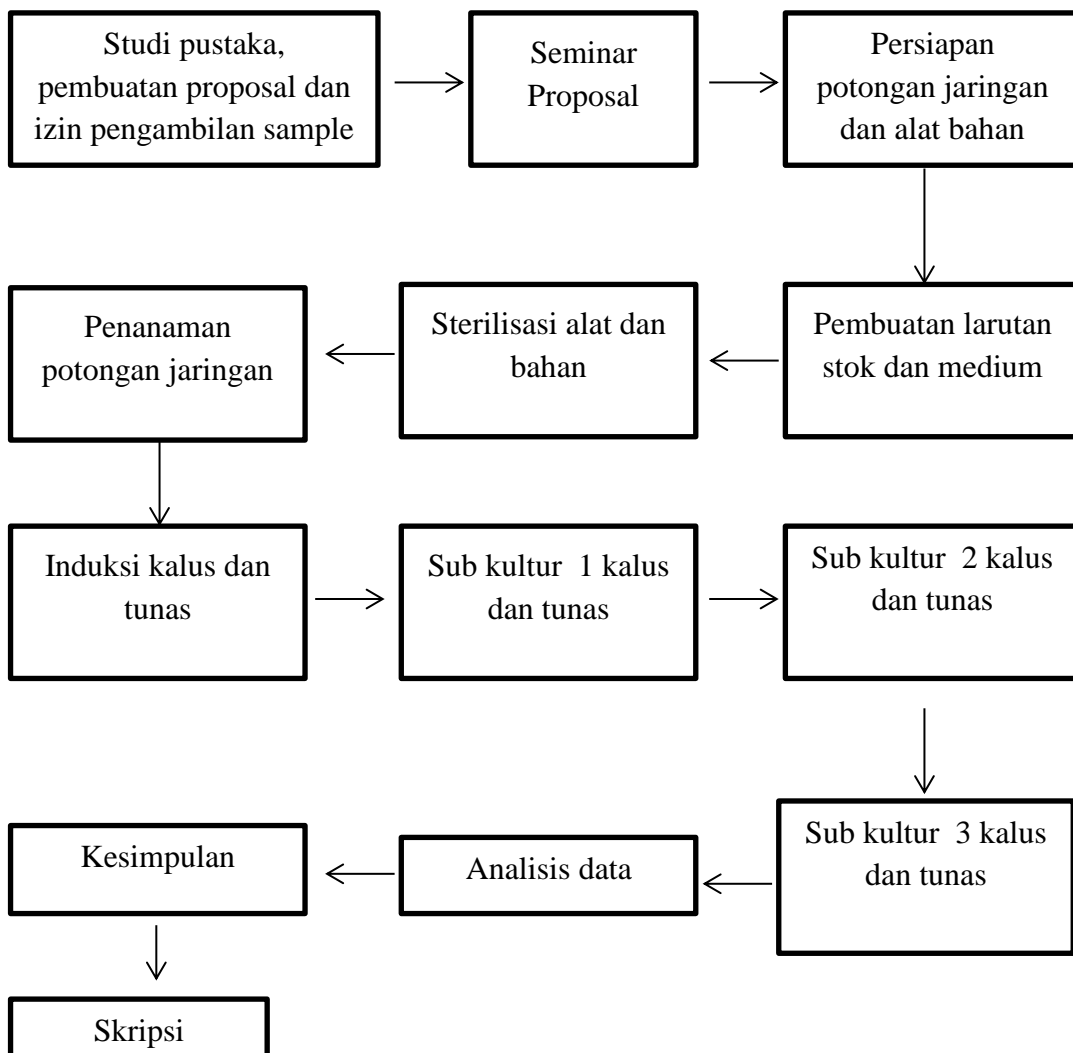
Gambar 3.5 Hasil Penanaman Potongan Jaringan
A. Buku, B. Daun, C. Pucuk

d. Pengamatan

Pengamatan pertumbuhan dilakukan dua hari sekali selama tiga minggu untuk mengetahui respons pertumbuhan terhadap parameter pertumbuhan potongan jaringan edelweiss secara morfologi yang meliputi tumbuhnya pucuk, akar atau kalus dari berbagai potongan jaringan yang berbeda. Selain itu, pada saat pengamatan jika terdapat medium kultur yang kontaminasi langsung dipisahkan.

e. Alur Penelitian

Alur penelitian (Gambar 3.6) dan langkah kerja (Gambar 3.7) pada penelitian ini sebagai berikut :

