

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Metode dan Desain Penelitian

Metode penelitian yang digunakan yaitu metode deskriptif. Desain eksperimen terdiri dari 2 macam perlakuan. Perlakuan pertama yaitu dengan menggunakan medium Murashige & Skoog (MS) yang ditambahkan zat pengatur tumbuh (ZPT) berupa BAP (*Benzyl Amino Purine*) dan perlakuan kedua yaitu dengan menggunakan medium alami yang mengandung sari tomat ditambah air kelapa. Percobaan diulang sebanyak sepuluh kali (10 botol) pada masing-masing perlakuan berisikan 50 biji panili yang disebarakan secara steril di seluruh permukaan medium. Masa penanaman dilakukan selama 8 minggu.

B. Waktu & Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 4 bulan yang dimulai pada bulan Maret hingga Juli 2009 di Laboratorium Fisiologi Jurusan Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA) Universitas Pendidikan Indonesia (UPI).

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan terdiri dari alat-alat untuk pembuatan larutan stok garam-garam mineral dan zat pengatur tumbuh, alat-alat untuk pembuatan medium dan alat-alat untuk penanaman eksplan. Keseluruhan alat-alat tersebut tercantum dalam Tabel 3.1 di bawah ini.

Tabel 3.1 Alat-Alat yang Digunakan

No	Nama Alat	Spesifikasi	Jumlah
1	Analytical balance	-	1
2	Autoclave	ALP/KT 23	1
3	Batang pengaduk	-	2
4	Blade	-	5
5	Botol Kultur	Ø 5 cm	50
6	Botol semprot	-	1
7	Erlenmeyer	500 ml	1
8	Gelas kimia	1000 ml	6
9	Gelas ukur	1000 ml	6
10	Hot plate & Magnetic stirer	-	1
11	Kaca arloji	-	1
12	Laminar Air Flow	-	1
13	Lampu spirtus	-	1
14	Lightmeter	Lutron LX-120	1
15	Mikropipet	5 ml	1
16	Pinset	-	2
17	pH meter	Elektrik	1
18	Sendok tanduk	-	1
19	Skalpel	-	1
20	Sling Hygrometer	-	1
21	Termometer raksa	-	1
22	Timbangan kasar	-	1
23	Tips	1-5 ml	1 pak

2. Bahan

Untuk bahan yang dibutuhkan dalam penelitian tertera pada Tabel 3.2 di bawah ini.

Tabel 3.2 Bahan-Bahan yang Digunakan

No	Nama bahan	Kebutuhan
1	Eksplan : Biji panili dalam buah panili berumur 12 minggu yang di dapat dari Perkebunan Vanilla di Sumedang.	5 buah
2	Medium MS+BAP: - Murashige & Skoog (MS) - Agar 8 g/l - Sukrosa 30 g/l - BAP	10 L 8 g 30 g/L 2,5 mg
3	Medium Alami: - Tomat - Air kelapa - Growmore - Sukrosa - Agar Swallow Globe	150 gr 200 gr 2 ml 30 gr 8 gr
4	Bahan penunjang : - Aquades - Ethanol 70 % - Larutan clorox 20 % - HCl 0,1 N - NaOH 0,1 N	10 L 1,5 L 250 ml 50 ml 50 ml
5	Bahan-bahan lain : - Aluminium foil - Karet - Kertas saring - Tisu - Kertas label	2 gulung 2 ons 1 gulung 5 gulung 1 pak

D. Cara Kerja

1. Pembuatan Larutan Stok Medium Kultur

Pembuatan larutan stok bertujuan untuk memudahkan pembuatan medium selama penelitian berlangsung. Larutan baku (*Stock Solution*) ini nantinya disimpan pada suhu 4°C dan siap digunakan pada saat diperlukan.

2. Stok Medium MS

Medium MS mengandung unsur-unsur yang tergolong ke dalam garam-garam makronutrien, mikronutrien vitamin, dan zat organik lainnya. Pada Tabel 3.3 disebutkan komposisi medium MS untuk satu liter medium.

