

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Taman Angrek Dinas Ketahanan Pangan dan Pertanian Kota Surabaya, Jl. Sememi Jaya Utara Gg. II, Sememi, Kec. Benowo, Kota SBY, Jawa Timur 60198. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober sampai Desember 2023.

3.2 Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksplan pisang Cavendish, kinetin, NAA, aquades steril, alkohol 90%, bahan kimia media Murashige-Skoog, aluminium foil, bubuk agar, gula, karet, kertas label, HCL, KOH, NaOH dan bahan-bahan lain yang mendukung penelitian ini.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah botol kuljar, Laminar air flow cabinet, rak penyimpanan, penggaris, autoclave, timbangan analitik, erlenmeyer, gelas ukur, gelas piala, petridish, lemari pendingin, korek api, magnetic stirrer, timbangan analitik, scalpel, botol sprayer, ph meter, pinset, korek api, hot plate stirrer, fume hood, kamera, keranjang autoklaf, alat tulis dan alat-alat lain yang mendukung penelitian ini.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode eksperimen Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan dua faktor yang diteliti, yaitu :

Faktor pertama (N) adalah NAA yang terdiri dari 3 taraf yaitu :

N₀ : 0 ppm

N₁ : 1 ppm

N₂ : 2 ppm

Faktor kedua (K) adalah Kinetin yang terdiri dari 3 taraf yaitu :

K₀ : 0 ppm

K₁ : 3 ppm

K₂ : 6 ppm

Jumlah kombinasi konsentrasi adalah $3 \times 3 = 9$ dengan kombinasi konsentrasi sebagai berikut :

N_0K_0	N_1K_0	N_2K_0
N_0K_1	N_1K_1	N_2K_1
N_0K_2	N_1K_2	N_2K_2

Terdapat 9 jumlah perlakuan dan setiap jumlah perlakuan diulang sebanyak 3 kali sehingga didapatkan 27 satuan percobaan. Setiap satuan percobaan terdiri dari 5 botol, dan total keseluruhan yaitu 135 botol yang setiap botol berisi 1 eksplan. Layout percobaan sebagai berikut:

I	II	III
N_2K_2	N_2K_1	N_1K_2
N_2K_0	N_2K_0	N_0K_0
N_1K_2	N_0K_1	N_1K_0
N_1K_1	N_0K_2	N_2K_0
N_0K_0	N_1K_0	N_1K_1
N_0K_2	N_1K_2	N_2K_2
N_2K_1	N_1K_1	N_2K_1
N_0K_1	N_2K_2	N_0K_1
N_1K_0	N_0K_0	N_0K_2

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Sterilisasi alat-alat Kultur Jaringan

Alat-alat yang digunakan untuk kegiatan kultur jaringan harus dalam keadaan steril. Alat-alat logam dan gelas disterilkan dalam autoklaf. Sebelum sterilisasi botol kultur dan alat, botol kultur dan alat direndam dengan deterjen selama sehari kemudian dicuci bersih dan dikeringkan. Kemudian alat-alat dan botol kultur tersebut dibungkus dengan kertas coklat dan diikat dengan karet selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121^oC selama 30 menit pada tekanan 17.5 psi . Setelah alat-alat dan botol kultur steril selanjutnya disimpan pada tempat yang bersih dan siap digunakan. Alat-alat tanam seperti pinset dan scalpel dapat disterilkan kembali dengan pemanasan di atas api spiritus, setelah dicelupkan pada alkohol 90% sebelum penanaman dilakukan. Lebih jelas sterilisasi alat dan botol kultur jaringan disajikan pada gambar 3.1.



Gambar 3.1 Sterilisasi Alat dan Botol Kultur Jaringan
Sumber : Dokumen Pribadi (Oktober 2023)

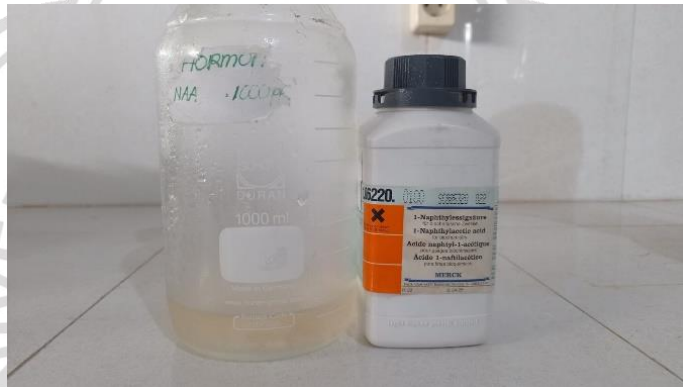
3.4.2 Sterilisasi Ruang Tanam dan Laminar Air Flow Cabinet

