

BAB 3

PROSEDUR PENELITIAN

3.1 Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksperimen sesungguhnya (*true experimental methods*). Dikatakan *true experimental* karena dalam desain ini penelitian dapat mengontrol semua variabel luar yang mempengaruhi jalannya eksperimen. Sejalan dengan hal tersebut, pada penelitian ini diketahui bahwa terdapat kelompok kontrol yaitu media utama (media *murashige and skoog*/ MS tanpa penambahan hormon BAP) dan media kelompok eksperimen yaitu media perlakuan (media *murashige and skoog*/ MS ditambahkan dengan berbagai konsentrasi BAP yang terdiri dari beberapa perlakuan yang berbeda).

3.2 Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini menggunakan dua variabel yaitu:

3.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah BAP yang ditambahkan ke dalam media *Murashige and Skoog* dengan konsentrasi yang berbeda.

Tabel 3.1 Variasi Perlakuan pada Percobaan

No	Media	Konsentrasi BAP
1	Perlakuan A	Media kontrol/ tanpa pemberian BAP
2	Perlakuan B	0,5 ppm
3	Perlakuan C	1 ppm
4	Perlakuan D	1,5 ppm
5.	Perlakuan E	2 ppm

3.2.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah pertumbuhan tunas aksilar kentang (*Solanum tuberosum* L.) dengan parameter pertumbuhannya yaitu jumlah tunas, jumlah daun, jumlah akar, dan tinggi planlet.

3.2.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah suhu ruangan inkubasi, dengan suhu ruangan *air conditions* (AC) 16°C.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah *planlet* kentang hasil kultur *in vitro* yang diambil di Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Jenderal Soedirman. Dalam botol tersebut terdapat 50 *planlet* kentang granola yang berumur ± 3 bulan.



Gambar 3.1 Populasi Planlet Kentang
Sumber: Dokumentasi Pribadi

3.3.2 Sampel

Pemilihan sampel dalam penelitian ini berdasarkan teknik simpel random sederhana (*simple random sampling*). Sampel yang digunakan sebanyak 25 *planlet* yang berumur ± 3 bulan sebelum di subkultur dengan tinggi $\pm 2-3$ cm.



Gambar 3.2 Sampel Planlet Kentang
Sumber: Dokumentasi Pribadi

3.4 Desain Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap). Sebagai suatu patokan, jumlah ulangan dianggap telah cukup baik bila memenuhi persamaan $(t - 1)(r - 1) \geq 15$, dengan t = jumlah perlakuan dan r = jumlah ulangan (Hernawan, 2018) Dimana :

$$\begin{aligned}(t - 1)(r - 1) &\geq 15 \\(5 - 1)(r - 1) &\geq 15 \\(4)(r - 1) &\geq 15 \\4r - 4 &\geq 15 \\4r &\geq 19 \\r &= 4,75 = 5\end{aligned}$$

Berdasarkan rumus tersebut, dari 5 perlakuan didapatkan 5 kali ulangan dengan demikian jumlah total unit percobaan sebanyak 25 unit percobaan.

3.5 Langkah-langkah Penelitian

Tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini secara umum terbagi menjadi dua tahap yaitu tahap persiapan dan tahap pelaksanaan.

3.5.1 Tahap persiapan, meliputi:

- 1) Mendapatkan Surat Keputusan Dekan Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Siliwangi mengenai penetapan bimbingan skripsi pada tanggal 26 November 2020;
- 2) Mempersiapkan judul dan konsultasi permasalahan yang akan diteliti dengan pembimbing I dan pembimbing II pada tanggal 10 Desember 2020;
- 3) Mengajukan judul ke DBS (Dewan Bimbingan Skripsi) pada tanggal 15 Desember 2020;
- 4) Menyusun proposal penelitian dengan bimbingan pembimbing I dan pembimbing II pada tanggal 16 Desember 2020;
- 5) Mengajukan permohonan seminar proposal penelitian ke DBS (Dewan Bimbingan Skripsi) pada tanggal 2 Februari 2021;
- 6) Melaksanakan seminar proposal penelitian dan mendapat saran serta masukan mengenai proposal penelitian pada tanggal 25 Februari 2021;
- 7) Mengkonsultasikan proposal penelitian dengan pembimbing I dan pembimbing II untuk memperbaiki proposal penelitian 1 Maret 2021;

- 8) Melaksanakan proses penelitian selama ± 2 bulan dari mulai tanggal 17 Maret 2021-10 Mei 2021;
- 9) Mengolah data, menyusun pembahasan skripsi, dan bimbingan pembimbing I dan pembimbing II pada tanggal 17 Mei 2021;
- 10) Penyusunan dan bimbingan skripsi pada tanggal 7 Juni 2021;
- 11) Seminar hasil pada tanggal 6 Juli 2021;
- 12) Sidang skripsi pada tanggal 13 Juli 2021.