Tabel 3.3 Komposisi MS Untuk Satu Liter Medium

Medium MS		
Makronutrien	(mg/L)	(mM)
Ammonium Nitrat (NH ₄ NO ₃)	1.650,00	20,61
Kalsium Klorida anhydrous (CaCl ₂ *H ₂ O)	332,02	2,99
Magnesium Sulfat anhydrous (MgSO ₄ *7H ₂ O)	180,70	1,50
Kalium Phospat (KH ₂ PO ₄)	1.900,00	18,79
Kalium Nitrat (KNO ₃)	170,00	1,25
Mikronutrien	(mg/L)	(µM)
Asam Borik (H ₃ BO ₃)	6,20	100,0
Kobal Klorida-6H ₂ O (CuSO ₄ *5H ₂ O)	0,025	0,110
Kupri Sulfat-5H ₂ O (CuSO ₄ *5H ₂ O)	0,025	0,100
Na ₂ -EDTA	37,26	
Mangan Sulfat-H ₂ O (MnSO ₄ *H ₂ O)	16,90	100,0
Asam Molybdat (Na ₂ Mo*2H ₂ O)	0,250	1,030
Kalium Iodida (KI)	0,83	5,0
Ferro Sulfat-7H ₂ O (FeSO ₄ *7H ₂ O)	27,80	
Zinc Sulfat-7H ₂ O (ZnSO ₄ *7H ₂ O)	8,60	29,91
Zat Organik	(mg/L)	(µM)
Glisin	2,0	26,64
Myo-Inositol	100,0	560,00
Asam Nikotinat (Niacin)	0,50	4,06
Pyridoxine HCl (Vitamin B ₆)	0,50	2,43
Thiamine HCl (Vitamin B ₁)	0,10	0,30

Sumber: www.geocities.com, 1992

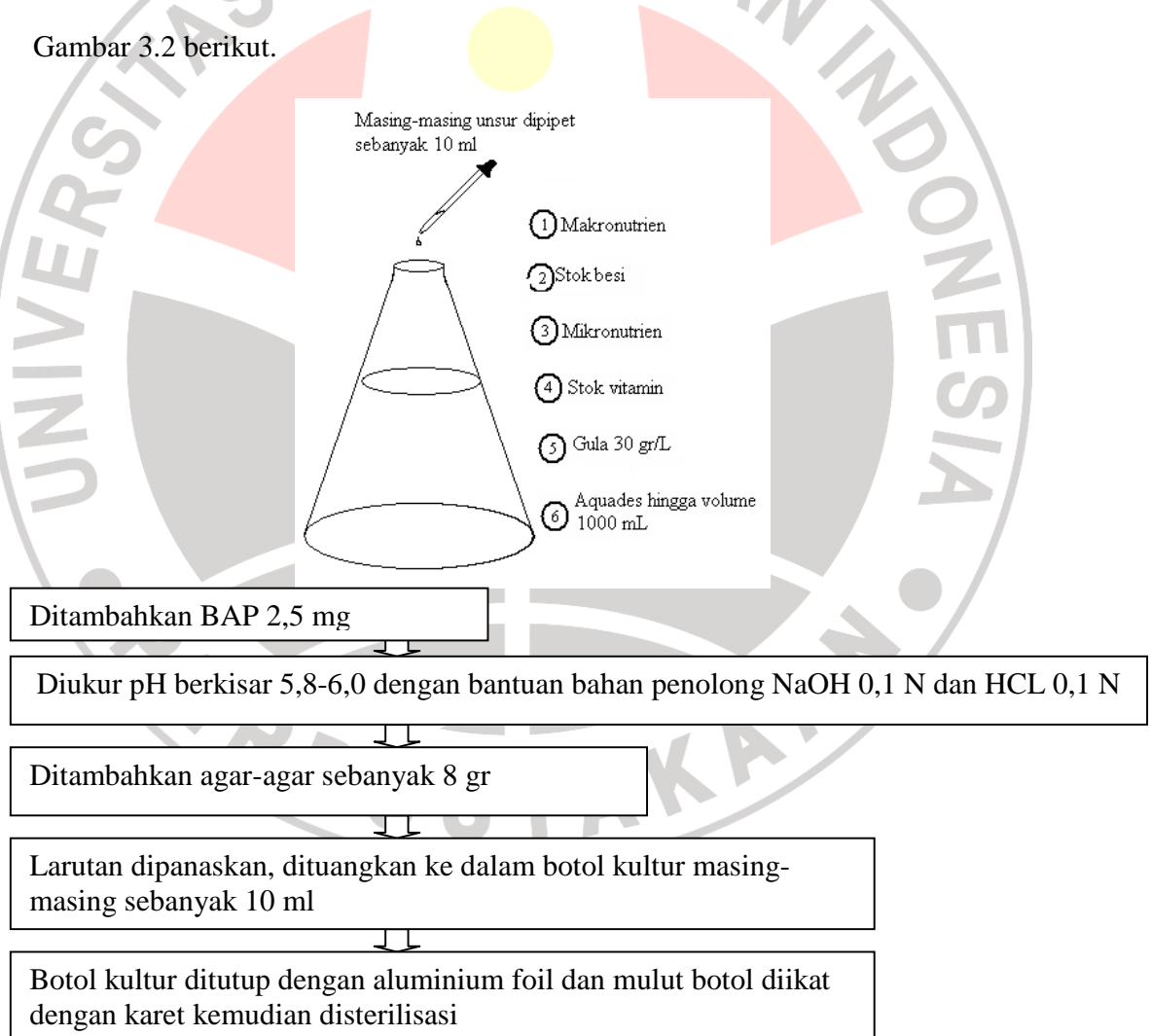
Pada penelitian ini diperlukan medium sekitar sepuluh liter larutan sehingga takaran setiap unsur dikalikan sepuluh. Setelah diperoleh takaran yang diinginkan, setiap unsur kemudian dikelompokkan berdasarkan golongannya seperti makronutrien, mikronutrien, vitamin dan stok besi. Setiap unsur per golongan dilarutkan dengan akuades sampai homogen dan digenapkan hingga 100 ml. Selanjutnya larutan stok kemudian dimasukkan ke dalam botol berwarna gelap berpenutup dan diberi label nama, tanggal pembuatan serta ukuran takaran penggunaan per satu liter medium (Gambar. 3.1). Botol stok tersebut kemudian disimpan pada suhu 4°C.