Sterilisasi ruang tanam dilakukan dengan menyemprotkan alkohol 90% di seluruh bagian ruangan, menghidupkan lampu UV (ultra violet) dan blower pada laminar air flow selama 30 menit. Setelah itu lampu UV dimatikan dan blower tetap

dibiarkan menyala. Ruangan dapat digunakan setelah 30 menit lampu UV dimatikan.

3.4.3 Pembuatan Larutan Stok NAA dan Kinetin

Pembuatan larutan stok NAA dilakukan dengan cara bubuk ZPT NAA ditimbang sebanyak 0,1 g dan di masukkan kedalam gelas piala lalu di tambahkan dengan beberapa tetes NaOH dan KOH untuk melarutkan serbuk NAA. Kemudian ditambahkan aquades sebanyak 100 ml dan dihomogenkan di hotplate stirrer sehingga menghasilkan 100 ml larutan stok NAA untuk 100 ppm. Kemudian larutan dipindahkan ke wadah stok dan ditutup dengan rapat serta diberi label. Larutan stok NAA disimpan dalam lemari pendingin. Lebih jelas larutan stok NAA disajikan pada gambar 3.3.



Gambar 3.3 Larutan Stok NAA
Sumber : Dokumen Pribadi (Oktober 2023)

Pembuatan larutan stok Kinetin dilakukan dengan cara bubuk ZPT Kinetin ditimbang sebanyak 0,01 g dan dimasukkan kedalam gelas piala lalu ditambah dengan aquades beberapa tetes untuk melarutkan serbuk Kinetin. Kemudian ditambahkan aquades sebanyak 100 ml dan dihomogenkan di hotplate stirrer sehingga menghasilkan larutan stok Kinetin 100 ppm, kemudian larutan stok dipindahkan kedalam wadah stok dan ditutup dengan rapat serta diberi label. Larutan stok kinetin disimpan dalam lemari pendingin. Lebih jelas larutan stok kinetin disajikan pada gambar 3.4.



Gambar 3.4 Larutan Stok Kinetin
Sumber : Dokumen Pribadi (Oktober 2023)

3.4.4 Pembuatan dan Sterilisasi Media

Media yang digunakan pada penelitian ini adalah media MS. Untuk memudahkan pekerjaan ini dibuat larutan stok dengan komposisi-komposisi yang telah ditentukan yang dimana mengandung unsur hara makro, mikro dan vitamin. Untuk Lebih jelas komposisi-komposisi yang terkandung pada stok media MS terdapat pada lampiran 2. Lebih jelas larutan stok yang digunakan pada media MS disajikan pada gambar 3.5.



Gambar 3.5 Larutan Stok Media MS
(a) Nitrat, (b) Vitamin, (c) Halidah, (d) Ferrum, (e) Phospat, (f) Sulfat
Sumber : Dokumen Pribadi (Oktober 2023)

Langkah pembuatan 1 liter untuk satu perlakuan diawali dengan meletakkan gelas ukur di atas hotplate stirrer yang sudah diisi dengan aquades dengan volume 300 ml, selanjutnya menghidupkan stirrenya. Kemudian penambahan larutan stok media MS sebanyak 10 ml per larutan stok. Setelah itu penambahan gula sebanyak 20 g/L dan menunggunya hingga homogen. Setelah gula dirasa cukup larut tahap selanjutnya penambahan penambahan unsur hara ZPT NAA dan Kinetin dengan konsentrasi yang sesuai dengan perlakuan. Setelah itu penambahan aquades hingga volume 700 ml. Setelah pencampuran larutan dilakukan pengukuran pH 5,5 – 5,8. Apabila pH lebih tinggi dari 5,8 mengakibatkan media terlalu keras dan jika kurang

