

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Tasikmalaya, yang berlangsung dari bulan September 2022 sampai bulan Januari 2023.

3.2 Alat dan bahan

Alat - alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah botol kultur, pisau, gunting, pinset, Autoklaf, neraca analitik, gelas ukur, cawan petri, spatula, alat *shaker*, bunsen, scalpel, alumunium foil karet gelang, *laminar air flow* (LAF) , rak kultur, stopwatch, kertas saring, handsprayer, *Magnetic hot plate stirrer*, Erlenmeyer 500 mL, beker *glass* 100 mL dan 1 L, *stapler*, plastik, *tissue*, kertas label, kompor, tabung gas, mistar, blender, labu takar 100 ml, alat tulis.

Bahan yang di gunakan pada penelitian ini adalah Media MS, ZPT Ekstrak tauge, ZPT IBA (*Indole Butryc Acid*) dan ZPT BAP (*Benzyl Amino Purine*), Myo-inositol, deterjen, akuades, sukrosa, unsur makronutrient dan mikronutrient untuk komposisi media MS (Murashige dan Skoog), alkohol 96%, natrium hidroksida (NaOH), fungisida, bakterisida, Spiritus, phytigel dan pH indikator universal.

3.3 Metode penelitian

Penelitian menggunakan metode eksperimental dengan rancangan percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Percobaan ini terdiri 7 perlakuan dan 4 kali ulangan, sehigga terdapat 28 unit percobaan. Setiap unit terdiri dari 2 botol kultur dan setiap botol terdiri dari 4 eksplan. Di subkultur pada hari ke 56 setelah tanam pada media yang sama. Ke tujuh perlakuan tersebut adalah:

A = MS (control)

B = MS + 0,5 mg/L IBA

C = MS + 1 mg/L BAP

D = MS + 150 g/L ekstrak tauge

E = MS + 0,5 mg/L IBA + 150 g/L ekstrak tauge

F = MS + 1 mg/L BAP + 150 g/L ekstrak tauge

$$G = MS + 0,5 \text{ mg/L IBA} + 1 \text{ g/L BAP}$$

3.4 Analisis data

Model linear berdasarkan rancangan percobaan acak lengkap (RAL) adalah sebagai berikut :

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

Dengan $i = 1, 2, \dots, t$ dan $j = 1, 2, \dots, r$

Keterangan:

Y_{ij} : Pengamatan pada perlakuan ke- i dan ulangan ke- j

μ : Rataan umum

τ_i : Pengaruh perlakuan ke- i

ε_{ij} : Pengaruh acak pada perlakuan ke- i dan ulangan ke- j

Berdasarkan model linear di atas dapat disusun dalam daftar sidik ragam sebagaimana Tabel

1. berikut ini.

Tabel 1. Daftar Sidik Ragam

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	Fhitung	Ftabel 5%
Perlakuan (k)	6	$\sum X_{ij}^2/r - X_{..}^2/RK$	JKk/dbk	KTk/KTg	2,57
Galat (g)	21	JKT- JKk	JKg/dbg		
Total (T)	27	$\sum X_{ij}^2 - X_{..}^2/rk$			

Sumber: (Susilawati, 2015)

Tabel 2. Kaidah Pengambilan Keputusan

Hasil Analisis	Analisis	Kesimpulan Percobaan
Fhitung \leq F 0,05	Tidak berbeda nyata	Tidak ada perbedaan pengaruh antar perlakuan
Fhitung $>$ F 0,05	Berbeda nyata	Terdapat perbedaan pengaruh antar perlakuan

Sumber: (Susilawati, 2015)

Bila hasil F hitung menunjukkan hasil yang berpengaruh nyata, maka dilakukan uji lanjut dengan jarak berganda duncan taraf 5% dengan rumus:

$$LSR = SSR (\alpha, \text{dbg}, p) \cdot S_x$$

Dengan rumus S_x sebagai berikut:

$$S_x = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r}}$$

Dengan keterangan rumus sebagai berikut:

- LSR = *Least Significant Range*
 SSR = *Significant Studentized Range*
 α = taraf nyata
 dbg = derajat bebas galat
 p = range (perlakuan)

