

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat percobaan

Percobaan dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Benih Hortikultura Pasirbanteng, Jalan Raya Ir. Soekarno Km.23 Dusun Margamekar RT01 RW12 Desa Hegarmanah Kecamatan Jatingangor Kabupaten Sumedang. Pelaksanaan percobaan dilakukan pada tanggal 5 April 2021 sampai 7 Juni 2021.

3.2 Alat dan bahan

Peralatan yang digunakan dalam percobaan ini yaitu autoklaf, oven, *laminar air flow*, timbangan analitik, botol kultur, cawan petri, gelas beker, gelas ukur, erlenmeyer, pH meter, pinset, gunting, dan bunsen.

Bahan yang digunakan adalah planlet krisan aseptik dalam kultur *in vitro* yang terdapat di Balai Benih Hortikultura, larutan stok media MS, bubur pisang ambon lumut, alkohol 70 % dan 96 %, air steril, sukrosa dan agar-agar.

Daftar garam mineral bahan pembuatan larutan stok media MS dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.3 Metode percobaan

Percobaan ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima perlakuan takaran bubur pisang pada larutan 1 L media $\frac{1}{2}$ MS dan diulang lima kali sehingga terdapat 25 plot percobaan. Kelima perlakuan tersebut adalah :

A = Tanpa penambahan bubur pisang (kontrol)

B = Bubur pisang 25 g/L media $\frac{1}{2}$ MS

C = Bubur pisang 50 g/L media $\frac{1}{2}$ MS

D = Bubur pisang 75 g/L media $\frac{1}{2}$ MS

E = Bubur pisang 100 g/L media $\frac{1}{2}$ MS

Tata letak percobaan dapat dilihat dalam Lampiran 2.

Berdasarkan rancangan yang digunakan, maka analisis data dilakukan dengan metode kuantitatif.

Model linier untuk rancangan acak lengkap menurut Gomez dan Gomez (1995) adalah sebagai berikut : $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$

Keterangan :

Y_{ij} : Nilai pengamatan pada perlakuan ke-i dalam ulangan ke-j

μ : Nilai tengah umum

τ_i : Pengaruh perlakuan ke-i

ϵ_{ij} : Galat percobaan perlakuan ke-i ulangan ke-j

Berdasarkan metode linear, data kuantitatif dianalisis dengan menggunakan analisis ragam/anova Tabel 1.

Tabel 1. Daftar Sidik Ragam (Anova)

SK	db	JK	KT	Fhit	Ftabel 5%
Perlakuan	4	$(\sum y_{ij})^2 / r - FK$	JKP/dbp	KTP/KTG	2, 87
Galat	20	JKT-JKP	JKG/dbg		
Total	24	$\sum (y_{ij})^2 - FK$			

Sumber : (Gomez dan Gomez, 1995)

Kesimpulan hasil analisis uji F sebagaimana pada Tabel 2

Tabel 2. Kaidah Pengambilan Keputusan

Hasil Analisa	Kesimpulan Analisa	Keterangan
$F_{hit} \leq F_{0,05}$	Berbeda tidak nyata	Tidak ada perbedaan pengaruh antara perlakuan
$F_{hit} > F_{0,05}$	Berbeda nyata	Ada perbedaan pengaruh antara perlakuan

Apabila hasil Uji F berbeda nyata maka akan dilanjutkan dengan uji Jarak Berganda Duncan pada taraf kesalahan 5% dengan rumus sebagai berikut :

$$LSR = SSR(\alpha_{0,05} \cdot db \cdot p) \cdot S\bar{x}$$

Keterangan :

LSR : *Least Significant Range*

SSR : *Sigificant Studentized Range*

$S\bar{x}$: Simpangan baku rata-rata perlakuan

Untuk mencari $S\bar{x}$ dengan rumus sebagai berikut :

$$S\bar{x} = \sqrt{\frac{KT_{galat}}{r}}$$

Keterangan :