3.5.2 Tahap pelaksanaan, meliputi:

3.5.2.1 Tahap persiapan alat

Dalam penelitian ini terdapat beberapa alat yang digunakan diantaranya:

Tabel 3.2 Alat-alat penelitian

No	Nama Alat	Jumlah	Fungsi
1.	Botol kultur	25	Untuk tempat planlet tumbuh selama proses subkultur berlangsung
2.	Cawan petri	2	Untuk penyimpanan sementara planlet ketika dikeluarkan dari media tanam yang lama dan dipindahkan ke dalam media tanam yang baru
2.	Gelas kimia 1000 ml	1	Untuk menghomogenkan media <i>murashige and skoog</i> (MS)
3.	Gelas kimia 250 ml	5	Untuk penyimpanan media tanam perlakuan
4.	Erlenmeyer 500 ml	5	Untuk penyimpanan larutan stock
6.	Pinset	2	Untuk memindahkan planlet
7.	Tangkai <i>scapel</i> dan mata pisau <i>scapel</i>	2	Untuk memisahkan planlet yang saling menempel
8.	Bunsen	2	Untuk sterilisasi pinset dan <i>scapel</i> ketika proses subkultur
9.	<i>Autoclave</i>	1	Untuk sterilisasi alat dan media

10.	Kompor Gas	1	Untuk memanaskan <i>autoclave</i>
11.	<i>Hot Plate</i>	1	Untuk memanaskan dan menghomogenkan media
12.	Pengukur Ph	5	Untuk mengukur pH media
13.	Batang Pengaduk	5	Untuk mengaduk media
14.	Alumunium Foil	1	Untuk melapisi botol kultur
15.	Plastik <i>Wrapping</i>	1	Untuk melapisi alumunium foil
16.	Kertas Payung	2	Untuk melapisi alat ketika akan disterilisasi
17.	Kertas Label	1	Untuk memberi nama setiap perlakuan pada botol kultur
18.	Karet	60	Untuk mengikat alumunium
19.	Laminar Air Flow (LAF)	1	Tempat steril untuk pelaksanaan subkultur
20.	Penggaris	1	Untuk mengukur tinggi tanaman

3.5.2.2 Tahap persiapan bahan

Dalam penelitian ini terdapat beberapa bahan yang digunakan yaitu:

Tabel 3.3 Bahan-bahan penelitian

No	Nama bahan	Sumber bahan	Keterangan
1.	Planlet kentang	Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Soedirman	Dibutuhkan 25 <i>planlet</i> kentang granola
2.	Media <i>Murashige and Skoog</i> (MS)	Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Siliwangi	Dibutuhkan sebanyak 4,43 g/L
3.	BAP (<i>6-Benzyl Amino Purine</i>)	Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Siliwangi	Dibutuhkan sebanyak 5 ppm BAP

4.	Larutan HCL	Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Siliwangi	Dibutuhkan sebanyak 1 M
5.	Larutan NaOH	Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Siliwangi	Dibutuhkan sebanyak 1 M
6.	Agar	Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Siliwangi	Dibutuhkan sebanyak 8 g/l (1,6 g/l untuk satu media kontrol, 6,4 g/l untuk empat media perlakuan)
7.	Sukrosa	Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Siliwangi	Dibutuhkan sebanyak 20 g/l
8.	Alkohol 70%-96%	Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Siliwangi	Dibutuhkan secukupnya
9.	Aquades	Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Siliwangi	Dibutuhkan secukupnya

3.5.2.3 Tahap sterilisasi alat

Tahap –tahap sterilisasi alat yang akan digunakan untuk proses subkultur (*overplanting*) ialah sebagai berikut:

- 1) Mencuci alat-alat hingga bersih, kemudian lap dengan tisu sampai kering. Botol-botol yang akan disterilisasi sebelumnya ditutup dengan aluminium foil dan diikat dengan karet, kemudian dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dan diikat kembali dengan karet. Sedangkan alat-alat selain botol dilapisi dengan kertas payung lalu dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dan diikat dengan karet;



