

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dimulai dari bulan Juli sampai November 2021. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi dalam kondisi lingkungan yang aseptik dengan suhu 21⁰C sampai 25⁰C, di bawah penyinaran lampu TL 40 watt dengan intensitas cahaya 1.000 lux selama 24 jam.

3.2 Alat dan bahan penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu satu set alat kultur (pinset, scalpel, gunting bedah), botol kultur, *Laminar Air Flow* (LAF), autoklaf, *shaker*, timbangan digital, mikro pipet, labu erlenmeyer, *beaker glass*, gelas ukur, pisau, kompor, dan *hotplate and magnetic stirrer*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bonggol pisang barangan (*Musa acuminata* C.), IBA 1.000 ppm, BAP 1.000 ppm, HCL 1 N, NaOH 1 N, aquades, spiritus, alkohol 75%, alkohol 95%, NaClO, fungisida, bakterisida, detergen, dan label. Bahan-bahan untuk pembuatan media MS yaitu NH₄NO₃, KNO₃, CaCl₂.2H₂O, MgSO₄.7H₂O, KH₂PO₄, FeSO₄.7H₂O, Na₂EDTA.2H₂O, H₃BO₃, MnSO₄.4H₂O, ZnSO₄.7H₂O, KI, Na₂MoO₄.2H₂O, CuSO₄.5H₂O, CoCl₂.6H₂O, Nicotinic acid, Pyridoxine-HCl, Thiamin-HCl, Glycine, agar, dan sukrosa.

3.3 Metode penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) berpola faktorial 3 x 3 yang terdiri atas dua faktor perlakuan dan diulang 3 kali. Faktor pertama adalah konsentrasi *Indole Butyric Acid* (IBA) (Faktor I), terdiri dari tiga taraf yaitu:

$i_0 = 0$ ppm (tanpa IBA),

$i_1 = 1$ ppm, dan

$i_2 = 2$ ppm.

Faktor kedua yaitu konsentrasi *Benzyl Amino Purin* (BAP) (Faktor B), terdiri dari tiga taraf, yaitu:

$b_0 = 0$ ppm (tanpa BAP),

$b_1 = 2$ ppm, dan

$b_2 = 4$ ppm.

Percobaan terdiri atas 9 kombinasi perlakuan, masing-masing kombinasi perlakuan diulang sebanyak 3 kali sehingga terdapat 27 unit percobaan. Tiap unit percobaan pada tahap inisiasi dan subkultur terdiri dari 3 botol kultur maka secara keseluruhan terdapat 81 botol kultur.

Kombinasi perlakuan yang digunakan disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Tabel Dwi Arah antara Faktor I dan Faktor B

Konsentrasi IBA (I)	Konsentrasi BAP (B)		
	b_0 (0 ppm)	b_1 (2 ppm)	b_2 (4 ppm)
i_0 (0 ppm)	i_0b_0	i_0b_1	i_0b_2
i_1 (1 ppm)	i_1b_0	i_1b_1	i_1b_2
i_2 (2 ppm)	i_2b_0	i_2b_1	i_2b_2

Analisis data hasil pengamatan dilakukan dengan model linear dari Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial menurut Heryanto (1996) sebagai berikut:

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

Keterangan:

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

μ = nilai tengah umum

α_i = pengaruh taraf ke i dari faktor konsentrasi IBA (I)

β_j = pengaruh taraf ke j dari faktor konsentrasi BAP (B)

$(\alpha\beta)_{ij}$ = pengaruh interaksi dari taraf ke i dan taraf ke j

ϵ_{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 analisis ragam pada Tabel 2.

