

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Percobaan**

Percobaan penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Tasikmalaya. Kegiatan penelitian dilaksanakan dari bulan Agustus 2021 sampai dengan bulan November 2021.

#### **3.2 Alat dan Bahan Percobaan**

Alat yang digunakan dalam percobaan ini adalah: botol kultur, *cutter*, pulpen, buku tulis, baki/ nampan, alat autoklaf, kompor gas, tabung gas, tabung erlemeyer, alat kultur (pinset dan *scapel*), *Laminar Air Flow* (LAF), *shaker*, timbangan digital, mikropipet, gelas ukur, *Hot Plate Magnetic Stirrer*, seperangkat alat pembakar, *evaporator rotary*, blender, kertas saring dan penggaris.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: tanaman pisang cavendish,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , KI,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , *Nicotinic acid*, *Pyroxidine-HCl*, *Thiamin-HCl*, *Glycine*, agar (Swallow), MYO-Inositol, sukrosa, aquades, air steril, spirtus, alkohol 70%, alkohol 96%, etanol 70%, detergen (Rinso cair), NaOCl (Bayclin), fungisida (Antrachol), bakterisida (Agrept), plastik tahan panas, karet gelang, label, tisu, sarung tangan, buah jambu batu (ekstrak jambu batu) dan hormon BAP (*Benzyl Amino Purin*).

#### **3.3 Metode Penelitian**

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan rancangan percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang berpola faktorial 4 x 3 dengan 3 ulangan.

Faktor pertama (faktor J) adalah konsentrasi ekstrak jambu batu (*Psidium guajava*) yang ditambahkan ke dalam media, terdiri dari 4 taraf yaitu:

j0 = Ekstrak jambu batu 0 g/L

j1 = Ekstrak jambu batu 1 g/L

j2 = Ekstrak jambu batu 2 g/L

j3 = Ekstrak jambu batu 3 g/L

Faktor kedua (faktor B) adalah konsentrasi hormon BAP (*Benzyl Amino Purine*) yang ditambahkan ke dalam media, terdiri dari 3 taraf:

b1 = BAP 3 ppm

b2 = BAP 6 ppm

b3 = BAP 9 ppm

Dengan demikian percobaan ini terdiri dari 12 perlakuan dan diulang sebanyak 3 kali. Satu ulangan terdapat 2 botol kultur sehingga terdiri dari 72 unit (botol) percobaan. Pada masa inisiasi, 1 botol berisi 1 eksplan sehingga terdiri dari 72 eksplan. Sedangkan pada masa subkultur 1 botol berisi 2 eksplan sehingga terdiri dari 144 eksplan. Kombinasi perlakuan antara konsentrasi ekstrak jambu batu (*Psidium guajava*) dan BAP (*Benzyl Amino Purine*) tercantum pada Tabel 1. Tabel 1. Perlakuan antara konsentrasi ekstrak jambu batu (*Psidium guajava*) dan BAP (*Benzyl Amino Purine*)

Faktor J (Konsentrasi Ekstrak Jambu Batu)	Faktor B (Konsentrasi BAP)		
	b1 (3 ppm)	b2 (6 ppm)	b3 (9 ppm)
j0 (0 g/l)	j0b1	j0b2	j0b3
j1 (1 g/l)	j1b1	j1b2	j1b3
j2 (2 g/l)	j2b1	j2b2	j2b3
j3 (3 g/l)	j3b1	j3b2	j3b3

### 3.4 Analisis Data

Faktor J terdiri atas 4 faktor sedangkan Faktor B terdiri atas 3 faktor, sehingga analisis data Faktorial dengan rancangan dasar RAL Faktorial (4 x 3). Persamaan matematis sebagai berikut:

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

Keterangan:

$Y_{ijk}$  = nilai pengamatan yang memperoleh perlakuan taraf ke-i, dari faktor J, taraf ke-j dari faktor B, dan ulangan ke-k