dari 5,8 mengakibatkan media tidak memadat dengan baik, sehingga dapat mempengaruhi penanaman maupun penyerapan nutrisi oleh eksplan. Bahan kimia yang digunakan untuk menaikkan serta menurunkan pH adalah NaOH dan HCL. Setelah itu masukkan agar 7 g/L dan dipanaskan hingga mendidih menggunakan hotplate stirrer, setelah dilakukan pemanasan larutan media dituang ke botol kultur dengan volume 50 ml/botol dan ditutup dengan aluminium foil dengan rapat. Media kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit. Kemudian media disimpan pada ruang kultur dengan suhu 25°C sebelum digunakan. Lebih jelas kegiatan pembuatan media MS disajikan pada gambar 3.6.



Gambar 3.6 Kegiatan Pembuatan dan Sterilisasi Media MS
Sumber : Dokumen Pribadi (Oktober 2023)

3.4.5 Penanaman Eksplan

Sebelum penanaman, alat dan bahan dipersiapkan terlebih dahulu dan dimasukkan ke laminar air flow dengan disemprot menggunakan alkohol 90%, penanaman eksplan dilakukan didalam laminar air flow dengan kondisi yang aseptik. Sebelum bekerja, tangan disemprot terlebih dahulu dengan menggunakan alkohol 90%. Laminar air flow juga disemprot menggunakan alkohol 90% dan dilap menggunakan tisu. Eksplan diambil dari botol kultur jaringan menggunakan pinset

yang telah disterilkan. Selanjutnya eksplan diletakkan pada petridish dan dipotong-potong menggunakan scalpel sebesar 1 – 1,5 cm. selanjutnya ambil media yang telah disiapkan, bibir botol yang terdapat aluminium foil dipanaskan diatas api lampu spirtus sambil diputar-putar setelah itu baru dibuka aluminium yang ada di bibir botol, eskplan dimasukkan kedalam botol media menggunakan pinset, 1 botol kultur ditanami 1 eksplan pisang cavendish yang dimana posisi dan letaknya disesuaikan, setelah itu botol kembali ditutup dengan aluminium foil yang telah dipanaskan didekat api, kemudian bibir botol diputar diatas lampu spirtus. Setelah itu botol kultur dikeluarkan dari laminar air flow dan diwrapping dengan solasi wrap secara menyeluruh menutupi aluminium foil di botol kultur dan dimasukkan dalam ruang kultur jaringan selanjutnya dilakukan parameter pengamatan. Lebih jelas penanaman eksplan disajikan pada gambar 3.7.



Gambar 3.7 Penanaman Eksplan
Sumber : Dokumen Pribadi, (Oktober 2023)

3.4.6 Pemeliharaan Eksplan

Pemeliharaan meliputi pemeliharaan ruang kultur dengan menjaga suhu ruangan tetap stabil antara 21- 25°C dan memberikan penyinaran dengan lampu neon 20 watt. Menjaga agar ruangan tetap steril dengan cara mengepel ruangan dan memisahkan eksplan yang terkontaminasi oleh bakteri dan jamur. Ruang kultur disemprot dengan alkohol 90% yang digunakan untuk mensterilkan ruangan.

3.5 Parameter Pengamatan

3.5.1 Tinggi Tanaman (cm)

Tinggi tanaman diamati dengan cara menghitung tinggi tanaman menggunakan penggaris dalam setiap perlakuan yang tumbuh, dilakukan pada akhir pengamatan yaitu 60 HST (Hari Setelah Tanam) dengan cara mengambil dan mengeluarkan planlet dari botol kuljar. Planlet dicuci bersih menggunakan air mengalir dan dilakukan penyemprotan ke akar planlet sampai sisa media tanam (agar) hilang dan akar menjadi bersih, setelah itu planlet dikeringkan dan dilakukan pengamatan. Hasil pengamatan dianalisis secara statistik dan disajikan dalam bentuk tabel.

3.5.2 Jumlah Tunas (buah)

Pengamatan jumlah tunas dilakukan dengan cara melihat planlet pisang dari luar botol kuljar. Pengamatan terhadap jumlah tunas dilakukan pada akhir penelitian dengan cara menghitung jumlah keseluruhan tunas yang tumbuh pada setiap planlet. Hasil pengamatan ini dianalisis secara statistik dan disajikan dalam bentuk tabel.