Tabel 2. Tabel Analisis Ragam

Sumber Keragaman	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F _{hit}	F _{tab} 5%
I	2	$\left(\frac{\sum A^2}{r \cdot b} - FK\right)$	$\frac{JKI}{DBI}$	$\frac{KTI}{KTG}$	3,55
B	2	$\left(\frac{\sum B^2}{r \cdot a} - FK\right)$	$\frac{JKB}{DBB}$	$\frac{KTB}{KTG}$	3,55
I X B	4	$\left(\frac{\sum AB^2}{r} - FK - JKI - JKB\right)$	$\frac{JKIB}{DBIB}$	$\frac{KTIB}{KTG}$	2,93
Galat	18	JKT - JKI - JKB - JKIB	$\frac{JKG}{DBG}$		
Total	26	$\sum X_{IJ}^2 - FK$			

Sumber: Heryanto (1996)

Pengambilan keputusan ditentukan dari perbandingan antara F_{hit} dan F_{tab} pada taraf 5% sebagaimana pada Tabel 3.

Tabel 3. Kaidah Pengambilan Keputusan

Hasil Analisa	Kesimpulan analisa	Keterangan
F _{hit} ≤ F _{0,05}	Tidak berbeda nyata	Tidak ada perbedaan pengaruh antar perlakuan
F _{hit} > F _{0,05}	Berbeda nyata	Ada perbedaan pengaruh antar perlakuan

Apabila hasil uji F berbeda nyata, maka analisis data dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan (DMRT) pada taraf kepercayaan 95%.

Dengan rumus sebagai berikut:

$$LSR_{5\%} = SSR_{\alpha 5\%, dbg} \cdot Sx$$

Keterangan:

LSR = *Least Significant Range*

SSR = *Significant Studentized Range*

α = Taraf kesalahan

dbg = derajat bebas galat

Sx = galat baku rata-rata

Galat baku rata-rata dibagi menjadi tiga kasus yaitu:

- a. Apabila terjadi interaksi antara kedua faktor, rumus galat baku rata-rata yaitu:

$$S_x = \sqrt{\frac{KTG}{r}}$$

- b. Apabila tidak terjadi interaksi antara kedua faktor, untuk mencari pengaruh BAP secara mandiri, S_x ditentukan dengan rumus:

$$S_B = \sqrt{\frac{KTG}{ri}}$$

- c. Apabila tidak terjadi interaksi antara kedua faktor, untuk mencari pengaruh IBA secara mandiri, S_x ditentukan dengan rumus:

$$S_I = \sqrt{\frac{KTG}{rb}}$$

3.4 Prosedur penelitian

3.4.1 Sterilisasi

- a. Sterilisasi ruang kultur

Lantai ruang kultur dipel dengan disinfektan. Dinding dan rak kultur disemprot dengan alkohol 70%. *Laminar Air Flow* disterilisasi dengan cara memberikan sinar UV selama 60 menit sebelum digunakan, dan mengelap alasnya menggunakan alkohol 70%.

- b. Sterilisasi alat

Sterilisasi peralatan kaca (botol kultur) dilakukan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C. Peralatan dibungkus menggunakan kertas dan plastik tahan panas sebelum disterilkan. Sterilisasi peralatan logam (scalpel, pinset, gunting) menggunakan teknik *flame sterilization*, yaitu perendaman dalam etanol 95% kemudian dibakar dan didinginkan sebelum digunakan secara langsung.

- c. Sterilisasi media kultur

Sterilisasi media kultur menggunakan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 15 psi.

3.4.2 Pembuatan larutan stok

Larutan stok dibuat menjadi 10 kelompok stok. Konsentrasi larutan stok terdapat dalam Tabel 4.

Tabel 4. Komposisi Larutan Stok dan Konsentrasinya untuk Media MS

Kode wadah larutan	Nama Senyawa	Banyaknya yang ditimbang untuk dilarutkan dalam aquades (g/L)	Konsentrasi dalam Media MS (mg/L)	Volume larutan stok untuk satu liter media MS (ml/L)
A	NH ₄ NO ₃	82,500	1650,000	20
B	KNO ₃	95,000	1900,000	20
C	KH ₂ PO ₄	39,000	195,000	5
	H ₃ BO ₃	1,240	6,200	
	KI	0,166	0,830	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,050	0,250	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,005	0,025	
D	CaCl ₂ .H ₂ O	88,000	440,000	5
E	MgSO ₄ .7H ₂ O	74,000	370,000	5
	MnSO ₄	4,460	22,300	
	ZnSO ₄	1,720	8,600	
	CuSO ₄ H ₂ O	0,005	0,025	
F	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	3,730	37,300	10
	FeSO ₄	2,780	27,800	
Myo	Mioinositol	10,000	100,000	10
Vit	Thiamine	0,010	0,100	10
	Nicotinic acid	0,050	0,500	
	Pyridoxine	0,050	0,500	
	Glycine	0,200	2,000	
	IBA 1000 ppm	1,000		
	BAP 1000 ppm	1,000		

