

I. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan padabulan April sampai Agustus 2017 di Laboratorium Pemuliaan dan Genetika Fakultas Pertanian dan Peternakan Universitas Islam Sultan Syarif Kasim Riau.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah media dasar MS (*Murashige and Skooge*), alkohol, deterjen, akuades, zat pengatur tumbuh BAP (*Benzil amino purine*) dan NAA (*Napthalene acetic acid*), agar, *klorox*, sukrosa, vitamin, plastic, karet gelang, kertas label, spirtus dan daun muda tanaman pasak bumi. Daun pasak bumi yang digunakan adalah daun yang telah membuka sempurna yang diperoleh dari koleksi rumah tanaman (rumah kaca) Laboratorium Pemuliaan dan Genetik UIN SUSKA Riau.

Alat yang digunakan antara lain *laminar air flow* (LAF), *autoclave*, *magnetic hot stirrer*, botol kultur, *beker glass*, *erlenmeyer*, pH meter, *handsprayer*, pinset, *scalpel*, gunting, spirtus, pisau, lampu bunsen, pipet ukur, korek apidan alat tulis.

3.3 Metode Penelitian

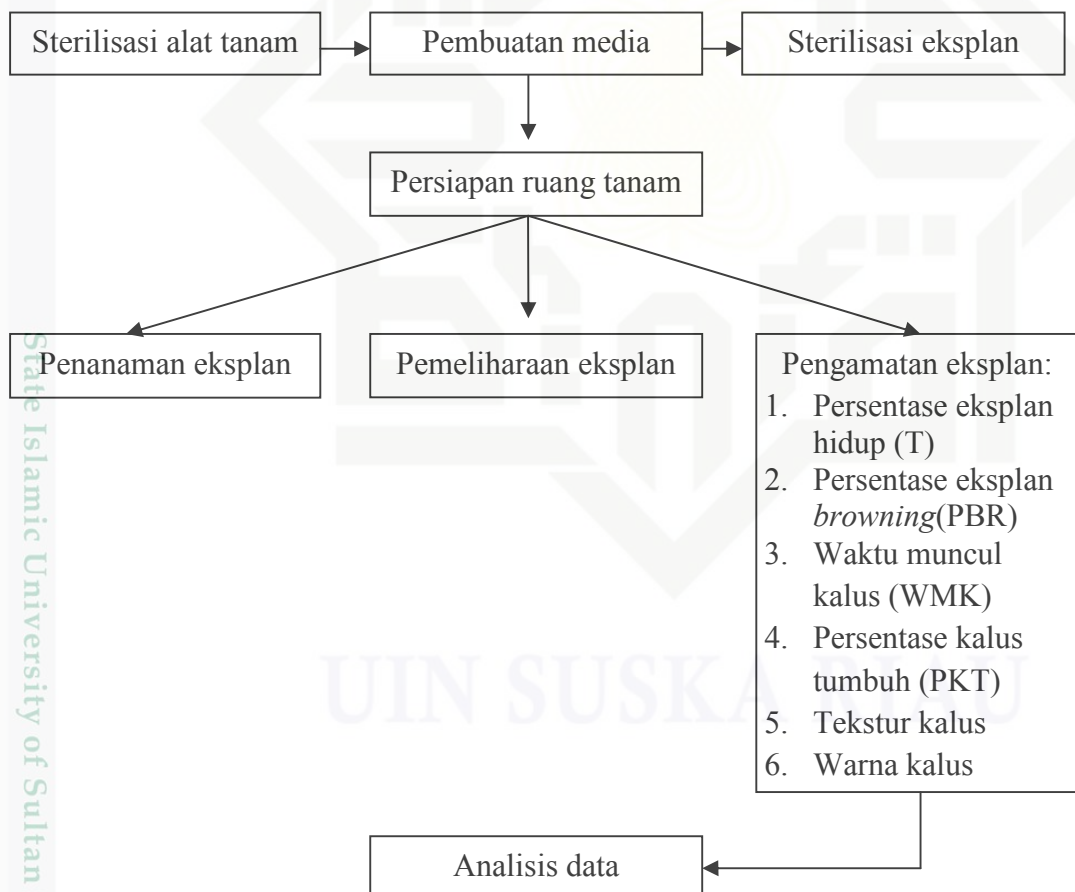
Penelitian ini disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan dua faktor. Faktor pertama adalah BAP dengan tigataraf konsentrasi yaitu 0 ppm (B0), 1ppm (B1) dan 2 ppm (B2). Faktor kedua adalah NAA dengan empat taraf konsentrasi yaitu 0 ppm (N0), 1,5 ppm (N1), 3ppm (N2) dan 4,5 ppm (N3). Dari perlakuan tersebut diperoleh 12 kombinasi perlakuan. Setiap satu kombinasi perlakuan ditanam satu eksplan dan diulang sepuluh kali, dengan demikian diperoleh jumlah percobaan 120 unit. Kombinasi perlakuan konsentrasi ZPT BAP dan NAA dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan Berbagai Taraf Konsentrasi BAP dan NAA

