

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dimulai pada bulan Februari sampai dengan bulan Maret 2020. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium milik Kelompok Peneliti Bioteknologi Tanaman, Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Kecamatan Cibinong, Kabupaten Bogor dengan ketinggian tempat 160 m dpl.

3.2 Alat dan bahan penelitian

Alat-alat yang digunakan yaitu timbangan analitik, pH meter, botol Schott, *beaker glass*, gelas ukur, botol jar, cawan petri diameter 6 cm dan 15 cm, pipet ukur, *filler bulb*, spatula, oven, autoklaf, *hand sprayer*, bunsen, korek api, *laminar air flow cabinet* (LAFC), pinset bengkok, *scalpel*, botol kecil, tisu, spidol, kertas, plastik *wrap*, rak kultur, lemari penyimpanan, mikroskop binokular, komputer, dan masker.

Bahan tanam yang digunakan adalah *clumps*/kumpulan kalus embriogenik yang berasal dari basal umbi bawang merah kultivar Sumenep, ZPT (2iP, NAA), media instan MS (Murashige & Skoog, 1962) (Caisson No Catalog MSP09), media instan B5 (Gambrog) (Caisson No Catalog GBP05), bahan pematat media (agargel), sukrosa, aquades, alkohol 70 %, NaOH dan HCL.

3.3 Metode penelitian

Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode eksperimen dengan rancangan percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan kombinasi konsentrasi 2iP dan NAA yang sudah ditetapkan konsentrasinya (Tabel 1). Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali sehingga terdapat 36 unit percobaan. Perlakuan dilakukan di cawan petri, pada setiap cawan petri terdapat 1 *clumps* kalus sehingga terdapat 36 *clumps* yang diamati. Kultivar *clumps* yang digunakan adalah kultivar Sumenep.

Tabel 1. Kombinasi perlakuan

| Kombinasi Perlakuan | Media Dasar | 2iP (mg/L) | NAA (mg/L) |
|---------------------|-------------|------------|------------|
| P1 | MS | 0 | 0 |
| P2 | | | 1 |
| P3 | | 0,5 | 0,5 |
| P4 | | | 1 |
| P5 | | 1 | 0 |
| P6 | | | 0,5 |
| P7 | B5 | 0 | 0 |
| P8 | | | 1 |
| P9 | | 0,5 | 0,5 |
| P10 | | | 1 |
| P11 | | 1 | 0 |
| P12 | | | 0,5 |

Berdasarkan rancangan yang digunakan, maka dapat dikemukakan model linearnya menurut Gomez dan Gomez (2010) sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

$i = 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11$ dan 12

$j = 1,2$ dan 3

Keterangan :

Y_{ij} = Respon (nilai pengamatan) pada perlakuan ke-i pada ulangan ke-j

μ = Nilai tengah umum (rata-rata respon)

τ_i = Pengaruh perlakuan ke-i

ε_{ij} = Galat percobaan dari perlakuan ke-i pada ulangan ke-j

Berdasarkan model linear tersebut, maka dapat disusun tabel sidik ragam seperti pada tabel berikut :

Tabel 2. Sidik ragam (Gomez dan Gomez, 2010)

| Sumber Keragaman | dB | JK | KT | Fhitung | Ftab 0,5 |
|------------------|---------------|-----|-------------------|-------------------|----------|
| Perlakuan | $t-1 = 11$ | JKP | $\frac{JKP}{DBP}$ | $\frac{KTP}{KTG}$ | 2,22 |
| Galat | $t(r-1) = 24$ | JKG | $\frac{JKG}{DBG}$ | | |
| Total | $(tr-1) = 35$ | JKT | | | |

Dengan :

$$\begin{aligned} \text{FK} &= \frac{Y_{..}^2}{tr} \\ \text{JK Total (JKT)} &= \sum_{i=1}^n X_i^2 - \text{FK} \\ \text{JK Perlakuan (JKP)} &= \sum_{i=1}^t \frac{T_i^2}{r_i} - \text{FK} \\ \text{JK Galat (JKG)} &= \text{JKT} - \text{JKP} \end{aligned}$$