(Sumber: Kebun Benih Hortikultura Salaman, 2017 dalam Nofiyanto dkk., 2019)

Langkah-langkah pembuatan larutan stok A sampai dengan larutan stok F, stok vitamin, dan stok myo-inositol sebanyak 500 mL dibuat dengan cara menambahkan bahan larutan stok ke dalam beaker glass, kemudian ditambahkan aquades sampai volume 450 mL. Setelah itu larutan diaduk supaya homogen menggunakan *magnetic stirrer* kemudian ditera menggunakan gelas ukur dan ditambahkan aquades lagi sampai menunjukkan volume 500 mL. Setelah itu larutan

stok disimpan dalam botol larutan stok dan diberi label. Larutan stok disimpan di lemari pendingin.

Cara melarutkan stok ZPT yaitu dengan meneteskan NaOH untuk IBA, dan HCl untuk BAP sebelum dilarutkan dalam aquades.

3.4.3 Pembuatan media tanam

Media tanam yang digunakan yaitu *Murashige and Skoog* (Murashige dan Skoog, 1962). Cara membuatnya yaitu, memasukkan larutan stok media MS ke dalam labu Erlenmeyer, kemudian ditambahkan sukrosa 30 g/L dan aquades sampai volume 300 ml. Kemudian pH larutan diukur menggunakan pH meter sampai warna indikator menunjukkan pH 5,5 sampai 5,8. Setelah itu ditambahkan agar swalow 7 g/L kemudian dimasak menggunakan *hotplate and magnetic stirrer* hingga mendidih. Setelah itu media dimasukkan ke dalam botol kultur dengan isi \pm 25 ml kemudian botol kultur ditutup dan disterilkan.

3.4.4 Isolasi dan sterilisasi eksplan

Eksplan yang digunakan adalah bonggol tanaman pisang barangan merah liar yang berasal dari Kecamatan Cipaku, Kabupaten Ciamis. Bonggol pisang yang masih utuh dibersihkan dan dipotong menjadi ukuran yang lebih kecil dengan diameter 1cm sampai 2 cm dan tinggi 2 cm sampai 3 cm.

Sterilisasi eksplan dilakukan sebanyak dua tahap yaitu sterilisasi di luar LAF dan sterilisasi dalam LAF. Tahapan sterilisasi luar LAF yaitu eksplan dicuci dengan air mengalir kemudian direndam dalam larutan detergen selama 30 menit kemudian dibilas. Setelah itu eksplan direndam menggunakan bakterisida (bahan aktif: Streptomisin sulfat 20%) 2 g/L dan fungisida (bahan aktif: Mankozeb 80%) 2 g/L selama 60 menit, kemudian dibilas menggunakan air steril 3 kali. Untuk mengurangi gejala *blackening*, eksplan direndam dalam asam sitrat 200 mg/L dan asam askorbat 250 mg/L selama 60 menit (Hutami, 2008) kemudian dibilas menggunakan air steril 3 kali.

Tahapan sterilisasi dalam LAF yaitu eksplan dibilas dengan akuades steril 2 kali. Setelah itu, eksplan direndam dalam pemutih sodium hipoklorit 20% (bahan aktif: NaClO 5,25%) selama 20 menit, kemudian bilas menggunakan air steril

sebanyak 3 kali. Eksplan direndam lagi dalam pemutih Sodium hipoklorit 10% (bahan aktif: NaClO 5,25%) selama 10 menit (Lukman dan Maryam, 2014), kemudian bilas menggunakan air steril sebanyak 3 kali. Setelah itu, eksplan direndam dalam alkohol 70% selama 2 menit.