3.5 Prosedur penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat

Alat - alat yang digunakan dalam penelitian harus dalam keadaan steril karena akan berpengaruh pada keberhasilan penelitian, maka dari itu alat - alat yang berbahan logam seperti pinset, scalpel, petridish, harus dicuci menggunakan sabun lalu dibilas dengan air bersih. Setelah itu alat dibungkus dengan kertas putih lalu direkatkan oleh selotip. Melapisi balutan kertas putih dengan plastik tahan panas dan ujung plastik distapler. Lalu diikat menggunakan karet gelang. Setelah itu memasukan alat yang sudah dibungkus kedalam Autoklaf untuk disterilisasi pada suhu 121 °C tekanan 15 psi selama 15 menit. Sterilisasi alat pada saat penanaman dilakukan dengan cara mencelupkannya ke dalam alkohol 96% dan membakarnya dengan bunsen.

3.5.2 Sterilisasi laminar air flow

- a. Menyemprotkan alkohol 70% ke dalam ruang laminar air flow.
- b. Membersihkan bagian laminar air flow yang tersemprot dengan tissue kertas
- c. Menyalakan Sinar UV selama 60 menit.

3.5.3 Sterilisasi rak inkubasi

- a. Menyemprotkan alkohol 70% ke bagian kaca rak inkubasi.
- b. Kaca yang sudah disemprot dilap dengan kain lap / tissue kertas.

3.5.4 Pembuatan Larutan Stok

- a. Pembuatan larutan stock hara makronutrien dan mikronutrien yang di gunakan dalam media MS adalah sebagai berikut:

Tabel 3. komposisi larutan stock untuk volume 1 liter.

Kode	Bahan Unsur	Kepekatan	Berat (g) untuk volume 1 liter	Volume Larutan stok untuk 1 liter Media (mL/L)
A	NH ₄ NO ₃	50x	82,5	20
B	KNO ₃	50x	95	20
C	KH ₂ PO ₄	200x	39	5
	H ₃ BO ₃		1,24	
	KI		0,166	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O		0,05	
	COCL ₂ ·6H ₂ O		0,005	
D	CaCl ₂ ·H ₂ O	200x	88	5
E	MgSO ₄ ·7H ₂ O	200x	74	5
	MnSO ₄		4,46	
	ZnSO ₄		1,72	
	CuSO ₄ ·H ₂ O		0,005	
F	Na ₂ EDTA	100x	3,730	10
	FeSO ₄ ·7H ₂ O		2,780	
Vitamin	Thiamine-HCl	100x	0,01	10
	Nicotinic acid		0,05	
	Pyridoxine-HCl		0,05	
	Glycine		0,2	
Myo- inositol	Myo-Inositol		10	10

Sumber: (Emiru Chimdessa, 2020)

- 1) Bahan kimia yang akan digunakan yaitu unsur hara makro dan mikro, ditimbang menggunakan timbangan analitik sesuai jumlah yang sudah ditentukan.
- 2) Melarutkan bahan yang sudah ditimbang satu per satu ke dalam erlenmeyer yang berisi 200 mL akuades secara terpisah sesuai dengan komposisi dari masing-masing larutan stok. Pembuatan larutan dimulai dengan melarutkan unsur NH₄NO₃ sebagai larutan stok A, KNO₃ sebagai larutan stok B, KH₂PO₄, H₃BO₃, KI, Na₂MoO₄·2H₂O, CoCl₂·6H₂O sebagai larutan stok C, CaCl₂·H₂O sebagai larutan stok D, MgSO₄·7H₂O, MnSO₄, ZnSO₄, CuSO₄·H₂O sebagai larutan E, dan Na₂EDTA, FeSO₄·7H₂O sebagai larutan F.
- 3) Semua bahan yang telah dilarutkan diaduk secara merata menggunakan hot plate magnetic stirrer, setelah semua unsur hara larut, maka larutan ditera sampai volume mencapai 1 L menggunakan gelas ukur.