3.5.3 Jumlah Daun (Helai)

Pengamatan jumlah daun dilakukan dengan cara melihat daun planlet pisang dari luar botol kuljar. Pengamatan terhadap jumlah daun dilakukan pada akhir penelitian dengan cara menghitung jumlah keseluruhan daun yang tumbuh pada setiap planlet. Hasil pengamatan ini dianalisis secara statistik dan disajikan dalam bentuk tabel.

3.5.4 Jumlah Akar (helai)

Jumlah akar diamati dengan cara menghitung total akar dalam setiap perlakuan yang tumbuh, dilakukan pada akhir pengamatan yaitu 60 HST (Hari Setelah Tanam) dengan cara mengambil dan mengeluarkan planlet dari botol kuljar. Akar dicuci bersih dengan cara menyemprotkan air ke akar hingga bersih dari media tanam (agar) dan akar menjadi bersih, setelah itu dikeringkan dan dilakukan pengamatan. Hasil pengamatan dianalisis secara statistik dan disajikan dalam bentuk tabel.

3.5.5 Panjang Akar (cm)

Pengamatan panjang akar dilakukan dengan cara mengambil dan mengeluarkan planlet dari botol kuljar, akar dicuci bersih dengan cara menyemprotkan air ke akar sampai sisa media tanam (agar) hilang dan akar menjadi bersih, setelah itu dikeringkan. Kemudian pengukuran dilakukan mulai dari pangkal batang sampai ujung akar terpanjang menggunakan penggaris. Pengamatan panjang akar dilakukan pada akhir penelitian. Data hasil pengamatan dianalisis secara statistik kemudian disajikan dalam bentuk tabel.

3.5.6 Waktu Muncul Tunas (Hari)

Pengamatan waktu muncul dilakukan dengan menghitung hari saat tunas pertama muncul pertama kali, dinyatakan dalam bentuk HST. Terbentuknya tunas ditandai dengan adanya tonjolan berwarna kehijauan (± 2 mm) pada permukaan eksplan bagian atas. Hasil pengamatan dianalisis secara statistik dan disajikan dalam bentuk tabel.

3.6 Analisis Data

3.6.1 Analisa Ragam atau Analisis of Variance (ANOVA)

Data pengamatan yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis menggunakan analisis sidik ragam ANOVA dengan taraf nyata $\alpha = 5\%$.

Tabel 3.1 Pengujian uji ANAVA 2 jalan

Sumber	Derajat	Jumlah	Kuadrat	F Hitung	F Tabel 5%
Keragaman	Bebas (db)	Kuadrat	Tengah		
		(JK)	(KT)		
Perlakuan	ab -1	JKP	KTP	$\frac{KTP}{KTG}$	F(α , db-P, db-G)
A	a-1	JK(A)	KT(A)	$\frac{KT(A)}{KTG}$	F(α ,db-A,db-G)
B	b-1	JK(B)	KT(B)	$\frac{KT(B)}{KTG}$	F(α ,db-B, db-G)
AB	(a-1)(b-1)	JK(AB)	KT(AB)	$\frac{KT(AB)}{KTG}$	F(α ,db-AB, db-G)
Galat	ab (r-1)	JK(G)	KTG		
Total	ab.r-1	JKT			

Perlakuan yang memperlihatkan adanya perbedaan nyata terhadap pertumbuhan dan hasil akan dilakukan uji lanjut oleh uji Duncan's Multiple Range Test (DMRT) dengan taraf 5%.

3.6.2 Uji Jarak Nyata 5% (DMRT 5%)

Uji Duncan's Multiple Range Test dengan taraf 5% dengan rumus adalah sebagai berikut:

$$DMRT\alpha = R(p, v, \alpha) \sqrt{\frac{KTGalat}{r}}$$

Keterangan:

$R(p, v, \alpha)$ = Tabel nilai kritis uji perbandingan berganda Duncan

p = Jumlah perlakuan dikurangi 1 (sebanyak $p - 1$)

v = Derajat bebas galat (db galat)

α = Taraf nyata yang digunakan

KT Galat = Kuadrat tengah galat

r = Jumlah ulangan pada tiap nilai tengah perlakuan yang dibandingkan