3.4.5 Penanaman

Eksplan yang sudah steril ditanam di dalam media kultur sesuai perlakuan. Langkah-langkah melakukan penanaman yaitu eksplan diletakkan di dalam petridish yang dialasi dengan kertas tisu steril, kemudian bagian luar eksplan yang rusak akibat terkena larutan sterilan dipotong sampai ukuran diameter 1 cm sampai 2 cm dan tinggi 2 cm. Setelah itu eksplan ditanam di dalam media sesuai perlakuan. Setiap botol diisi oleh 1 potong eksplan.

3.4.6 Subkultur

Eksplan yang digunakan ketika subkultur yaitu eksplan steril berumur 3 minggu setelah tanam yang telah ditanam sebelumnya pada tahap inisiasi. Langkah-langkah subkultur yaitu eksplan steril dikeluarkan dari botol kultur, kemudian diletakkan di atas petridish steril di dalam LAF yang telah dialasi dengan kertas tisu steril. Eksplan steril tersebut dibersihkan dari agar yang masih menempel dari media sebelumnya. Setelah itu, eksplan steril dipotong menjadi 3 bagian dengan ukuran 0,5 cm sampai 1 cm. Eksplan steril yang telah dipotong kemudian ditanam di botol kultur yang berisi media dengan perlakuan yang sama seperti sebelumnya.

3.4.7 Pemeliharaan

Pemeliharaan dilakukan dengan mengeluarkan eksplan yang terkontaminasi dari ruang kultur serta dengan menyemprotkan alkohol 70% pada botol kultur yang berada di ruang kultur untuk mencegah atau menekan kontaminasi.

3.5 Parameter pengamatan

3.5.1 Pengamatan penunjang

a. Persentase blackening

Pengamatan dilakukan satu kali setiap dua minggu. Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung botol yang mengalami penghitaman pada setiap perlakuan. Persentase *blackening* dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Persentase } blackening = \frac{\text{jumlah eksplan yang mengalami } blackening}{\text{jumlah eksplan}} \times 100\%$$

b. Waktu munculnya tunas

Waktu muncul tunas dihitung dari awal penanaman ke media perlakuan hingga terbentuk tunas. Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati dan mencatat pada hari ke berapa setelah ditanam mulai terbentuk tunas.

3.5.2 Pengamatan utama

a. Persentase eksplan berkalus

Pengamatan eksplan berkalus dilakukan dengan cara menghitung tanaman yang tumbuh kalus pada setiap perlakuan. Pada tahap inisiasi, persentase eksplan berkalus diamati diakhir masa inisiasi, yaitu 3 MST. Pada tahap subkultur, persentase tanaman berkalus diamati setiap 2 minggu satu kali selama 8 minggu pengamatan. Persentase tanaman berkalus dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Persentase eksplan berkalus} = \frac{\text{jumlah eksplan berkalus}}{\text{jumlah eksplan}} \times 100\%$$

b. Jumlah tunas

Pengamatan jumlah tunas dilakukan dengan cara menghitung tunas yang tumbuh. Pada tahap inisiasi jumlah tunas dihitung di akhir masa inisiasi. Pada tahap subkultur, jumlah tunas diamati setiap 2 minggu satu kali selama 8 minggu pengamatan.

c. Tinggi tunas

Pengamatan tinggi tunas dilakukan dengan cara mengukur tinggi tunas menggunakan aplikasi “Image J” yang diukur mulai dari pangkal sampai ujung

tunas. Pada tahap subkultur, tinggi tunas diamati setiap 2 minggu satu kali selama 8 minggu pengamatan.

d. Jumlah akar

Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung akar yang tumbuh dari bonggol. Pada tahap inisiasi jumlah akar diamati di akhir masa inisiasi. Pada tahap subkultur, jumlah akar diamati setiap 2 minggu satu kali selama 8 minggu pengamatan.