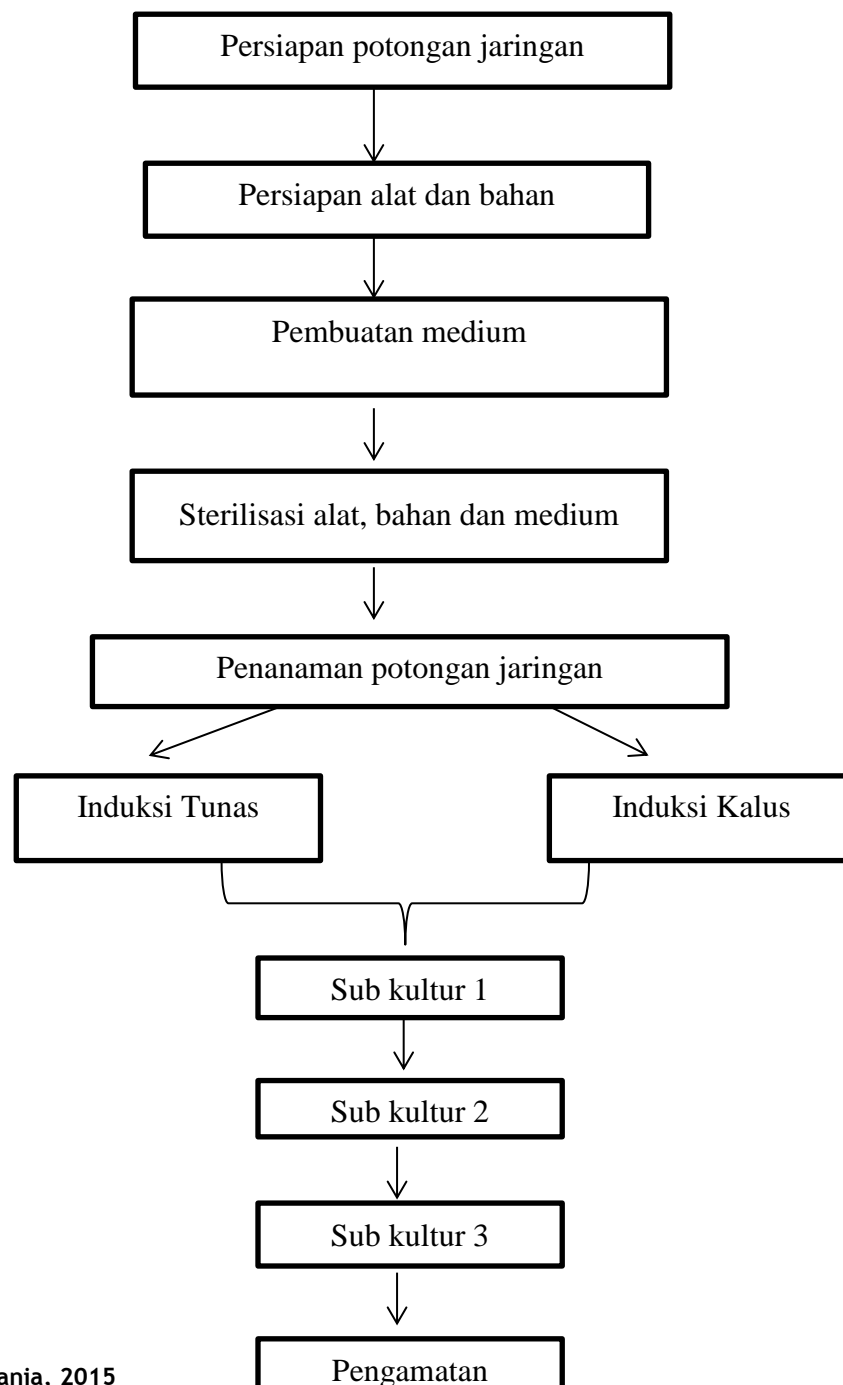


Gambar 3.6 Alur Penelitian

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menghitung persentase respons dari setiap potongan jaringan dengan cara :

$$\frac{\text{jumlah respons dalam satu konsentrasi potongan jaringan}}{\text{jumlah keseluruhan respons dalam satu konsentrasi potongan jaringan}} \times 100 = \dots \%$$

jumlah keseluruhan respons dalam satu konsentrasi potongan jaringan .



Gambar 3.7 Langkah kerja