$\mu$	=	nilai tengah umum
$\alpha_i$	=	pengaruh taraf ke-i dari faktor J
$\beta_j$	=	pengaruh taraf ke-j dari faktor B
$(\alpha\beta)_{ij}$	=	pengaruh interaksi dari taraf ke-i dan taraf ke-j
$\epsilon_{ijk}$	=	pengaruh galat pada satuan percobaan yang memperoleh perlakuan taraf ke-i, taraf ke-j, dan ulangan ke-k

Berdasarkan model linear tersebut, disusun ke dalam tabel sidik ragam sebagai berikut:

Tabel 2. Daftar sidik ragam

Sidik Ragam	Derajat bebas (Db)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F hit	F tab 5%
Faktor J	$(j - 1)$	JKJ	JK J / Db J	KT J / KT G	3,01
Faktor B	$(b - 1)$	JKB	JK B / Db B	KT B / KT G	3,40
Interaksi (J x B)	$(j - 1)(b - 1)$	JKJB	JK JB / Db JB	KT JB / KT G	2,51
Galat Total	$jb (r - 1)$ $(jbr - 1)$	JKG JKT	JK G / Db G		

Keterangan:

$$FK = \frac{\text{Total}^2}{j.b.r}$$

$$JKJ = \left( \frac{\sum J^2}{r.b} - FK \right)$$

$$JKB = \left( \frac{\sum B^2}{r.j} - FK \right)$$

$$JKJB = \left( \frac{\sum JB^2}{r} - FK - JKA - JKB \right)$$

$$JKG = JKT - JKJ - JKB - JKJB$$

$$JKT = \sum X_{IJ}^2 - FK$$

Kaidah pengambilan keputusan dengan sidik ragam tercantum pada tabel 3 berikut ini.

Tabel 3. Kaidah pengambilan keputusan

Hasil Analisa	Kesimpulan Analisa	Keterangan
$F_{hit} \leq F_{0,05}$	Tidak Berbeda Nyata	Tidak Ada Perbedaan Pengaruh Antara Perlakuan
$F_{hit} > F_{0,05}$	Berbeda Nyata	Ada Perbedaan Pengaruh Antara perlakuan

Jika hasil uji F berbeda nyata, maka analisis akan dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf nyata 5%.

dengan rumus sebagai berikut:

$$LSR_{5\%} = SSR_{\alpha 5\%.dbg} \cdot S_x$$

Keterangan:

LSR = *Least Significant Range*

SSR = *Significant Studentized Range*

$\alpha$  = Taraf Kesalahan

dbg = derajat bebas galat

$S_x^-$  = galat baku rata-rata

Simpangan baku rata-rata dibagi menjadi tiga kasus yaitu:

1. Untuk faktor J ditentukan dengan rumus:  $S_{x^-}J = \sqrt{\frac{KTG}{r.b}}$
2. Untuk faktor B ditentukan dengan rumus:  $S_{x^-}B = \sqrt{\frac{KTG}{r.j}}$
3. Untuk interaksi ditentukan dengan rumus:  $S_{x^-}JB = \sqrt{\frac{KTG}{r}}$

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Sterilisasi alat

Alat yang akan digunakan sebelumnya dicuci menggunakan sabun dengan air mengalir kemudian dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit.

#### 3.5.2 Pembuatan larutan stok

Untuk memudahkan dan menghindari penimbangan yang berulang-ulang dalam pembuatan media maka dibuat larutan stok. Cara membuat larutan stok hara, MYO-Inositol, vitamin dan hormon BAP yaitu sebagai berikut:

##### a. Pembuatan larutan stok hara

Stok hara terdiri dari stok hara makro ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $NH_4 \cdot NO_3$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) dan stok hara mikro ( $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ,  $H_3BO_3$ ,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 4H_2O$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ,  $KI$ ,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ). Larutan stok hara (A sampai F) masing-masing dibuat sebanyak 1 L (tabel 4). Larutan stok hara dibuat dengan

cara menimbang bahan stok hara sesuai dengan jumlah yang telah dihitung (tabel 4). Kemudian melarutkan masing-masing bahan ke dalam 300 mL air steril dan mengaduknya sampai tercampur rata. Setelah itu, menetapkan volume sampai sampai 1 L dengan menambahkan air steril. Selanjutnya, memasukkan larutan stok A sampai F ke dalam botol coklat. Khusus untuk larutan stok F, botol coklat di tutup dengan aluminium foil. Setelah itu, menyimpan semua larutan di dalam lemari pendingin.

b. Pembuatan larutan stok MYO-Inositol dan vitamin

Larutan stok MYO-Inositol dan vitamin dibuat dengan cara menimbang bahan sesuai dengan jumlah yang telah dihitung (Tabel 4). Kemudian melarutkan masing-masing bahan ke dalam 50 mL air steril dan mengaduknya sampai tercampur rata. Setelah itu, menetapkan volume sampai sampai 100 mL dengan menambahkan air steril. Selanjutnya, memasukkan larutan stok MYO-Inositol dan vitamin ke dalam botol coklat. Setelah itu, menyimpan semua larutan di dalam lemari pendingin.

Tabel 4. Konsentrasi larutan stok untuk media MS 1 L

Kode Botol	Nama Senyawa	Berat (g) yang ditimbang	Konsentrasi dalam media MS (mg/L)	Volume (mL) larutan stok
A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82,5 g	1650	20 mL
B	KNO <sub>3</sub>	95 g	1900	20 mL
C	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	39 g	195	5 mL
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,240 g	6,2	
	KI	0,166 g	0,83	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,05 g	0,25	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,005 g	0,025	
D	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	88 g	440	5 mL
E	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	74 g	370	5 mL
	MnSO <sub>4</sub>	4,46 g	22,3	
	ZnSO <sub>4</sub>	1,72 g	8,6	
	CuSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,005 g	0,025	
F	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	3,75 g	37,3	10 mL
	FeSO <sub>4</sub>	2,78 g	27,8	
Vitamin	Nicotinic acid	0,05 g	0,5	10 mL
	Pyridoxine-HCl	0,05 g	0,5	
	Thiamine-HCl	0,01 g	0,1	
	Glycine	0,2 g	2	
Myo-Inositol	Myo-Inositol	10 g	100	10 L

c. Pembuatan larutan stok hormon BAP

Membuat larutan stok hormon BAP dalam konsentrasi 1000 ppm sebanyak 100 mL. Kemudian menimbang hormon BAP sebanyak 0,1 gram. Setelah itu, melarutkan bahan hormon BAP dengan asam kuat yaitu HCl 1 N. Setelah itu, menambahkan air steril hingga volume 100 mL. Menyimpan larutan stok hormon BAP dalam botol coklat dan menyimpan dalam lemari pendingin.

### 3.5.3 Pembuatan ekstrak buah jambu batu

Pembuatan ekstrak buah jambu batu menggunakan metode maserasi. Metode maserasi berfungsi untuk penyaringan simplisia atau serbuk yang mengandung zat aktif atau senyawa metabolit yang mudah larut dalam cairan pelarut (Ningsih, Zufahair dan Purwati, 2015). Langkah-langkah dalam membuat ekstrak buah jambu batu adalah sebagai berikut:

a. Pembuatan simplisia

Buah jambu batu yang akan menjadi bahan ekstrak disortasi dari pengotor. Buah jambu batu yang digunakan adalah buah yang matang, ditandai dengan kulit buah berwarna kuning kehijauan. Kemudian mencuci jambu batu di air mengalir hingga bersih, setelah itu memotong buah jambu batu mengeringkannya dengan cara mengoven selama 2 hari (sampai daging jambu kering). Kemudian menghaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk simplisia.

b. Pembuatan ekstrak daging buah jambu batu

Memaserasi serbuk simplisia daging buah jambu batu sebanyak 50 g dengan pelarut ethanol 70% sebanyak 750 ml selama 3 hari, setiap hari melakukan pengadukan sebanyak 2 kali. Menyaring hasil maserasi dengan kertas saring. Selanjutnya, memekatkan filtrat di atas *evaporator rotary* dengan suhu 40°C - 60°C sampai diperoleh ekstrak kental, dari ekstrak kental ini dipakai sesuai konsentrasi masing-masing perlakuan.

