

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Islam Negeri Sunan Gunung Djati Bandung pada bulan Juli 2018 s/d Maret 2019.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan diantaranya: 1) eksplan berupa planlet tanaman pisang barangan yang berumur 1 bulan, planlet berasal dari BIOTROP Bogor; 2) media kultur yang terdiri dari media MS instan, gula pasir, agar, BAP, NAA, pupuk daun (0,25 ml/l, 0,5 ml/l, 0,75 ml/l, 1 ml/l) sebagai faktor perlakuan, aquades steril, *buffer solution* (pH 4 dan 7), NaOH 1 N, HCl 1 N; 4) Alkohol 70% dan 96%.

Alat yang digunakan diantaranya: 1) peralatan pembuatan media (spatula, timbangan analitik, pipet, *pump pipet*, *hot plate* and *magnetic stirrer*, batang pengaduk, pH meter, botol kultur, aluminium foil, dan karet gelang); 2) peralatan gelas (gelas ukur, *beaker glass*, botol kultur, botol selai, botol saus); 3) peralatan diseksi (pinset, gagang dan mata pisau scalpel); 4) ruang tanam (*Laminar Air Flow* /LAF) 5) peralatan penanaman dan inkubasi (*Laminar Air Flow Cabinet*, petridish, aluminium foil, rak kultur, termohigrometer, *Air Conditioner*, dan lampu LED); 6) Peralatan pengamatan (alat tulis, penggaris, kamera, *light meter*).

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang dilakukan yaitu metode RAL (Rancangan Acak Lengkap). RAL dalam penelitian ini digunakan faktor penambahan pupuk daun.

3.3.2 Rancangan Perlakuan

Rancangan perlakuan yang diberikan adalah faktor penambahan pupuk daun yang terdiri dari 5 taraf perlakuan dan media MS lengkap sebagai media kontrol. Perlakuan diulang sebanyak 5 kali sehingga diperoleh 30 unit percobaan. Denah letak unit percobaan (*lay out*) dapat dilihat pada (Lampiran 2).

P0 = Pupuk daun 0 ml L⁻¹ (kontrol)

P1 = Pupuk daun 0,50 ml L⁻¹

P2 = Pupuk daun 0,75 ml L⁻¹

P3 = Pupuk daun 1 ml L⁻¹

P4 = Pupuk daun 1,25 ml L⁻¹

P5 = Pupuk daun 1,50 ml L⁻¹

3.3.3 Rancangan Respon

Untuk mengetahui respon setiap unit percobaan terhadap perlakuan yang diberikan, maka dilakukan pengamatan respon. Rancangan respon adalah *variable* yang terdiri dari pengamatan penunjang dan pengamatan utama yang dilakukan

selama 8 minggu. Respon yang dinilai atau diukur dari setiap unit percobaan terdiri dari parameter sebagai berikut.

1. Pengamatan Utama

a. Waktu muncul tunas (HSK)

Waktu muncul tunas diamati dengan cara mengamati waktu pertama kali muncul tunas dari eksplan yang ditanam. Pengamatan waktu muncul tunas dilakukan sejak tanam hingga muncul tunas. Kriteria tunas yang baru muncul adalah terdapat tonjolan kecil dipermukaan eksplan yang mengarah keatas. Pembentukan mata tunas ditandai dengan munculnya tonjolan kecil dari sisi eksplan, biasanya muncul 5 MSK dan terbentuk sempurna setelah 8 MSK (Chatri dkk., 2011).

b. Jumlah Tunas (pucuk/tunas)

Jumlah tunas diamati dengan cara menghitung tunas dalam botol kultur pada setiap tanaman yang hidup. Pengamatan jumlah tunas eksplan tanaman pisang barangan dilakukan setiap dua minggu sekali pada umur 2 MSK, 4 MSK, 6 MSK dan 8 MSK. Pada akhir bulan kedua, eksplan dapat menumbuhkan 2-4 tunas aksilar (Sulistiani dan Yani, 2012).

