

3. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus – November 2017.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian meliputi timbangan analitik, pH meter, magnetik stirer, pengaduk, *autoclave*, shaker, gelas ukur, petridish, *scalpel*, pinset, pipet tetes, pipet hisab, spatula, gelas erlenmeyer, gunting, lampu Burnsen, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), microwave, cawan petri, rak kultur, beaker glass, handsprayer, penggaris, botol kultur, oven, karet gelang, plastik, tisu, pemanas, alat tulis dan kamera.

Kemudian untuk bahan yang digunakan meliputi eksplan tunas bawang dayak, komposisi media Murashige dan Skoog (MS), casein 0,08 g/l, zat pengatur tumbuh paclobutrazol, NAA dan BAP, tisu, alkohol 70 % dan 96 %, HCL 1 N, NaOH 1 N, clorox 15 %, agar 6,3 g, sukrosa 30 g, label kertas, aquades, fungisida (blanlate) 5 g/l, bakterisida (streptomycin) 5 g/l, detergen, dan spiritus.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana dengan 6 perlakuan dan 4 kali ulangan. Setiap perlakuan terdiri dari 6 botol kultur dengan jumlah 1 eksplan. Eksplan tunas bawang dayak dikulturkan pada media MS yang telah diberikan perlakuan kombinasi zat pengatur tumbuh NAA dan BAP. Botol disusun acak dan sampel diambil sebanyak 4 eksplan setiap perlakuan. Berikut merupakan kombinasi ZPT yang disajikan pada (Tabel 2).

Tabel 2. Kombinasi Perlakuan

Perlakuan	Kombinasi ZPT (ppm)
B0	Kontrol (tanpa ZPT)
B1	NAA 0,1 + BAP 0,5
B2	NAA 0,2 + BAP 1
B3	NAA 0,3 + BAP 1,5
B4	NAA 0,4 + BAP 2
B5	NAA 0,5 + BAP 2,5

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Kegiatan yang dilakukan di laboratorium yaitu mensterilkan botol tanam, pinset, petridish, gunting, pisau tajam, cawan petri dan scalpel. Alat-alat yang telah dicuci bersih dengan detergen, dimasukkan ke dalam autoklaf. Botol diletakkan dalam posisi terbalik dan alat-alat lain seperti petridish, pinset, dan scalpel dibungkus terlebih dulu dengan kertas hingga semua bagian tertutupi. Sterilisasi ini dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 atm selama 1 jam. Setelah satu jam alat dalam autoclave dibiarkan hingga dingin setelah itu dapat dikeluarkan dan dimasukkan ke dalam oven agar kering. Proses sterilisasi alat untuk menanam dapat dilakukan bersama dengan sterilisasi media dan sterilisasi akuades.

Laminair Air Flow (LAF) disemprot dengan alkohol 70% dan alat-alat yang dimasukkan ke dalam LAF juga harus disemprot dengan alkohol 70%. Ruang tanam disterilisasi dengan sinar UV selama 1 jam sebelum LAF digunakan. Ketika LAF digunakan maka sinar UV harus dimatikan dan blower dihidupkan.

3.4.2. Pembuatan Media MS

Media yang digunakan dalam penelitian yakni media MS yang dikombinasikan sesuai dengan perlakuan zat pengatur tumbuh NAA dan BAP dengan komposisi yang terlampir pada (Lampiran 2) dengan pH 5,8-6,0.

Media MS kemudian dicetak dalam botol kultur steril masing-masing dengan volume 25 ml. Kemudian disterilkan dalam autoklaf bersuhu 121°C 15 atm selama 1 jam. Media MS yang telah steril kemudian disimpan dalam ruang inkubasi selama 3 hari sebelum digunakan sebagai media perbanyakan.

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

Keterangan:

V1 = Volume larutan stok yang dicari

M1 = Dosis larutan stok yang tersedia

V2 = Volume media yang akan dibuat

M2 = Dosis media yang akan dibuat

3.4.3. Sterilisasi Eksplan

Eksplan adalah bagian kecil jaringan atau organ yang diambil atau dipisahkan dari tanaman induk kemudian dikulturkan. Sterilisasi eksplan dimulai dengan mengambil tunas dari tanaman bawang dayak, kemudian memotong daun pada tunas sehingga diperoleh tunas yang berukuran 2,5 cm, mencuci eksplan dengan detergen selama 5 menit dan dibilas dengan air mengalir. Merendam eksplan dalam larutan fungisida dengan konsentrasi 15 g/l selama 15 menit dengan cara dikocok kemudian dikocok kembali dengan larutan bayclean 15% selama 10 menit.