### 3.5.4 Pembuatan media Murashige dan Skoog (MS)

Melakukan pembuatan media MS dengan cara memasukkan sukrosa (Lampiran 6) ke dalam erlenmeyer, lalu menambahkan larutan stok hara makro, mikro, stok MYO-Inositol, stok vitamin, stok hormon BAP (Lampiran 5) dan ekstrak jambu batu (Lampiran 4). Kemudian menambahkan air steril sampai 150

mL. Selanjutnya mengukur pH media diatur dengan kisaran 5,8. Jika media basa manambahkan HCl dan jika media asam manambahkan NaOH. Setelah itu, manambahkan 5 g/L agar-agar (Swallow) dan mengaduk-aduk sampai tercampur homogen. Setelah itu, memanaskan larutan media sambil mengaduk-aduk sampai mendidih. Selanjutnya memasukkan media yang telah mendidih ke dalam botol kultur dengan volume masing-masing 25 ml dan diberi label sesuai perlakuan. Setelah itu, mensterilisasi media menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit (Saputri *et al.*, 2015).

#### 3.5.5 Sterilisasi eksplan pisang cavendish

Anakan pisang cavendish yang dijadikan sebagai eksplan berukuran 15 – 50 cm, didapat dari indukan yang telah berbuah. Kemudian memotong anakan pisang sampai ukuran 5 cm kemudian mengupas dan membuka seludangnya hingga ke lapisan yang paling dalam. Setelah itu, membersihkan anakan pisang dengan cara mencuci di air mengalir. Selanjutnya merendam eksplan selama 20 menit dalam air steril 100 mL yang ditambahkan 5 tetes detergen cair (Rinso cair), lalu membilasnya 3 kali dengan air steril. Setelah itu, merendam eksplan dalam larutan fungisida (Benlate) dan bakterisida (Agrept) 0,2 g/100 mL selama 1 jam, lalu membilasnya 3 kali dengan air steril. Kemudian merendam eksplan dalam campuran larutan asam sitrat 150 mg/L dan asam askorbat 100 mg/L selama 1 jam, lalu membilasnya 3 kali dengan air steril.

Tahapan sterilisasi selanjutnya dilakukan di dalam *laminar air flow* (LAF) dengan cara merendam eksplan dalam larutan NaOCl (Bayclin) 20% selama 20 menit, lalu membilasnya 3 kali dengan air steril. Selanjutnya, merendam eksplan dalam larutan NaOCl (Bayclin) 15% selama 10 menit, lalu membilasnya 3 kali dengan air steril. Langkah terakhir, merendam eksplan dalam larutan alkohol 70% selama 1 menit (tidak dibilas), lalu menanam eksplan di dalam media sesuai perlakuan.

#### 3.5.6 Penanaman eksplan

Melakukan penanaman eksplan pisang dengan cara mengupas eksplan pisang yang telah steril menggunakan *scalpel*. Kemudian menanam eksplan pada media MS sesuai masing-masing perlakuan. Selanjutnya, menutup botol kultur

dengan penutup botol lalu melapisinya dengan plastik wrap. Setelah itu, memberi label botol yang berisi eksplan pada masing-masing botol sesuai dengan perlakuannya, kemudian menyimpannya di rak kultur di ruang inkubasi.