c. Jumlah Daun (helai)

Jumlah daun diamati dengan cara menghitung daun dalam botol kultur pada setiap tanaman yang hidup. Daun dapat dihitung apabila eksplan tanaman pisang barangan sudah membentuk daun sempurna (helai). Pengamatan jumlah daun dilakukan setiap dua minggu sekali pada umur 2 MSK, 4 MSK, 6 MSK dan 8 MSK.

d. Tinggi tanaman (cm)

Tinggi tanaman diamati dengan cara mengukur tinggi planlet dalam botol kultur pada setiap tanaman yang hidup. Pengamatan tinggi tanaman dilakukan setiap dua minggu sekali pada umur 2 MSK, 4 MSK, 6 MSK dan 8 MSK dengan menggunakan penggaris.

e. Waktu muncul akar (HST)

Waktu muncul akar diamati dengan cara mengamati waktu pertama kali muncul akar dari eksplan yang ditanam. Pengamatan dilakukan sejak tanam hingga muncul akar.

f. Jumlah akar (buah)

Jumlah akar diamati dengan cara menghitung akar dalam botol kultur pada setiap tanaman yang hidup. Pengamatan dilakukan setiap dua minggu sekali pada umur 2 MSK, 4 MSK, 6 MSK dan 8 MSK.



Gambar 5. Eksplan pisang berumur 2 bulan

2. Pengamatan Penunjang

a. Kondisi lingkungan ruang inkubasi

Pengamatan kondisi lingkungan ruang inkubasi dilakukan dengan mengamati dan mengukur suhu, kelembaban dan intensitas cahaya pada proses inkubasi. Pengamatan suhu dan kelembaban dilakukan setiap hari menggunakan *thermohigrometer* sejak eksplan ditanam, sedangkan pengamatan terhadap intensitas cahaya dilakukan pada awal masa kultur menggunakan *lux meter*.

b. Persentase eksplan hidup (%)

Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati dan menghitung jumlah eksplan yang masih hidup, yang ditandai dengan pertumbuhan eksplan yang terus berlanjut, tidak mengalami kontaminasi dan tidak mati secara fisiologis dengan interval pengamatan satu minggu sekali. Presentase hidup eksplan dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ eksplan hidup} = \frac{\sum \text{eksplan hidup}}{\sum \text{seluruh eksplan}} \times 100\%$$

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
SUNAN GUNUNG DJATI
BANDUNG (Sudiyanti *et al.*, 2017)

c. Persentase kontaminasi (%)

Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati dan menghitung jumlah eksplan yang terkontaminasi oleh jamur, bakteri maupun keduanya dengan interval pengamatan satu minggu sekali. Presentasi hidup eksplan dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$\% \text{ kontaminasi} = \frac{\sum \text{eksplan terkontaminasi}}{\sum \text{seluruh eksplan}} \times 100\%$$

(Sudiyanti *et al.*, 2017)

d. Persentase eksplan mati fisiologis (%)

Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati dan menghitung jumlah eksplan yang mati fisiologis ditandai dengan terlihatnya pencoklatan pada eksplan dengan interval pengamatan satu minggu sekali. Persentase hidup eksplan dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$\% \text{ eksplan mati fisiologis} = \frac{\sum \text{eksplan mati fisiologis}}{\sum \text{seluruh eksplan}} \times 100\%$$

(Sudiyanti *et al.*, 2017)

e. Persentase eksplan browning (%)

Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati eksplan yang ditandai dengan berubahnya warna menjadi coklat. Pengamatan eksplan browning dilakukan setiap minggu dan dilakukan perhitungan persentase eksplan browning dengan menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ eksplan browning} = \frac{\sum \text{eksplan browning}}{\sum \text{seluruh eksplan}} \times 100\%$$

(Sudiyanti *et al.*, 2017)

3.4 Rancangan Analisis

Hasil penelitian dianalisis dengan sidik ragam berdasarkan model linear dari Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal. Adapun rumus rancangan percobaan yang digunakan yaitu sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Y_{ij} = Respon atau pengamatan pada suatu percobaan yang memperoleh perlakuan taraf ke-i ulangan ke-j.