Gambar 3.3 Pencucian Alat
Sumber: Dokumentasi Pribadi

- 2) Alat-alat disterilisasikan menggunakan *autoclave* pada temperatur 121 mpa dan tekanan 1 atm, selama 30 menit. Alat- alat yang sudah disterilisasi selanjutnya disimpan pada tempat yang bersih dan siap digunakan;



Gambar 3.4 Sterilisasi Alat
Sumber: Dokumentasi Pribadi

- 3) Sterilisasi *laminar air flow* sebelum melakukan penanaman subkultur dilakukan dengan menyemprotkan alkohol 96% pada permukaan *laminar air flow* kemudian di lap menggunakan tisu yang sudah dicelupkan alkohol 96%. Lalu nyalakan lampu UV pada *laminar air flow* sebelum digunakan selama 1-2 jam untuk mematikan kontaminan yang ada di permukaan *laminar air flow*.



Gambar 3.4 *Laminar Air Flow*
Sumber: Dokumentasi Pribadi

3.5.2.4 Tahap pembuatan media

Untuk perlakuan media dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu:

- 1) Perlakuan A : Media MS tanpa zat pengatur tumbuh BAP
- 2) Perlakuan B : Media MS + 0,5 ppm BAP
- 3) Perlakuan C : Media MS + 1 ppm BAP
- 4) Perlakuan D : Media MS + 1,5 ppm BAP
- 5) Perlakuan E : Media MS + 2 ppm BAP

Selanjutnya, untuk langkah-langkah pembuatan media perlakuan adalah sebagai berikut:

- 1) Menimbang BAP sebanyak 0,01 g dan NaOH 1 N;
- 2) Larutkan BAP dan NaOH tersebut dengan aquades secukupnya sampai homogen
- 3) Medium *Murashige and Skoog* ditimbang sebanyak 4,43 g/L;
- 4) Menimbang *Myoinositol* 0,1 g dan NaOH 1 N;
- 5) Masukkan *Myoinositol* dan MS yang sudah ditimbang ke dalam beker gelas, tambahkan aquades hingga 1000 ml untuk dilarutkan di atas hotplate sampai homogen;
- 6) Cek derajat keasaman diukur dengan pH antara 5,6 – 5,8. Jika terlalu alkali tambahkan HCL 1N, tetapi jika terlalu asam tambahkan NaOH 1N.
- 7) Sterilkan meja praktikum menggunakan alkohol 90%;

- 8) Tuangkan media ke dalam 5 beker gelas masing-masing 200 ml lalu tutup menggunakan alumunium foil;
- 9) Menimbang agar 1,6 gr sebanyak 5x untuk 5 perlakuan;
- 10) Menimbang sukrosa 4,00 gr sebanyak 5x untuk 5 perlakuan;
- 11) Tambahkan BAP ke dalam media sesuai dengan konsentrasi 0,5 ppm, 1 ppm, 1,5 ppm, 2 ppm lalu tutup kembali menggunakan alumunium foil;
- 12) Panaskan media lalu masukkan sukrosa 4,00 g sampai homogen pada masing-masing konsentrasi;
- 13) Kemudian panaskan kembali media hingga mendidih lalu tambahkan agar 1,6 g ke dalam media masing-masing konsentrasi sampai homogen;
- 14) Media dengan konsentrasi berbeda kemudian dituangkan ke dalam botol kultur masing-masing 5 ulangan;
- 15) Lalu tutup botol kultur dengan alumunium foil lalu diikat menggunakan karet dan di wrapping hingga aman;
- 16) Botol yang telah terisi larutan media di sterilisasi menggunakan *autoclave* selama \pm 15 menit pada suhu 121 mpa dan tekanan 1 atm.
- 17) Media bisa digunakan setelah sekitar 4-5 hari setelah disterilisasi, hal ini dilakukan untuk melihat kesterilan media sebelum dilakukan penanaman dan simpan dalam inkubator steril dengan suhu 16°C.



Gambar 3.6 Pembuatan Media
Sumber: Dokumentasi Pribadi

3.5.2.5 Tahap Pemilihan *Planlet*

Planlet kentang granola yang diambil dari Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Jendral Sudirman yang berumur ± 3 bulan sebelum di subkultur dengan tinggi $\pm 2-3$ cm. *Planlet* kentang granola berjumlah 25 *planlet*, setiap satu botol perlakuan akan ditanami oleh satu *planlet*.

