

III. METODELOGI PENELITIAN

1.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung pada bulan September sampai Desember 2011.

1.2 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah Eksplan tunas samping (1 buku) dari kultur *in vitro* ubi kayu (*M. Esculenta*) varietas Kasesart, Media MS (*Murashige & Skoog*), ZPT BA (*Benzyladenin*) dan NAA (*Naphthaleneacetic Acid*), Alkohol, Clorox (sunclin), Sabun cuci. Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat standar untuk kultur jaringan. Alat-alat tersebut meliputi alat tanam, botol tanam, gelas erlenmeyer, gelas ukur, pipet, neraca, pH-meter, autoklaf, lup, oven, *laminar air flow cabinet (LAFC)*, *hot plate*, *magnetic stirrer*, lampu spirtus (bunzen), kamera, *petridish* serta alat-alat lainnya.

1.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan rancangan teracak lengkap. Setiap perlakuan diulang tiga kali dan setiap ulangan terdiri dari tiga botol kultur yang masing – masing berisi dua eksplan. Perlakuan disusun secara faktorial dengan faktor pertamanya adalah berbagai konsentrasi Benzil adenine yaitu, 0,2 mg/l(B₁);

0,4 mg/l(B₂); 0,8 mg/l (B₃). Faktor keduanya adalah konsentrasi asam naftalenasetat yaitu, 0 (N₀); dan 0,1 mg/L (N₁). Data pada masing – masing perlakuan dihitung nilai tengahnya dan dianalisis ragam dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT).

1.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Penyiapan Eksplan

Eksplan pada percobaan ini adalah eksplan stek mikro satu buku yang berasal dari tunas mikro tanaman ubi kayu pada media yang sama. Tunas tersebut kemudian disterilisasikan dengan larutan sodium Hypochlorite 1% selama 10 menit dan dibilas dengan air steril 3 kali.

3.4.2 Penyiapan Media

Media yang digunakan adalah media MS. Dalam setiap pembuatan media, dibuat ¼ liter (250 ml) untuk 10 botol kultur. Pembuatannya dengan cara mencampurkan larutan stok, BA dan NAA sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan serta gula 7,5 g kemudian dilarutkan dengan aquades sampai 250 ml. Larutan dikondisikan pada pH 6,3 dengan menambahkan NaOH untuk menaikkan pH dan HCl untuk menurunkan pH. Larutan ditambah agar-agar 2 g, kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan hingga mendidih. Larutan dituangkan ke dalam botol kultur sebanyak 25 ml/botol, kemudian ditutup dengan plastik PP 0,3 mm dan diikat dengan karet. Media dimasukkan ke dalam *autoclave* untuk disterilisasi dengan tekanan 1,5 kg/cm² selama 45 menit. Botol-botol kultur berisi media selanjutnya disimpan pada rak-rak kultur.

3.4.3 Sterilisasi botol dan alat

Alat-alat yang harus disterilkan adalah botol kultur, petridish, *scalpel*, pinset, dan pisau pemes. Alat-alat tersebut dicuci sampai bersih lalu dikeringkan. Setelah kering, sterilisasi ke dalam *autoclave* pada tekanan 1,5 kg/cm² selama 45 menit.

3.4.4 Penanaman eksplan

Penanaman tunas dilakukan di dalam *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC). LAFC adalah tempat menanam eksplan dan subkultur dengan kondisi aseptik. Eksplan stek mikro satu buku ditanam tegak lurus terhadap media dan sepertiga bagian steknya ditanam di dalam agar. Selanjutnya tutup botol dibuka dengan hati-hati, kemudian dilakukan penanaman eksplan ke dalam botol kultur. Selama penanaman mulut botol selalu didekatkan dengan api bunsen. Setelah eksplan ditanam di botol, botol ditutup rapat menggunakan plastik pp.

1.5 Variabel pengamatan

Parameter yang diamati setelah minggu ke empat setelah penanaman eksplan adalah jumlah buku per tunas, jumlah daun segar, panjang tunas, dan peubah lainnya yang muncul setelah dilaksanakannya penelitian. Jumlah buku per tunas dan jumlah daun segar dihitung dengan cara mengamati langsung jumlah daun dan jumlah buku yang terdapat pada tunas. Untuk variabel panjang tunas diukur dengan cara mengeluarkan tanaman dari botol eksplan dan ditaruh di petridish kemudian diukur panjangnya menggunakan penggaris.