μ = Nilai rata-rata umum

α_i = Pengaruh perlakuan pupuk daun pada taraf ke-i

ϵ_{ij} = Pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-i ulangan ke-j

Keterangan:

Hipotesis dalam uji F:

H_0 : Perlakuan tidak berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan eksplan.

H_1 : Perlakuan berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan eksplan.

Pengambilan keputusan uji F:

Terima H_0 : Perbedaan taraf pemberian media alternatif pupuk daun tidak berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan eksplan pada selang kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$).

Terima H_1 : Sekurang-kurangnya ada taraf pemberian media alternatif pupuk daun yang berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan eksplan pada selang kepercayaan 95% ($\alpha= 0,05$).

Untuk mengetahui pengaruh yang diberikan pada percobaan dilakukan uji F yang diperoleh dari hasil analisis ragam atau *analysis of variance* (ANOVA).

Tabel 1. Analisis Ragam

SK	db	JK	KT	Fhitung	Ftab5%
Perlakuan	t-1	JKP	KTP	KTP/KTG	
Galat	t(r-1)	JKG	KTG		
Total	tr-1	JKT			

Kemudian dibandingkan dengan F tabel pada selang kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) dengan kaidah :

- Jika F hitung < F tabel maka H0 diterima, H1 ditolak sehingga pemberian media alternatif pupuk daun tidak berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan eksplan.
- Jika F hitung > F tabel maka H0 ditolak, H1 diterima sehingga pemberian media alternatif pupuk daun berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan eksplan.

Jika sidik ragam memberikan hasil berpengaruh nyata, selanjutnya dilakukan Uji Lanjut Duncan.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

1 Sterilisasi Ruang dan Alat

Sterilisasi merupakan tahap awal dalam pelaksanaan kultur jaringan. Sterilisasi ruangan laboratorium dilakukan dengan cara membersihkan lantai pada setiap sudut ruangan disimpan formalin cair selama 1 bulan sebelum penelitian

berlangsung. Setiap ruangan akan atau selesai digunakan, lantai dan meja yang terdapat di ruangan harus dibersihkan kembali kemudian sesekali disemprot alkohol 96% agar terjaga kesterilannya.

Kegiatan sterilisasi alat yang dilakukan meliputi sterilisasi peralatan *diseksi* (penanaman), sterilisasi peralatan gelas, dan sterilisasi *Laminar Air Flow* (LAF). Sterilisasi peralatan *diseksi* meliputi sterilisasi pinset, pisau *scalpel*, dan gunting, sedangkan sterilisasi peralatan gelas meliputi sterilisasi botol kultur, botol selai, botol saus dan cawan petri.

Peralatan gelas dan *diseksi* dapat disterilkan dengan cara mencuci menggunakan air dan deterjen. Selanjutnya peralatan dimasukkan ke dalam autoklaf atau sterilisasi basah pada suhu 121 °C dengan tekanan 17,5 psi dalam waktu 30 menit. Khusus untuk cawan petri dan peralatan *diseksi* sebelum dimasukkan ke dalam autoklaf dibungkus menggunakan kertas. Setelah itu, alat-alat tersebut disterilisasi kering menggunakan oven pada suhu 100 °C selama 1 jam. Peralatan tetap disimpan dalam oven pada suhu 80 °C hingga alat akan digunakan.

Laminar Air Flow Cabinet (LAFC). LAFC ini disterilkan dengan cara menghidupkan lampu UV sebelum laminar digunakan selama 30-60 menit. Setelah itu lampu UV dimatikan lalu buka tutup laminar dan nyalakan blower serta lampu dalam laminar. Setelah itu ruangan dalam laminar disemprot alkohol 70% dan lap dengan tissue bersih. Laminar siap digunakan.