Kaidah pengambilan keputusan berdasarkan pada uji F hitung (Fhit) adalah sebagai berikut :

Tabel 3. Kaidah pengambilan keputusan

| Hasil Analisa | Kesimpulan Analisa | Keterangan |
|-------------------------|---------------------|--|
| $F_{hit} \leq F_{0,05}$ | Tidak berbeda nyata | Tidak ada perbedaan pengaruh antar perlakuan |
| $F_{hit} > F_{0,05}$ | Berbeda nyata | Ada perbedaan pengaruh antar perlakuan |

Sumber : Gomez dan Gomez (2010)

Selanjutnya apabila berdasarkan analisis uji F menunjukkan perbedaan nyata, maka dilakukan uji lanjut dengan Uji Scott-Knott pada taraf nyata 5% dengan rumus sebagai berikut :

$$\lambda = \frac{\pi \beta_0}{2(\pi-2) s_{02}}$$

$$s_{02} = \frac{\sum_{i=1}^k (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + v s_{2/y}}{k+v}$$

dimana :

β_0 = jumlah kuadrat nilai rata-rata perlakuan yang terbesar dari semua kemungkinan

pengelompokan nilai rata-rata perlakuan.

π = suatu konstanta bernilai 3,141592654 atau dibulatkan menjadi 3,14

k = banyaknya nilai rata-rata perlakuan yang diuji

v = derajat bebas galat (*error df*)

$s_{2/y}$ = ragam galat dari nilai rata-rata perlakuan yang ditentukan berdasarkan formula :

$$s^2/y = s^2 / r = KTG/r$$

KTG = kuadrat tengah galat (*error mean square*)

r = banyaknya ulangan dari perlakuan.

Distribusi dari statistik uji Scott-Knott, λ , dapat didekati dengan distribusi Chi-kuadrat, χ^2 , dengan derajat bebas V_0 , dimana :

$$v_0 = \frac{k}{\pi - 2}$$

Berdasarkan metode analisis gerombol Scott-Knott, nilai rata-rata perlakuan akan dikelompokkan kedalam dua kelompok nilai rata-rata untuk setiap kali melakukan pengujian.

Berdasarkan kenyataan ini, maka dapat disusun hipotesis sebagai berikut :

$H_0 = u_i = u$ ($i = 1, 2, \dots, k$) ; yang berarti semua nilai rata-rata perlakuan tidak berbeda, sehingga dapat dianggap sama dengan nilai rata-rata umum.

$H_1 = u_1 = m_1$ atau m_2 ; dimana m_1 dan m_2 adalah nilai rata-rata dari kelompok satu dan kelompok 2.

Berdasarkan pengujian hipotesis di atas, maka kita akan mengetahui apakah nilai rata-rata perlakuan yang diuji pada dasarnya tidak berbeda sehingga tidak perlu memisahkan mereka atau nilai rata-rata perlakuan itu berbeda sehingga dapat memisahkan perlakuan-perlakuan itu ke dalam kelompok tertentu.

Kaidah pengujian hipotesis berdasarkan metode analisis gerombol Scott-Knott, adalah :

tolak H_0 apabila $\lambda > X_{\alpha 2} ; V_0$ dan terima H_0 apabila $\lambda \leq X_{\alpha} ; V_0$. Apabila H_0 ditolak berarti kelompok nilai rata-rata yang diuji itu berbeda, maka kita dapat melakukan pengujian serupa untuk setiap pecahan kelompok (anak gugus), hingga ditemukan bahwa antar kelompok nilai rata-rata dapat dianggap tidak berbeda. Berdasarkan proses pengujian ini, maka ditemukan kelompok-kelompok perlakuan yang pada dasarnya memiliki nilai rata-rata yang sama.