BAP (ppm)	NAA (ppm)			
	0	1,5	3	4,5
0	0+0	0+1,5	0+3	0+4,5
1	1+0	1+1,5	1+3	1+4,5
2	2+0	2+1,5	2+3	2+4,5

3.4 Pelaksanaan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan dimulai dari sterilisasi alat, botol, pembuatan media perlakuan, sterilisasi eksplan, persiapan ruang tanam, penanaman eksplan, pemeliharaan, pengamatan eksplan dan analisis data. Alur penelitian kultur *in vitro* tanaman pasak bumi dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1: Alur Penelitian.

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

1. Sterilisasi Alat, botol dan media tanam.

Botol dan alat-alat yang digunakan dalam pembuatan media dan penanaman eksplan dicuci hingga bersih kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 17,5 psi dengan waktu 45 menit. Alat-alat yang perlu disterilkan yaitu pinset, gunting, pengaduk, erlenmeyer, botol kultur, gelas piala dan cawan petri.

2. Pembuatan Media Kultur

Dalam pembuatan media kultur, total volume yang dibuat adalah 300 ml. komposisi media yang digunakan adalah media MS0 ditakar menggunakan gelas ukur, BAP dan NAA sesuai dengan konsentrasi perlakuan, kemudian tambahkan sukrosa, agar dan vitamin B₁₂. Semua bahan dimasukkan kedalam labu ukur dan ditambahkan aquades sampai batas 300 ml. Setelah semua bahan larut kemudian dimasukkan kedalam panci. Setelah itu diatur pH-nya menjadi 5,8-6,0 dengan menggunakan pH meter yaitu dengan cara menambahkan beberapa tetes 0,1 M NaOH jika media bersifat masam atau 0,1 M HCl jika media bersifat basa. Pengukuran pH dilakukan setelah media mendidih di atas *hot plate* dengan bantuan *magnetic stirrer*. Kemudian media dimasukkan ke dalam botol kultur yang sudah disterilkan dan ditutup dengan menggunakan plastik dan diikat dengan menggunakan karet tahan panas, setelah itu media disterilkan dengan menggunakan *autoclave* pada temperatur 120°C selama 15 menit. Media diletakkan diruang inkubasi dan setelah 3 hari maka media siap digunakan.

3. Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan dilakukan dengan mencuci eksplan dibawah air mengalir dan direndam didalam sunlight selama 2 menit, selanjutnya eksplan dibilas kembali dengan air steril. Setelah pencucian, dilakukan perendaman dalam fungisida *benlate* (2 g/L) selama 30 menit, dibilas kembali dengan air steril kemudian direndam menggunakan bakterisida selama 30 menit. Setelah itu eksplan dibawa ke dalam laminar, dan direndam kembali dalam larutan *klorox* 20% selama 10 menit, selanjutnya dibilas kembali dengan air steril kemudian masukkan kembali eksplan ke dalam larutan *klorox* 5% selama 5 menit, bilas

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.

dengan air steril dan rendam dalam alkohol 70% selama 3 menit, lalu dibilas dengan air steril sebanyak 3 kali.

4. Persiapan Ruang Tanam

Seluruh kotak *laminar air flow* (LAF) sebelumnya dibersihkan menggunakan alkohol 70% lalu disterilkan dengan sinar UV selama 1 jam sebelum proses penanaman dilakukan. Semua alat dan bahan yang akan dipakai harus disemprot dengan alkohol 96% sebelum dimasukkan kedalam kotak tanam. Hal ini dilakukan untuk menghindari resiko bahan penelitian terkontaminasi.

5. Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan dilakukan di dalam *laminar air flow*. Daun dipotong-potong dengan ukuran 0,5 x 0,5 cm - 1,0 x 1,0 cm. Pengirisan dan pemindahan eksplan kedalam botol dilakukan dengan menggunakan pisau dan pinset yang telah disterilkan dengan alkohol 96%. Proses penanaman dilakukan dengan cara botol kultur dipanasi terlebih dahulu dibagian mulut botol untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Tutup botol dibuka dengan hati-hati lalu eksplan ditanam di atas media dengan pinset steril. Eksplan ditanam dalam bentuk irisan melintang, kemudian potongan daun diletakkan dengan posisi bagian dorsal menghadap ke atas dan selanjutnya ditanam pada medium induksi kalus. Sebelum ditutup, mulut botol dipanaskan kembali. Setelah itu, botol diberi label perlakuan dan tanggal penanamannya. Eksplan diinkubasi dalam ruang inkubator dengan suhu ruangan 20⁰C serta disinari dengan lampu TL *day light* 20 watt.