KTg : Kuadrat tengah galat

r : Banyak ulangan

3.4 Prosedur percobaan

3.4.1 Sterilisasi alat

Sterilisasi alat dilakukan terhadap botol kultur, pinset, cawan petri, gunting dan kertas saring. Sterilisasi botol kultur dilakukan dalam 3 tahapan, tahap pertama botol kultur dicuci menggunakan sabun dengan air mengalir. Tahap kedua botol kultur disterilisasi menggunakan autoklaf selama 60 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 14,5 psi. Tahap ketiga botol kultur dioven selama 60 menit dengan suhu 121°C. Sterilisasi pinset, cawan petri dan gunting dilakukan dalam 2 tahapan, tahap pertama dicuci menggunakan sabun dengan air mengalir. Tahap kedua dibungkus dengan kertas bersih dan dioven selama 60 menit dengan suhu 121°C. Sedangkan untuk kertas saring hanya dioven saja dengan cara disimpan di dalam cawan petri.

3.4.2 Pembuatan media

Adapun pembuatan media campuran bubur pisang ambon dengan $\frac{1}{2}$ MS adalah sebagai berikut. Menghaluskan pisang ambon dengan menggunakan *blender* tanpa ada penambahan air. Kemudian, memasukkan larutan stok MS dengan setengah takaran dari stok A sampai H (Lampiran 1) ke dalam gelas beker. Selanjutnya, menambahkan air steril hingga volume yang dibutuhkan. Lalu, menambahkan gula, agar-agar dan bubur pisang sesuai dengan takaran (Lampiran 5). Setelah campuran dibuat, selanjutnya mengukur pH menggunakan pH meter. pH yang dibutuhkan media yaitu antara pH 5,8 sampai 6,4 jika pH kurang dari 5,8 maka tambahkan larutan NaOH dan bila pH diatas 6,4 maka tambahkan larutan HCl. Penambahan NaOH atau HCl diberikan sedikit demi sedikit hingga mencapai pH yang diinginkan.

Tahapan selanjutnya adalah masak media diatas kompor sambil diaduk hingga mendidih lalu media dimasukkan ke dalam botol-botol kultur, untuk

pembuatan media 1 L dapat dibagi menjadi 50 botol kultur dengan setiap botol berisi ± 20 ml. Botol yang telah diisi media segera ditutup dengan plastik bening kemudian diikat dengan karet dan disterilisasi dalam autoklaf selama ± 90 menit pada suhu 121°C dan tekanan 14,5 psi. Setelah sterilisasi berakhir media dikeluarkan dari autoklaf, lalu disimpan dalam ruang inkubasi.

3.4.3 Penanaman eksplan

Penanaman eksplan dilakukan di dalam LAF (Laminar Air Flow) yang telah disterilisasi dengan sinar UV selama 60 menit. Penanaman dimulai dengan melakukan sterilisasi pinset, cawan petri dan gunting dalam LAF dengan cara sebagai berikut. Sterilisasi cawan petri yaitu dengan cara menyemprot seluruh bagian cawan petri dengan alkohol 70% kemudian dilewatkan di atas api hingga kering. Sterilisasi pinset dan gunting dilakukan dengan cara dicelupkan ke dalam alkohol 70% kemudian dilewatkan di atas api. Selanjutnya eksplan diletakkan di dalam cawan petri yang telah dialasi oleh kertas saring kemudian dipotong pada bagian batang pada setiap buku dengan ukuran sekitar 1 sampai 2 cm lalu ditanam pada media perlakuan. Setiap botol berisi 1 eksplan. Botol yang telah berisi eksplan ditutup rapat menggunakan plastik *wrap* lalu plastik bening dan diikat dengan karet. Botol-botol kultur tersebut kemudian diletakkan pada rak kultur dalam ruang inkubasi.

3.4.4 Pemeliharaan

1) Lingkungan/ruang inkubasi

Setelah eksplan ditanam, botol eksplan ditempatkan di ruang inkubasi pada rak bersusun dengan pencahayaan lampu neon 36 W pada ketinggian 50 cm dengan kondisi ruangan ber AC dengan suhu sekitar 20 sampai 25°C . Pencahayaan mutlak diperlukan sebagai substitusi cahaya matahari untuk fotosintesis dan pemberian hari panjang selama 16 jam penyinaran.