1.4 Pelaksanaan penelitian

3.4.1 Sterilisasi peralatan kultur

Peralatan yang akan digunakan dalam percobaan disterilisasi dengan cara dicuci bersih dengan detergen lalu dikeringkan. Selanjutnya cawan petri diameter 6 cm, cawan petri diameter 15 cm kosong dan berisi tisu, pinset bengkok dan *scalpel* masing-masing di bungkus kertas lalu dimasukkan ke dalam oven dan di panaskan dengan suhu 100 °C selama satu jam. Setelah steril, alat-alat tersebut di keluarkan dari oven dan di simpan di lemari penyimpanan pada ruang transfer.

3.4.2 Pembuatan media MS dan B5

Pembuatan media MS dan B5 menggunakan rumus:

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

Keterangan:

V_1 = Volume awal (mL)

N_1 = Berat awal (gr)

V_2 = Volume akhir (mL)

N_2 = Berat akhir (gr)

Ketetapan massa bahan-bahan yang digunakan untuk membuat media setiap liternya yaitu 4,43 gr MS, 3,21 gr B5, 30 gr sukrosa dan 3 gr agargel. Dibuat 12 media perlakuan (MS dan B5) masing-masing sebanyak 100 mL. Berdasarkan rumus diatas, massa yang dibutuhkan yaitu 0,44 gr MS, 0,32 gr B5, 3 gr sukrosa, dan 0,3 gr agargel. MS dan B5 masing-masing dimasukkan ke dalam botol Schott yang sudah dituliskan keterangan perlakuan di luar dinding botol lalu ditambahkan air secukupnya. Kemudian ditambahkan sukrosa dan zat pengatur tumbuh dengan konsentrasi sesuai perlakuan (Tabel 1), lalu ditera hingga volume mencapai 100 mL. pH media diukur menggunakan pH meter, dengan pH yang ingin dicapai yaitu 5,8. Ditambahkan NaOH 0,1 N ketika pH terlalu rendah dan atau ditambahkan HCl 0,1 N ketika pH terlalu tinggi. Kemudian ditambahkan agargel dan botol digoyang-goyang hingga seluruh komponen larut. Langkah selanjutnya yaitu pensterilan dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit.

150 cawan petri diameter 6 cm, plastik *wrap* dan spidol disimpan di dalam laminar. Setelah media keluar dari autoklaf, media dituang ke dalam cawan petri.

Dari 100 mL media yang dibuat, didapatkan 11 buah media dari setiap perlakuannya. Kemudian media di-*seal* dengan plastik *wrap*, dituliskan keterangan perlakuannya lalu disimpan di rak media di ruang transfer.

3.4.3 Pemilihan kalus

Kalus yang digunakan adalah *clumps*/kumpulan kalus embriogenik yang diinduksi di Puslit Bioteknologi LIPI pada media induksi kalus (Lampiran 2). *Clumps* ini berasal dari eksplan basal meristem umbi bawang merah kultivar Sumenep hasil pemuliaan dari Balai Penelitian Tanaman Sayuran (Balitsa).



Gambar 5. Kalus embriogenik kultivar Sumenep

3.4.4 Persiapan ruang tanam dan penanaman

Laminar Air Flow Cabinet (LAFC) disterilkan dengan cara disinari lampu UV selama 20 menit. Setelah lampu UV mati, pintu LAFC dibuka kemudian *blower* dan lampu laminar dinyalakan selanjutnya LAFC disemprot alkohol 70% lalu dilap dengan tisu. Pinset bengkok, *scalpel*, cawan petri besar kosong dan yang berisi tisu disemprot alkohol 70% sebelum masuk laminar, begitupun cawan petri kecil berisi media, botol yang berisi kalus dan botol kecil berisi alkohol 70%. Tangan dalam kondisi steril dengan menyemprotkan alkohol 70%.

Pinset dikeluarkan dari bungkusnya lalu dicelupkan/direndam dalam botol kecil berisi alkohol 70%. Selanjutnya bunsen dinyalakan lalu cawan petri besar dilewatkan bagian dalamnya ke api lalu diletakkan tisu steril didalamnya menggunakan pinset yang telah dilewatkan ke api.