2 Pembuatan dan Sterilisasi Media Tanam

Media yang digunakan adalah media MS instan, dengan komposisi terdapat pada Lampiran 3. Media yang dibuat pada setiap perlakuan adalah sebanyak 100

ml. Konsentrasi media MS yang digunakan yaitu 0,443 g dengan penambahan gula 3 g, agar 0,7 g. Setelah komposisi media dicampurkan, lalu diaduk hingga homogen menggunakan *magnetic stirrer*.

Setelah larutan homogen, larutan ZPT dimasukkan dengan cara memipet larutan stok ZPT yaitu 0,5 mg/L NAA dan 4 mg/L BAP, penggunaan ZPT diambil berdasarkan acuan produksi pisang barang secara kultur *in vitro* oleh Sulistiani dan Yani (2015), larutan media diaduk kembali menggunakan *magnetic stirrer* sampai seluruh bahan larut, kemudian ditambahkan lagi aquades steril hingga volumenya mendekati 100 ml. Setelah itu ukur pH dan sesuaikan pH sampai mencapai 5,8. Setelah media mendidih dimasukan kedalam botol kultur yang selanjutnya di autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 17,5 psi selama 30 menit. Proses pembuatan media dapat dilihat pada (Lampiran 4).

Setelah sterilisasi selesai, botol-botol media disimpan minimal 3 hari pada *box* media di ruang inkubasi untuk mengetahui apakah media terkontaminasi mikroorganisme atau tidak. Kegiatan ini dilakukan berulang sesuai perlakuan media pupuk daun dengan konsentrasi yang diberikan berturut-turut adalah 0,50 ml L⁻¹; 0,75 ml L⁻¹; 1 ml L⁻¹; 1,25 ml L⁻¹ dan 1,50 ml L⁻¹.

3 Penanaman Eksplan

Penanaman dilakukan didalam LAF yang telah disterilkan dengan penyemprotan dengan alkohol 70% dan disinari dengan sinar Ultra Violet (UV) selama 30-60 menit. Setelah itu, nyalakan lampu dan blower, masukan alat yang diperlukan seperti pinset, pembakar bunsen, cawan petri, *scalpel* ke dalam LAF. Eksplan atau bahan tanam yang digunakan berupa tanaman steril (*planlet*) pisang

barangan. Gerombol tunas dipisahkan dan dipotong-potong menjadi beberapa potongan tunas yang lebih kecil dan bagian ujung daun dipangkas. Tunas-tunas tersebut sebelum ditanam pada media perlakuan, ditanam pada media tanpa perlakuan terlebih dahulu selama satu minggu untuk menetralkan eksplan dari media sebelumnya. Penanaman pada media ini dimaksudkan untuk mendorong pertumbuhan tunas-tunas abnormal agar tumbuh menjadi tunas-tunas yang normal (Purba dkk., 2017). Kemudian setelah 1 minggu tunas-tunas tersebut disubkultur pada media perlakuan yang telah dibuat. Selama penanaman kondisi mulut botol harus selalu dekat dengan Bunsen untuk memperkecil resiko terjadinya kontaminasi. Setelah eksplan ditanam pada media perlakuan, tutup botol dengan *aluminium foil* lalu diikat menggunakan karet gelang. Setelah seluruh eksplan tertanam, pada setiap botol diberi label tanggal penanaman.

4 Pemeliharaan

Ruang inkubasi atau tempat penyimpanan botol kultur harus selalu steril. Suhu di dalam ruangan juga harus diperhatikan. Kisaran suhu yang optimal adalah 23°C. Pemeliharaan dilakukan dengan membersihkan lingkungan sekitar kultur dengan penyemprotan alkohol 70%. Pemeliharaan ini penting untuk menjaga kultur tidak terkontaminasi. Selain itu, inkubasi di ruang kultur menggunakan kondisi terang menggunakan cahaya lampu *fluorescent* selama 16-24 jam/hari.