Gambar 3.1 Larutan Stok MS

3. Pembuatan Medium MS dengan Penambahan BAP

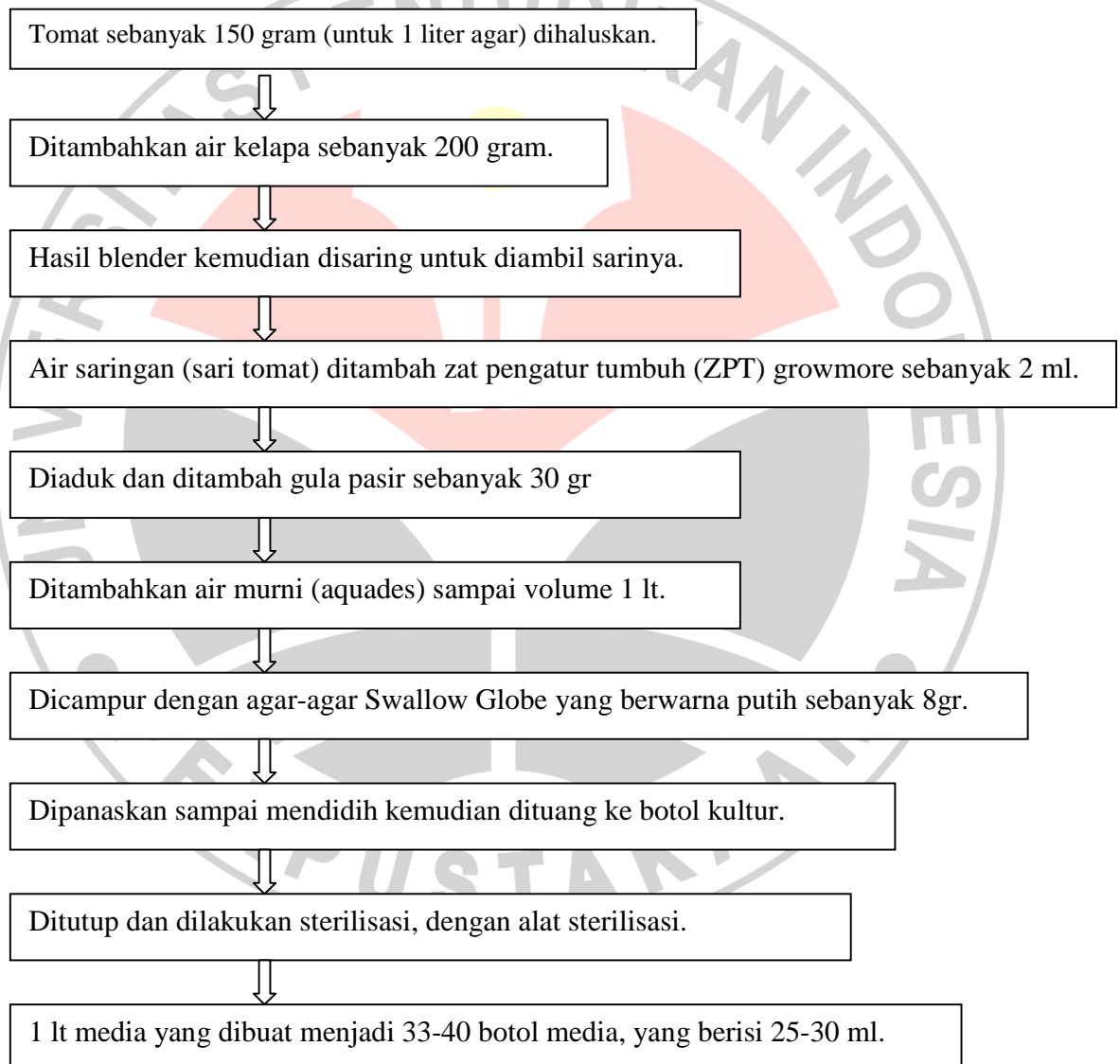
Pembuatan medium dilakukan dengan metode pengenceran larutan stok. Medium MS dibuat dengan cara mengambil larutan stok yang sebelumnya telah disimpan di dalam lemari es menggunakan pipet sesuai dengan jumlah yang dibutuhkan. Untuk pembuatan satu liter medium MS diperlukan 10 ml larutan stok MS. Adapun langkah-langkah pembuatan medium MS dapat dilihat pada Gambar 3.2 berikut.



