

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Pelaksanaannya dimulai dari bulan Mei hingga bulan September 2011.

3.2 Alat dan Bahan

.Bahan tanam yang digunakan sebagai sumber eksplan adalah tunas pucuk 3 buku dari ubi kayu varietas Kasersart berumur \pm 1 bulan setelah tanam. Formulasi media prekondisi yang digunakan adalah formulasi MS tanpa ZPT (Murashige dan Skoog, 1962). Pada media perlakuan formulasi yang digunakan adalah formulasi MS (Murashige dan Skoog, 1962), yang dimodifikasi dengan menambahkan tiga taraf BA (Benziladenine) yaitu 0,2 ; 0,4 ; 0,8 mg/l serta dua taraf IAA (indol acetic acid) yaitu 0 ; 1 mg/l. Bahan lain yang diperlukan antara lain, akuades, alkohol, agar, gula pasir, KOH 1N atau HCl 1N.

Alat yang digunakan berupa alat-alat laboratorium dan alat-alat tanam seperti : *laminar air flow cabinet* (LAFC), autoklaf, timbangan analitik, labu Erlenmeyer, gelas ukur, gelas piala, petridish, pipet, pengaduk, pH meter, *magnetic stirrer*,

pinset, scalpel, gunting, *Bunsen burner*, handsprayer, kompor, panci, korek api, air conditioner (AC), rak kultur, botol media, kertas tisu, plastik transparan, karet gelang, label, penggaris, dan pensil.

3.3 Metode Penelitian

Perlakuan disusun secara faktorial (3x2) dalam rancangan teracak lengkap. Faktor pertama adalah pemberian *benzyladenine* (BA) dengan konsentrasi 0,2 ; 0,4 ; dan 0,8 mg/l. Faktor kedua adalah pemberian 0 ; 1 mg/l *indol acetic acid* (IAA). Setiap perlakuan diulang tiga kali dan setiap satuan percobaan sedikitnya 3 botol kultur yang masing-masing berisi dua eksplan. Data pada masing-masing perlakuan dihitung nilai tengahnya dan dianalisis ragam dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) taraf nyata 5%.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Pemilihan dan Penyiapan Tanaman Induk Sumber Eksplan

Eksplan yang digunakan adalah bagian tunas tanaman singkong yang berasal dari tanaman ubi kayu berumur 4 minggu yang sudah ditanam dalam polibag.

Tanaman induk ini ditanam di depan Laboratorium Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Bibit tanaman singkong yang digunakan adalah varietas Kasersart (produksi tinggi dengan kadar patinya tinggi). Polybag yang digunakan berukuran sebanyak 100 polybag. Tanaman induk dipelihara dengan penyiraman dua kali sehari.

3.4.2 Sterilisasi Alat

Dilakukan sterilisasi botol-botol kultur dan peralatan menanam seperti pinset, cawan petri, dan scalpel menggunakan autoklaf selama 30 menit pada suhu 121°C dengan tekanan $1,2 \text{ kg/cm}^2$.

3.4.3 Pembuatan Media Kultur

Media prekondisi yang digunakan yaitu media Murashige dan Skoog (1962). Zat pematat yang digunakan adalah agar merek *Swallow Globe* sebanyak 7 g/l dan gula ditambahkan 30 g/l . Media dibuat dengan pH 5,8 menggunakan pH meter, apabila pH media kurang dari 5,8 maka perlu ditambah beberapa tetes 1N KOH atau 1N HCl. Media perlakuan yang digunakan adalah formulasi MS dengan tiga taraf konsentrasi benziladenine yaitu 0,2 (B_1) ; 0,4 (B_2); dan 0,8 mg/l (B_3) yang dikombinasikan dengan dua taraf indol acetic acid yaitu 0 mg/l (I_0), dan 1 mg/l (I_1).

Medium dimasak untuk melarutkan pematat media dan dimasukkan ke dalam wadah kultur ukuran 250 ml sebanyak 20 ml dan ditutup dengan plastik transparan yang diikat dengan karet, kemudian diotoklaf dengan tekanan $1,2 \text{ kgf/cm}^2$ pada suhu 121°C selama 7 menit.

3.4.4 Sterilisasi Eksplan

Bahan yang digunakan sebagai eksplan adalah bagian tunas aksilar tiga buku diambil dari stek yang ditanam dan bertunas umur 4 minggu. Selanjutnya tahap pertama yaitu eksplan disterilisasi luar dengan cara dicuci pada air mengalir

selama 1 menit. Lalu eksplan dimasukkan ke dalam botol yang sudah berisi air sabun secukupnya lalu ditutup kemudian direndam dan dikocok selama ± 3 menit.

Setelah itu, eksplan dibilas menggunakan air mengalir. Pembilasan diulang sampai tiga kali. Eksplan yang sudah bersih lalu dipindahkan ke botol yang sudah disterilisasi kemudian ditutup rapat dan diletakkan ke dalam *laminar air flow cabinet*. Tahap kedua yaitu eksplan disterilisasi di dalam laminar dengan merendam kocok dalam larutan Bayclin 20% (bahan aktif sodium hipoklorit 5%) selama ± 5 menit diulang 2 kali. Setelah itu, dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali. Eksplan siap ditanam dalam media prekondisi (Murashige dan Skoog).

3.4.5 Penanaman Eksplan

Eksplan berupa tunas tiga buku dikultur terlebih dahulu pada media prekondisi selama 7 hari. Eksplan yang telah steril selanjutnya dipotong menjadi satu buku kemudian disubkultur ke media perlakuan. Satu botol media perlakuan berisi dua eksplan.

3.4.6 Pemeliharaan Kultur

Pemeliharaan kultur singkong dilakukan dengan meletakkan kultur di rak-rak kultur dalam ruang kultur yang dikondisikan dengan suhu $24^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ menggunakan pencahayaan dengan lampu fluorescent (TL) berintensitas 1.000 – 2.000 lux secara terus menerus. Periode penyinaran diatur 16 jam terang dan 8 jam gelap.

3.5 Pengamatan

Pengamatan pertama dilakukan pada umur empat minggu setelah tanam (tahap inisiasi) dan pengamatan kedua dilakukan empat minggu setelah subkultur.

Variabel yang diamati adalah

1. Panjang tunas

Panjang tunas aksilar diukur dari pangkal tunas di atas permukaan eksplan sampai titik tumbuh.

2. Jumlah buku

Jumlah buku tunas aksilar dihitung berdasarkan jumlah buku yang terdapat pada tunas.

3. Jumlah daun segar

Jumlah daun dihitung berdasarkan banyaknya daun yang terdapat pada tunas aksilar yang masih hijau dan dalam keadaan segar.

4. Pengamatan visual

Pengamatan visual dilakukan pada umur 4 MST di luar botol pada tahap inisiasi maupun subkultur dan dibuktikan dengan foto.