3.5.2.6 Tahap Subkultur (*overplanting*) *planlet*

Subkultur (*overplanting*) dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut:

- 1) Menyiapkan semua alat yang akan dipakai yaitu : scalpel, pinset, mata pisau scalpel, lampu spirtus, botol media, botol berisi *planlet* yang telah tumbuh, gelas kimia 250ml berisi aquades steril, dan gelas kimia 250ml berisi alkohol 96%;
- 2) Gelas kimia aquades steril, dan alkohol 96% di semprot terlebih dahulu dengan alkohol sebelum dimasukkan ke dalam LAF;
- 3) *Overplanting* dimulai dengan menyiapkan dan memasukan alat-alat yang diperlukan kedalam LAF;
- 4) Pinset dan scapel diletakkan pada gelas kimia yang berisi alkohol 90% agar tetap steril, ketika akan digunakan panaskan pinset terlebih dahulu diatas api kemudian masukan ke dalam gelas kimia berisi aquades steril lalu keringkan diatas keras saring;
- 5) *Planlet* dari botol diambil dengan pinset dan diletakan diatas cawan petri sebanyak 25 *planlet*, dikeluarkan dengan cara menjepit bagian diantara akar dan daun kemudian ditarik dengan diushakan akar keluar lebih dahulu. Kemudian pisahkan *planlet* yang masih berhimpitan dengan *planlet* yang lain secara aseptis;
- 6) Pilih bagian tengah batang *planlet* yang siap ditanam, lalu potong sekitar 2-3 cm menggunakan *scapel*;
- 7) *Planlet* ditanam di dalam media steril yang telah diletakan di lemari inkubasi steril selama 3-4 hari sebelumnya;

- 8) *Planlet* yang telah ditanam di medium yang baru disimpan di dalam rak inkubasi dengan suhu 16°C;
- 9) *Planlet* didiamkan selama 6 minggu tanpa dilakukan subkultur berikutnya dan diamati pertumbuhan pada *planlet* tersebut.



Gambar 3.7 Subkultur (*Overplanting*)
Sumber: Dokumentasi Pribadi

3.5.2.7 Pemeliharaan dan Pengamatan *Planlet*

Pengamatan dilakukan satu minggu sekali setelah dilakukan penanaman dalam media kultur (dari minggu ke-1 sampai minggu ke-6 setelah subkultur dilakukan). Pengamatan *planlet* meliputi: tinggi *planlet* (cm) diukur dari pangkal batang sampai ujung daun terpanjang, jumlah daun (helai) dihitung dari semua daun yang terbentuk, jumlah tunas (anakan) dihitung dari jumlah tunas yang terbentuk, dan jumlah akar (helai) dihitung dari semua akar yang terbentuk.

3.6 Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah teknik observasi. Observasi dilakukan dengan pengamatan pertumbuhan *planlet* kentang granola dengan parameter pertumbuhannya yaitu jumlah tunas, jumlah daun, jumlah akar, dan tinggi *planlet*. Untuk pengumpulan data dimulai dari minggu ke-1 (saat subkultur dilakukan) sampai minggu ke-6. Jumlah *planlet* yang diamati sebanyak 25 *planlet* yang disubkultur. Waktu pengambilan data untuk pengamatan jumlah tunas, jumlah daun, jumlah akar, dan tinggi *planlet* dilakukan setiap satu minggu sekali selama 6 minggu.

Pengamatan jumlah tunas, jumlah daun, dan jumlah akar menggunakan pengamatan kasat mata tanpa alat bantu, sedangkan pengamatan tinggi *planlet* dengan menggunakan penggaris.

3.7 Instrumen Penelitian

3.7.1 Konsepsi

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabel pengamatan.