6. Pemeliharaan

Botol kultur diletakkan pada rak kultur selama delapan minggu. Kondisi ruang kultur dijaga pada suhu 20-25⁰C dan dijaga kebersihannya agar terhindar dari kontaminasi yaitu dengan melakukan penyemprotan alkohol 70% disekitar botol dan rak kultur secara berkala. Serta apabila terdapat eksplan yang terkontaminasi segera dikeluarkan dari ruang kultur, jika eksplan yang terkontaminasi tidak segera dikeluarkan maka eksplan yang masih steril lainnya kemungkinan akan mudah untuk terkontaminasi.

3.5 Parameter Pengamatan

a. Persentase Eksplan hidup (T)

Pengamatan eksplan hidup diamati setiap hari dan dihitung setiap minggu setelah satu minggu inisiasi eksplan. Cara menghitung persentase eksplan hidup adalah sebagai berikut: $T = \frac{\sum \text{Eksplan Hidup}}{N} \times 100\%$

Keterangan: T= Persentase eksplan hidup

N= Jumlah eksplan steril dan jumlah eksplan membentuk kalus

b. Persentase eksplan *browning*.

Pengamatan eksplan *browning* atau eksplan yang mengalami pencoklatan diamati setiap hari dihitung setiap minggu setelah satu minggu inisiasi eksplan. cara menghitung persentase eksplan *browning* adalah sebagai berikut: $PBR = \frac{\sum \text{Eksplan Browning}}{N} \times 100\%$

Keterangan: PBR= Persentase eksplan *browning*

N = Jumlah keseluruhan eksplan *browning*

c. Waktu munculnya kalus

Pengamatan ini dilakukan dengan menghitung hari saat munculnya kalus pertama kali yang dinyatakan dalam HST (hari setelah tanam) dan diamati setiap hari. Ditandai dengan adanya pembengkakan atau munculnya jaringan berwarna putih kehijauan atau kekuningan pada permukaan eksplan.

d. Persentase Kalus tumbuh

Kalus tumbuh dihitung setelah munculnya kalus. Kalus tumbuh dihitung setiap minggu yang dinyatakan dalam bentuk persentase. Cara menghitung persentase kalus tumbuh sebagai berikut: $PKT = \frac{\sum \text{kalus terbentuk}}{N} \times 100$

Keterangan: PKT= Persentase kalus tumbuh

N = Jumlah keseluruhan kalus tumbuh

e. Tekstur kalus

Pengamatan tekstur kalus dilakukan pada akhir pengamatan 60 HST (hari setelah tanam) dengan mengamati tekstur kalus yang terbentuk, apakah termasuk kalus yang kompak atau remah.

f. Warna kalus

Pengamatan warna kalus dilakukan pada akhir pengamatan 60 HST (hari setelah tanam) dengan mengamatisecara visual. Penentuan warna kalus ditetapkan berdasarkan keterangan warna kalus: hijau, putih, kuning, kuning kecoklatan dan coklat.

3.6 Analisis data

Data kualitatif yang diperoleh dianalisis secara deskriptif sedangkan data kuantitatif dianalisis dengan uji F, apabila terdapat perbedaan antar perlakuan maka akan dilanjutkan menggunakan uji DMRT taraf 5%. Model linear Rancangan Acak Lengkap dua Faktor sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Keterangan:

Y_i = Nilai pengamatan pada perlakuan BAP taraf ke-i, perlakuan NAA taraf ke-j dan ulangan ke-k

μ = Nilai rata-rata umum

α_i = Pengaruh BAP taraf ke-i

β_j = Pengaruh NAA taraf ke-j

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Pengaruh interaksi BAP taraf ke-i dan NAA taraf ke-j

ϵ_{ijk} = Galat percobaan

Tabel 3.2 Analisis Ragam RAL Faktorial

Sumber Keragaman	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F-hitung	F-tabel
Perlakuan	ab-1	JKP	KTP	KTP/KTG	$F(\alpha, db-P, db-G)$
A	a-1	JK (A)	KT (A)	KT (A)/KTG	$F(\alpha, db-A, db-G)$
B	b-1	JK (B)	KT (B)	KT (B)/KTG	$F(\alpha, db-B, db-G)$
AB	(a-1) (b-1)	JK (AB)	KT (AB)	KT (AB)/KTG	$F(\alpha, db-AB, db-G)$
Galat	ab (r-1)	JK (G)	KTG		
Total	abr-1	JKT			