- 4) Larutan stok hara makro yang sudah jadi sebanyak 1 L dimasukkan ke dalam botol gelas berwarna coklat. Selanjutnya botol diberi label dan tanggal pembuatan stok dan disimpan pada suhu lemari dingin.
 - 5) Botol larutan stok F dibungkus menggunakan aluminium foil agar tidak ada cahaya yang masuk, karena akan mempengaruhi reaksi dalam larutan tersebut
- b. Pembuatan larutan stock vitamin (Thiamine-HCl, Nicotinic acid, Pyridoxine-HCl, Glycine)
- 1) Menimbang masing-masing bahan vitamin menggunakan timbangan analitik.
 - 2) Memasukkan masing-masing vitamin kedalam 50ml aquadest steril dalam Erlenmeyer yang terpisah.
 - 3) Mengaduk menggunakan *magnetic stirrer* diatas *hotplate* tanpa dipanaskan.
 - 4) Setelah ke empat komponen larut dengan sempurna, dilakukan peneraan volume vitamin menjadi 100 mL menggunakan labu ukur dan memberi label (jenis larutan stock dan banyaknya pengambilan stock untuk pembuatan 1liter media).
 - 5) Larutan stok vitamin disimpan di dalam lemari pendingin untuk menjaga kualitas.
- c. Pembuatan larutan stok Myo-inositol, dilakukan dengan 10 kali konsentrasi yang disesuaikan dengan komposisi media MS dalam 100 mL akuades.
- d. Pembuatan larutan stok BAP dan IBA terdiri dari stok BAP dan IBA yang dibuat konsentrasi 1000 ppm sebanyak 100 ml.

Adapun tahapan pembuatannya sebagai berikut:

- 1) Menimbang hormon IBA dan BAP sebanyak 0,1 gram.
- 2) IBA yang telah ditimbang dilarutkan terlebih dahulu menggunakan basa kuat NaOH 1 N. Kemudian ditera dengan akuades steril hingga volume 100 mL.
- 3) BAP yang telah ditimbang dilarutkan terlebih dahulu menggunakan asam kuat yaitu HCl 1 N, kemudian setelah larut ditambahkan akuades steril hingga volume 100 mL.
- 4) Larutan stok hormon disimpan di lemari pendingin.

3.5.5 Pembuatan Media MS (Murashige and Skoog)

Berikut cara pembuatan media MS:

Pengambilan larutan stok menggunakan rumus:

$$V_1N_1 = V_2N_2$$

Keterangan:

V_1 = Volume larutan stok yang akan di ambil

V_2 = 1000 ml atau 1 l

N_1 = Berat (g) atau (mg) senyawa yang di sesuaikan dengan kebutuhan komposisi media dalam 1000 ml larutan stok

N_2 = Berat (mg) senyawa yang di sesuaikan dengan kebutuhan komposisi media dalam 1000 ml atau 1 L

- 1) Pengambilan larutan stok serta ZPT IBA, ZPT BAP, dan ZPT ekstrak taugé sesuai perlakuan, larutan dimasukan dikedalam Erlenmeyer ukuran 1 liter.
- 2) Lalu dimasukan sukrosa 30g/L dan zat pengatur tumbuh dengan konsentrasi sesuai perlakuan, lalu tambahkan aquades sampai volume 900 ml.
- 3) Mengukur larutan menggunakan kertas lakmus PH meter usahakan PH antara 5,5 sampai 5,8.
- 4) Agar 3 g/L di tambahkan kedalam larutan lalu ditambahkan aquades sampai 1 liter.
- 5) Sambil di aduk medium yang berisi larutan media dipanaskan sampai mendidih kemudian masukan kurang lebih 25 ml (sesuaikan dengan volume botol) ke dalam botol kultur dan tutup rapat dengan tutup botol.
- 6) Pelabelan botol, label bertuliskan jenis dan konsentrasi ZPT yang ditambahkan.
- 7) Melakukan sterilisasi media dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C tekanan 15 psi selama 60 menit. Setelah itu keluarkan dari *autoclave* dan simpan di ruang penyimpanan.

3.5.6 Pembuatan ekstrak taugé

- 1) Menyiapkan 100gr taugé dan 100mL aquades. Lalu taugé dibersihkan dari kulitnya .
- 2) Taugé dicuci bersih lalu dihancurkan menggunakan blender sampai halus.
- 3) Menyaring ekstrak taugé dengan menggunakan saringan dan disimpan pada wadah steril.
- 4) Menimbang hasil ekstrak taugé sebanyak 1000mg kemudian dimasukan ke dalam Erlenmeyer ukuran 1000ml.
- 5) Menambahkan aquades steril pada Erlenmeyer sampai volume 1 liter.
- 6) Memasukan bahan yang telah dilarutkan kedalam botol dan diberi label.