2) Sterilisasi ruang inkubasi

Sterilisasi ruang inkubasi yang dilakukan meliputi pembersihan rak, dan lantai dengan menggunakan *vaccum* serta mengepel lantai dan membersihkan kaca. Menyesuaikan suhu, kelembaban dan pencahayaan yang telah diatur sesuai

kebutuhan tanaman. Merapikan dan menata botol-botol hasil subkultur pada rak yang telah dikelompokkan berdasarkan varietas tanamannya masing-masing. Membawa hasil subkultur yang terkontaminasi keluar ruangan inkubasi.

3) Memeriksa hasil subkultur

Pengamatan hasil subkultur dilakukan setiap 3 hari sekali. Pengamatan dilakukan terhadap kondisi subkultur. Planlet yang mengalami kontaminasi oleh jamur maupun bakteri baik pada media tanam, planlet, dan menempel pada botol kultur segera dipisahkan dari subkultur yang sehat.

3.5 Parameter pengamatan

3.5.1 Pengamatan penunjang

Pengamatan penunjang adalah pengamatan yang dilakukan terhadap parameter yang datanya tidak diuji secara statistik untuk mengetahui kemungkinan pengaruh lain dari luar perlakuan. Parameter-parameter tersebut sebagai berikut :

1) Persentase planlet hidup

Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati dan menghitung jumlah planlet yang hidup pada setiap perlakuan. Planlet yang hidup ditandai dengan pertumbuhan yang terus berlanjut, tidak mengalami kontaminasi dan *browning*. Presentase planlet hidup dihitung diakhir pengamatan pada umur 56 Hari Setelah Tanam (HST) menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Planlet hidup (\%)} = \frac{\text{jumlah planlet hidup}}{\text{jumlah seluruh planlet setiap perlakuan}} \times 100\%$$

2) Persentase kontaminasi

Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati dan menghitung jumlah botol yang terkontaminasi oleh jamur, bakteri maupun keduanya pada setiap perlakuan. Kontaminasi pada botol diamati setiap hari dan dihitung persentasenya setelah selesai pengamatan. Persentase kontaminasi dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kontaminasi (\%)} = \frac{\text{jumlah botol terkontaminasi}}{\text{jumlah seluruh botol setiap perlakuan}} \times 100\%$$

3) Persentase *browning* (%)

Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati dan menghitung jumlah planlet yang menjadi kecoklatan (*browning*). Planlet yang mengalami *browning* diamati setiap hari dan dihitung persentasenya setelah selesai pengamatan. Persentase *browning* dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Browning (\%)} = \frac{\text{jumlah planlet } \textit{browning}}{\text{jumlah seluruh planlet setiap perlakuan}} \times 100\%$$

3.5.2 Pengamatan utama

Pengamatan utama adalah pengamatan yang datanya diuji secara statistik. Pengamatan utama dilakukan terhadap parameter-parameter sebagai berikut :

1) Waktu muncul tunas

Waktu muncul tunas diamati dengan cara mengamati waktu pertama kali muncul tunas dari eksplan yang ditanam. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai tunas pertama muncul pada setiap perlakuan.

2) Jumlah daun

Jumlah daun diamati dengan cara menghitung daun dalam botol kultur pada setiap tanaman yang hidup. Daun dihitung ketika planlet krisan sudah membentuk daun sempurna. Pengamatan jumlah daun dilakukan diakhir pengamatan yaitu pada umur 56 HST.

3) Tinggi planlet

Tinggi planlet diamati dengan cara mengukur tinggi planlet pada setiap tanaman yang hidup. Pengukuran dilakukan mulai dari pangkal batang sampai ujung daun dengan menggunakan penggaris. Pengamatan tinggi planlet dilakukan diakhir pengamatan yaitu pada umur 56 HST.

4) Jumlah akar

Jumlah akar dihitung terhadap jumlah total akar yang terdapat pada setiap planlet yang hidup. Pengamatan jumlah akar dilakukan diakhir pengamatan yaitu pada umur 56 HST