#### 3.5.7 Subkultur eksplan

Melakukan subkultur eksplan dengan cara memindahkan eksplan hasil inisiasi (berumur 4 minggu setelah tanam) ke dalam media yang baru. Selanjutnya memotong eksplan hasil inisiasi menjadi 2 bagian menggunakan *scalpel* di atas cawan petri. Selanjutnya, menutup botol kultur dengan penutup botol lalu melapisinya dengan plastik wrap. Setelah itu, memberi label botol yang berisi eksplan pada masing-masing botol sesuai dengan perlakuannya, kemudian menyimpannya di rak kultur di ruang inkubasi.

#### 3.5.8 Pengamatan dan pemeliharaan

Melakukan pengamatan pada eksplan pisang cavendish secara *in vitro* dengan 2 masa pengamatan, yaitu masa inisiasi dan masa subkultur. Pada masa inisiasi, melakukan pengamatan selama 4 minggu setelah tanam (MST). Sedangkan pada masa subkultur, melakukan pengamatan pada 2 MSS 4 MSS, 6 MSS dan 8 MSS (minggu setelah subkultur).

Melakukan pemeliharaan dengan menjaga lingkungan sekitar media eksplan pisang cavendish. Suhu yang dikehendaki adalah 21°C – 24°C. Melakukan pemeliharaan dengan mengeluarkan eksplan yang terkontaminasi dari ruang kultur serta menyemprot botol kultur yang berada di ruang kultur dengan alkohol 70% untuk mencegah dan menekan kontaminasi.

### 3.6 Paramater pengamatan

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap pertumbuhan eksplan pisang cavendish (*Musa acuminata*) secara *in vitro* maka dilakukan pengamatan selama 4 minggu masa inisiasi dan 8 minggu masa subkultur. Pengaruh parameter-parameter sebagai berikut:

#### 3.6.1 Parameter penunjang

Parameter penunjang adalah adalah pengamatan terhadap parameter yang datanya tidak diuji secara statistik. Parameter penunjang yang diamati:

a. Persentase eksplan berkalus

Pengamatan persentase eksplan berkalus dengan cara menghitung eksplan yang mengalami berkalus pada setiap botol kultur saat masa inisiasi dan subkultur.

b. Persentase eksplan *blackening*

Pengamatan persentase eksplan *blackening* dengan cara menghitung eksplan yang mengalami *blackening* pada setiap botol kultur saat masa inisiasi dan subkultur. Indikator eksplan *blackening* adalah *blackening* yang menyebar ke media dan *blackening* seluruh eksplan.

### 3.6.2 Parameter utama

Parameter utama adalah pengamatan terhadap parameter yang datanya diuji secara statistik. Parameter utama yang diamati adalah:

a. Waktu muncul tunas

Tunas adventif letak tumbuhnya pada bagian bonggol. Pengamatan waktu muncul tunas dilakukan dari dalam botol kultur. Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati setiap hari pada hari ke berapa setelah disubkultur tunas baru (adventif) pada eksplan terbentuk.

b. Jumlah tunas per eksplan

Pengamatan jumlah tunas dengan cara menghitung jumlah tunas adventif yang terbentuk dari setiap eksplan. Pada masa subkultur jumlah tunas diamati pada 2 MSS, 4 MSS, 6 MSS dan 8 MSS (minggu setelah subkultur).

c. Jumlah daun (helai)

Pengamatan jumlah daun dengan cara menghitung daun yang terbentuk sempurna pada setiap tunas adventif. Pada masa subkultur jumlah tunas diamati pada 2 MSS, 4 MSS, 6 MSS dan 8 MSS (minggu setelah subkultur).

d. Pertambahan tinggi tunas (cm)

Pengamatan pertambahan tinggi tunas dengan cara mengukur mulai pangkal batang sampai pucuk menggunakan aplikasi *ImageJ*. Pada masa subkultur jumlah tunas diamati pada 2 MSS, 4 MSS, 6 MSS dan 8 MSS (minggu setelah subkultur).