Setelah dikocok dengan bayclean, eksplan dimasukkan ke dalam Laminar Air Flow Cabinet (LAFC) yang sebelumnya disemprot dengan alkohol 70%. Bilas eksplan dengan aquades 3 kali masing-masing 1 menit. Eksplan yang akan digunakan dipotong-potong kemudian ditiriskan di atas tisu steril, setelah tiris eksplan siap untuk ditanam pada media.

3.4.4 Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan dilakukan di dalam LAF. Sebelum menggunakan LAF, blower dan lampu dinyalakan terlebih dahulu selama 15 menit. Sebelum melakukan penanaman, pinset, cawan petri dan scapel disterilkan dengan aquades 96%. Proses selanjutnya memotong eksplan tunas bawang dayak. Sebelum menanam eksplan, leher botol media disterilkan di atas lampu bunsen. Leher botol disterilkan di atas lampu bunsen kemudian eksplan ditanam dan botol ditutup dengan plastik tahan panas kemudian diikat dengan karet. Botol diberi keterangan yang terdiri dari perlakuan, ulangan dan tanggal inokulasi.

3.4.5 Pemeliharaan Kultur

Botol-botol kultur yang telah ditanam disimpan di rak-rak kultur, penyinaan dilakukan 16 jam setiap hari dengan menggunakan lampu TL 20 watt yang diletakkan pada masing-masing rak kultur dengan suhu ruangan 20 °C.

3.5 Pengamatan Penelitian

1. Saat Muncul Tunas

Eksplan diamati dari hari pertama terbentuk tunas, dengan kriteria telah muncul kuncup dari eksplan bawang dayak. Waktu muncul tunas ditentukan dalam hari setelah inokulasi (HSI).

2. Saat Muncul Akar

Eksplan diamati dari hari pertama terbentuk akar, dengan kriteria telah muncul tonjolan organ (calon akar). Waktu muncul akar ditentukan dalam hari setelah inokulasi (HSI)

3. Jumlah Tunas

Jumlah tunas dihitung dengan cara menghitung jumlah tunas yang tumbuh dari seluruh eksplan. Pengamatan jumlah tunas dilakukan pada pengamatan dari 28, 35, 42, 49, 56 HSI.

4. Jumlah Akar

Jumlah akar dihitung dengan menghitung jumlah akar yang terbentuk. Pengamatan jumlah akar dilakukan pada pengamatan dari 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 HSI.

5. Tinggi Explan

Tinggi eksplan diukur menggunakan penggaris. Pengamatan tinggi explan dilakukan pada pengamatan dari 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 HSI.

6. Jumlah Daun (helai)

Jumlah daun dihitung dengan cara menghitung jumlah daun yang terbentuk dari 1 eksplan yang telah membuka sempurna. Pengamatan jumlah daun dilakukan pada 28, 35, 42, 49, 56 HSI.

7. Persentase Eksplan Hidup

Jumlah eksplant yang tumbuh dan berkembang diamati secara visual, dengan kriteria eksplan berwarna hijau. Pengamatan dilakukan pada 7, 14, 21, 28, 30, 35, 42, 49, 56 HSI. Jumlah eksplan yang hidup dihitung jumlahnya kemudian dibagi total jumlah eksplan per perlakuan kemudian dikali 100 %.

3.6 Analisa Data

Data hasil jumlah akar, dan jumlah daun di transformasi menggunakan transformasi akar [$\sqrt{(x+0,5)}$]. Data hasil pengamatan yang diperoleh diuji dengan menggunakan analisis ragam (uji F) pada taraf 5% untuk mengetahui adanya pengaruh nyata antar perlakuan. Pengaruh nyata antar perlakuan ($F_{hitung} > F_{tabel}$ 5%) dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) taraf 5% untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.