Gambar 3.2 Pembuatan Medium MS dengan Penambahan BAP

4. Pembuatan Medium Tomat

Menurut Mulyadi (Wahyuningsih, 2008), langkah-langkah pembuatan medium tomat sangat sederhana. Adapun langkah-langkah pembuatannya dapat dilihat pada Gambar 3.3 di bawah ini.



Gambar 3.3 Pembuatan Medium Tomat

5. Sterilisasi

Tahapan sterilisasi merupakan tahapan penting yang perlu dilakukan untuk menghindari adanya kontaminasi dari mikroorganisme pada kultur jaringan. Sterilisasi dilakukan pada media, alat, dan bahan tanaman.

Biji sebagai eksplan yang digunakan dalam penelitian ini, pada prinsipnya berada dalam keadaan steril. Hal ini disebabkan karena biji berada di dalam buah dan terlindung oleh jaringan-jaringan buah yang berada di luar embrio, antara lain oleh kulit buah, daging buah dan kulit biji. Keadaan ini menyebabkan sterilisasi eksplan tidak perlu dilakukan. Sterilisasi permukaan perlu dilakukan pada buah untuk mensterilkan permukaan buah sehingga pada waktu penanaman eksplan tidak terdapat sumber kontaminan. Karena biji berada di dalam, sterilisasi dapat dilakukan dengan sterilisasi buah dengan sterilan kimia berupa larutan sodium hipoklorit dengan konsentrasi 20%.

Sterilisasi medium, semua medium yang akan digunakan dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dan diikat dengan karet. Alat-alat seperti cawan petri, gunting, pinset, terlebih dahulu dibungkus dengan kertas kemudian dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dan diikat dengan karet. Kemudian medium dan alat tersebut disterilisasi dengan autoklaf pada tekanan uap 12 lbs dan suhu 121°C selama 20 menit.

Medium yang telah disterilisasi (Gambar 3.4) kemudian disimpan di ruang kultur sedangkan peralatannya dibiarkan tetap dalam kondisi terbungkus sebelum digunakan. Selama digunakan, peralatan disterilisasi terlebih dahulu dengan cara

memasukkannya ke dalam larutan alkohol 70 % lalu dibakar dengan nyala bunsen atau lampu spirtus.



Gambar 3.4 Medium Steril Dalam Botol Kultur

6. Penanaman Eksplan Biji Panili pada Medium

Penaburan biji panili dilakukan dalam kondisi aseptik dalam tempat yang steril berupa kotak pemindahan, *laminar air flow*, atau kamar transfer yang steril. Sebelum digunakan, *laminar air flow* disterilkan terlebih dahulu dengan menggunakan lampu UV selama 15 menit, dindingnya dibersihkan dengan cara menyemprotkan alkohol 70 %.

Peralatan penanaman seperti botol-botol yang telah berisi medium, alat diseksi, korek api, lampu spirtus, timbangan analitik serta bahan atau alat lainnya sebelum dimasukkan ke dalam kotak aseptik harus disemprot atau dilap terlebih

dahulu dengan menggunakan larutan alkohol 70 %. Alat-alat diseksi yang telah masuk ke dalam kotak aseptik tetap disterilisasi dengan memasukkannya ke dalam botol berisi larutan alkohol 70 % dan di bakar dengan nyala lampu spiritus (Gambar 3.5).