Kegiatan selanjutnya yaitu penanaman. *clumps*/kumpulan kalus embriogenik dikeluarkan dari botol jar. Mulut botol yang berisi kalus diputar didekat api kemudian dibuka tutupnya lalu kalus dikeluarkan dan diletakkan diatas cawan petri beralas tisu steril, botol ditutup kembali. Selanjutnya pemisahan *clumps* menjadi bagian-bagian yang lebih kecil sehingga berbentuk bulat dengan diameter

0,5 cm. Cawan petri kecil berisi media perlakuan dibuka *seal*-nya didekatkan ke api lalu *clumps* ditanam dengan menggunakan pinset. Pada setiap cawan petri ditanam 1 *clumps*. Cawan petri di-*seal* kembali dan dituliskan keterangan ulangannya. Penanaman dilakukan satu per satu dari setiap perlakuan, mulai dari ulangan pertama kemudian ulangan kedua hingga ulangan ketiga. Cawan petri yang berisi *clumps* di letakkan di ruang kultur (Lampiran 3).

Setiap kegiatan di laminar dilakukan dengan steril dengan mendekati kegiatan pada bunsen yang menyala didalam laminar dan ketika pinset tidak digunakan pinset dicelupkan/direndam dalam botol kecil berisi alkohol 70%.

3.4.5 Pemeliharaan

Pemeliharaan dilakukan di ruang kultur pada suhu 26 sampai 28°C pada intensitas cahaya 1000 sampai 1200 lux. Ruang kultur dilengkapi AC, pengukur suhu dan kelembapan. Pemeliharaan dilakukan dengan memastikan iklim mikro yang sesuai di ruang kultur dan mencegah sumber-sumber kontaminasi dengan cara membersihkan rak kultur secara berkala dengan menyemprotkan alkohol 70%.

3.4 Pengamatan

Pengamatan dan pencatatan dilakukan setiap tiga hari sekali dan satu minggu sekali sampai umur 5 minggu, dilakukan dengan cara mengambil foto *clumps* menggunakan mikroskop binokular dengan pembesaran 8 hingga 10 kali lalu disisipkan skala 2 mm pada foto.

3.5.1 Pengamatan penunjang

Pengamatan penunjang adalah pengamatan yang datanya tidak dianalisis secara statistik dan digunakan sebagai data penunjang pada pengamatan utama. Berikut parameter pengamatan utama:

a. Waktu munculnya tunas

Pengamatan dilakukan dengan mengamati dari munculnya tunas dari foto *clumps* yang telah diambil.

b. Waktu munculnya akar

Pengamatan dilakukan dengan mengamati dari munculnya akar dari foto *clumps* yang telah diambil.

c. Tahapan pertumbuhan kalus

Diamati fase/tahap-tahap embrio yang terbentuk, adakah yang berbentuk globular, jantung/*heart shape*, torpedo dari foto *clumps* yang telah diambil.

Pengamatan a,b dan c menggunakan foto *clumps* yang diambil setiap tiga hari sekali, hal ini dilakukan karena bentuk kalus yang cepat berubah.

3.5.2 Pengamatan utama

Pengamatan utama adalah pengamatan yang datanya diuji secara statistik. Pengamatan dilakukan untuk mengetahui efektifitas kombinasi zat pengatur tumbuh dalam media MS dan B5 pada pertumbuhan kalus embriogenik bawang merah kultivar Sumenep. Pengamatan dilakukan selama 5 minggu pada *clumps* di cawan petri. Berikut parameter pengamatan utama:

a. Diameter *clumps*

Pengukuran dilakukan dengan mengukur diameter *clumps* pada foto yang telah diambil.

b. Jumlah tunas yang terbentuk dari setiap *clumps*,

Penghitungan dilakukan dengan menghitung jumlah tunas dari foto *clumps* yang telah diambil.

c. Jumlah akar yang terbentuk dari setiap *clumps*

Penghitungan dilakukan dengan menghitung jumlah akar dari foto *clumps* yang telah diambil.

Pengamatan a, b dan c diamati menggunakan foto *clumps* yang diambil setiap satu minggu sekali. Analisis dilakukan pada data pengamatan minggu ke lima.