3.5.7 Sterilisasi eksplan

Cara sterilisasi eksplan dilakukan dengan melepaskan selaput berserat dari biji manggis. Biji dibersihkan arilnya, setelah bersih biji manggis dicuci lalu direndam dengan deterjen encer selama 10 menit setelah itu dibilas dan dimasukkan ke *laminar air flow* (LAF). Kemudian eksplan direndam dengan fungisida 20% selama 30 menit. Selanjutnya, biji dibilas dengan Aquades steril 3 kali, dan direndam kembali dalam alkohol 70% selama 5 menit dan bilas dengan Aquades steril 3 kali. Kemudian eksplan direndam pada larutan Bayclin 20% selama 15 menit dan dibilas lagi dengan Aquades steril 3 kali.

3.5.8 Persiapan ruang tanam dan penanaman

Semua bagian LAF dibersihkan menggunakan tissue dengan alkohol 70% kecuali filter hefa, lalu disemprot kembali menggunakan alkohol 70% dan dibiarkan menguap. Lampu Ultraviolet (UV) dinyalakan selama 30 menit. Setelah itu dinyalakan blower dan lampu biasa. Penanaman dilakukan didalam *Laminar Air Flow* (LAF). Biji manggis dibelah melintang menjadi 4 bagian, lalu tanam ke media sesuai perlakuan, setiap botol kultur diisi 4 eksplan. Lalu botol ditutup dengan rapat menggunakan tutup botol. Kemudian diberi label pada botol dan disimpan diruang inkubasi pada suhu 20° -22° C, selanjutnya dilakukan subkultur pada umur 56 hari setelah tanam pada tiap media sesuai perlakuan. Lalu dilakukan periode penggelapan dengan cara menutup permukaan botol kultur dengan kertas karton berwarna hitam pada umur 28 sampai 56 hari setelah subkultur, dan dilakukan pengamatan pasca periode gelap.

3.5.9 Pemeliharaan

Botol kultur yang berisi eksplan disimpan diruang inkubasi menggunakan suhu 20 sampai 22° C dan dilakukan penyinaran lampu 1000 lux yang menyala selama 24 jam. Menjaga kesterilan alat yang masuk kedalam ruangan. Pengamatan dilakukan setiap hari sekali. Apabila ada eksplan yang terkontaminasi dikeluarkan dan diganti dengan kultur tanaman cadangan. Membuang eksplan yang telah terkontaminasi supaya tidak mengganggu eksplan yang lain.

3.6 Variabel pengamatan

3.6.1 Pengamatan penunjang

1. Kondisi umum pertumbuhan eksplan
2. Kontaminasi

Kegiatan ini meliputi pengamatan secara keseluruhan kondisi umum pada eksplan yang ada, seperti faktor lingkungan dan terjadinya kontaminasi.

3.6.2 Pengamatan utama

1. Persentase eksplan berkalus per ekplan setelah tanam inisiasi

Perhitungan persentase eksplan berkalus dilakukan setiap 2 minggu yaitu dimulai pada hari ke 28 setelah tanam, hari ke 42 setelah tanam, dan hari ke 56 setelah tanam, dengan cara menghitung jumlah kalus yang terbentuk.

2. Persentase eksplan berkalus per ekplan setelah tanam subkultur

Perhitungan persentase eksplan berkalus dilakukan setiap 2 minggu yaitu dimulai pada hari ke 14 setelah subkultur, hari ke 28 setelah subkultur, dan hari ke 56 setelah subkultur, dengan cara menghitung jumlah kalus yang terbentuk.

3. Jumlah tunas per eksplan

Perhitungan jumlah tunas per eksplan dilakukan pada hari ke 42 setelah subkultur, hari ke 56 setelah subkultur. Dengan cara menghitung tunas adventif yang tumbuh.

4. Jumlah nodul per eksplan setelah subkultur

Jumlah nodul setelah subkultur diamati pada hari ke 42 setelah subkultur dan hari ke 56 setelah subkultur, dengan cara menghitung jumlah nodul yang muncul.