(Lampiran 3)

3.7.2 Standar pengukuran

- 1) Jumlah tunas dihitung dari jumlah tunas yang terbentuk, pengamatan dilakukan sekali dalam satu minggu selama enam minggu (selama subkultur/ *overplanting* berlangsung);
- 2) Jumlah daun dihitung dari semua daun yang terbentuk, pengamatan dilakukan sekali dalam satu minggu selama enam minggu (selama subkultur/ *overplanting* berlangsung);
- 3) Jumlah akar dihitung dari semua akar yang terbentuk, pengamatan dilakukan sekali dalam satu minggu selama enam minggu (selama subkultur/ *overplanting* berlangsung);
- 4) Tinggi *planlet* diukur dari pangkal batang sampai ujung daun terpanjang, pengukuran dilakukan menggunakan penggaris. Pengamatan dilakukan sekali dalam satu minggu selama enam minggu (selama subkultur/ *overplanting* berlangsung);

3.8 Teknik Pengolahan dan Analisis Data

Setelah pengumpulan data dilakukan, maka data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan program perhitungan SPSS-23 atau secara singkat adalah melalui tahapan sebagai berikut:

1) Uji Normalitas Data

Data yang telah diperoleh diolah secara statistik menurut cara Lilliefors dengan metode Kolmogorov, jika signifikansi kurang dari 0,05 ($P\text{-Value} < 0,05$)

maka H_a diterima dan H_0 ditolak dan kesimpulannya data tidak berdistribusi normal, jika signifikansi lebih dari 0,05 ($P\text{-Value}>0,05$) maka H_a ditolak dan H_0 diterima dan kesimpulannya data berdistribusi normal. Pada penelitian ini, nilai signifikansi lebih dari 0,05 ($P\text{-Value}>0,05$) maka H_a ditolak dan H_0 diterima yang artinya data berdistribusi normal maka dilanjut ke uji homogenitas.

2) Uji Homogenitas Data

Uji homogenitas digunakan untuk mengetahui varian populasi data apakah antara dua kelompok atau lebih data memiliki varian yang sama atau berbeda. Uji ini sebagai prasyarat dalam uji hipotesis yaitu *Independent Samples Test* dan *one way* anova. Kriteria pengambilan keputusan adalah jika nilai signifikansi kurang dari 0,05 ($P\text{-Value}<0,05$) maka dapat disimpulkan varian kelompok data tidak sama. Jika nilai signifikansi lebih dari 0,05 ($P\text{-Value}>0,05$) maka dapat dikatakan bahwa varian dari dua atau lebih kelompok data adalah sama atau homogen. Pada penelitian ini, nilai signifikansi lebih dari 0,05 ($P\text{-Value}>0,05$) maka H_a ditolak dan H_0 diterima yang artinya data bersifat homogen maka dilanjut ke uji hipotesis *one way* anova.

3) Uji Hipotesis

Data dianalisis menggunakan *one way* anova, yaitu untuk mengetahui perbedaan diantara dua atau lebih kelompok dimana hanya terdapat satu faktor yang dipertimbangkan. Penarikan kesimpulan dilihat dari nilai signifikansi 5%. Jika hasil dari analisis sidik ragam adalah nilai signifikansi lebih dari 0,05 ($P\text{-Value}>0,05$) maka H_0 diterima dan H_a ditolak dengan kesimpulan “Tidak terdapat pengaruh secara signifikan”. Jika nilai signifikansi kurang dari 0,05 ($P\text{-Value}<0,05$) maka H_0 ditolak dan H_a diterima dengan kesimpulan “Terdapat pengaruh secara signifikan” atau “Berpengaruh nyata/Berpengaruh sangat nyata”. Pada penelitian ini, parameter pertumbuhan yang memiliki kesimpulan dari analisis *one way* anova adalah “terdapat pengaruh secara signifikan” atau “berpengaruh nyata/berpengaruh sangat nyata” maka dilanjut dengan *post hoc test* (uji lanjut) menggunakan uji HSD (Honestly Significant Different)/uji BNJ (Beda Nyata Jujur) taraf 5%.

4) Uji Lanjut

Uji *one way* anova hanya memberikan indikasi tentang ada atau tidak beda antara rata-rata keseluruhan perlakuan, namun belum memberikan informasi tentang ada tidaknya perbedaan antar individu perlakuan yang satu dengan yang lain atau untuk mengetahui perlakuan terbaik yang mempengaruhi variabel terikat yang telah ditentukan. Oleh sebab itu dilakukan *Post-Hoc Test* (Uji Lanjut) dengan menggunakan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) atau yang dikenal dengan Uji HSD (Honestly Significant Difference) taraf 5%.

Hasil pengolahan data menggunakan program perhitungan SPSS-23 secara rinci terlampir pada **Lampiran 4**.

3.9 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2020 sampai Juli 2021 bertempat di Laboratorium Kultur Jaringan Jurusan Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Siliwangi.