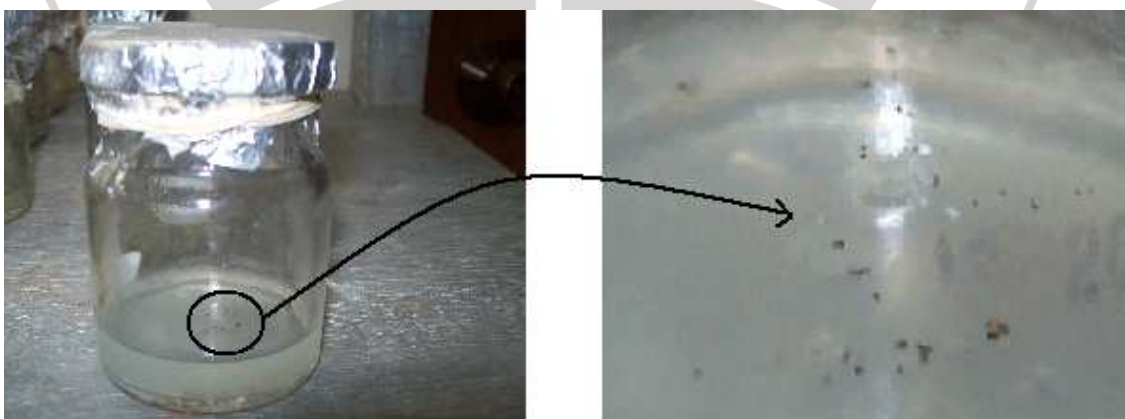
Gambar 3.5 Sterilisasi *Laminar Air Flow* dan Medium Dengan Menggunakan Lampu UV

Biji panili (Gambar 3.6) siap untuk ditanam dalam medium. Satu botol kultur berisikan 50 biji panili yang disebar secara steril pada seluruh permukaan medium.



Gambar 3.6 Eksplan Biji Panili

Setelah penanaman (Gambar 3.7), kultur disimpan secara acak di dalam ruangan kultur dan dipelihara untuk dilihat perkembangannya.



Gambar 3.7 Awal Penanaman Biji Panili Pada Media Kultur

7. Penyimpanan Kultur

Kegiatan inkubasi kultur bertujuan untuk menumbuhkan eksplan yang telah ditanam dalam botol kultur. Botol-botol kultur yang telah ditanami biji panili disimpan di dalam ruang kultur untuk dipelihara dan selanjutnya diamati pertumbuhannya selama periode kultur.

Ruangan kultur dibersihkan terlebih dahulu sebelum botol-botol kultur ditempatkan di dalamnya. Dilakukan pula pengaturan faktor klimatik yang meliputi suhu, cahaya dan kelembaban yang mengacu pada catatan data dari alat ukur yang digunakan yakni termometer, raksa untuk mengukur suhu ruangan, *lightmeter* untuk mengukur intensitas cahaya, dan sling hygrometer untuk mengukur kelembaban udara di dalam ruangan kultur.

Berdasarkan hasil pengukuran, suhu ruangan kultur rata-rata $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ dengan kelembaban sebesar 70%-80%. Sumber pencahayaan ruangan kultur menggunakan lampu neon 45 Watt. Periode penyinaran selama 16 jam perhari dengan intensitas cahaya rata-rata 2500 lux. Setelah ruangan kultur siap digunakan, botol-botol kultur ditempatkan pada rak kultur dengan posisi acak untuk diinkubasi selama enam minggu. Untuk mempertahankan kondisi steril di dalam ruangan, botol kultur yang berada pada rak sering disemprot dengan alkohol 70% (Gambar 3.8).



Gambar 3.8 Penempatan Botol Kultur Secara Acak Pada Rak

8. Pengamatan

Pengamatan dilakukan secara visual selama masa inkubasi 8-12 minggu.

Data yang diperoleh berupa respons pembentukan kalus, pembentukan tunas dan akar.

9. Analisis Data

Berdasarkan hasil pengamatan, data yang diperoleh berupa rata-rata persentase dari sepuluh ulangan. Adapun rumus yang digunakan adalah sebagai berikut:

Persentase pertumbuhan biji	=	$\frac{\text{Jumlah eksplan biji yang menghasilkan respons/botol}}{\text{Jumlah seluruh eksplan biji/botol}} \times 100 \%$
-----------------------------	---	---