

BAB 3

PROSEDUR PENELITIAN

3.1 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode *true experimental methods*. Menurut Sugiyono (2017) “Dikatakan *true experimental* (eksperimen yang sesungguhnya), karena dalam desain ini, penelitian dapat mengontrol semua variabel luar yang mempengaruhi jalannya eksperimen”.

3.2 Variabel Penelitian

3.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu konsentrasi *Naphtaleine Acetic Acid* (NAA).

3.2.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu pertumbuhan kentang (*Solanum tuberosum* L.) dengan parameter jumlah akar, jumlah daun, jumlah tunas dan tinggi *planlet*.

3.2.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah suhu ruangan inkubasi, dengan suhu ruangan *air conditions* (AC) 16°C.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah 50 *planlet* kentang hasil kultur *in vitro* berumur ± 3 bulan yang diambil di Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Jenderal Soedirman yang dapat dilihat pada **gambar 3.1**.



Gambar 3.1 Populasi *Planlet* Kentang
Sumber: Dokumentasi Pribadi

3.3.2 Sampel

Pemilihan sampel dalam penelitian ini berdasarkan teknik simple random sederhana (*simple random sampling*). Menurut Sugiyono (2012), Simple random sampling merupakan metode yang digunakan untuk memilih sampel dari populasi secara acak sederhana sehingga setiap anggota populasi mempunyai peluang yang sama besar untuk diambil sebagai sampel. Sampel yang diambil sebanyak 25 *planlet* yang berumur ± 3 bulan sebelum di subkultur dengan tinggi 2 cm yang dapat dilihat pada **gambar 3.2**.



Gambar 3.2 Sampel *Planlet* Kentang
Sumber: Dokumentasi Pribadi

3.4 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Sebagai suatu patokan, jumlah ulangan dianggap telah cukup baik bila memenuhi persamaan $(t - 1)(r - 1) \geq 15$, dengan t = jumlah perlakuan dan r = jumlah ulangan (Hernawan, 2018) dimana:

$$\begin{array}{ll} (t - 1)(r - 1) & \geq 15 \\ (5 - 1)(r - 1) & \geq 15 \\ (4)(r - 1) & \geq 15 \\ 4r - 5 & \geq 15 \\ 4r & \geq 20 \\ R & \geq 5 \end{array}$$

Berdasarkan rumusan tersebut, maka jumlah ulangan sebanyak 5 kali, dengan demikian jumlah total unit penelitian adalah 5×5 ulangan = 25 unit penelitian.

3.5 Langkah-langkah Penelitian

Tahap yang dilakukan dalam penelitian ini secara umum terbagi menjadi dua tahap, yaitu tahap persiapan dan tahap pelaksanaan.

3.5.1 Tahap Persiapan

- 1) Mendapatkan Surat Keputusan Dekan Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Siliwangi mengenai penetapan bimbingan skripsi pada tanggal 25 November 2020
- 2) Mempersiapkan judul dan konsultasi permasalahan yang akan diteliti dengan pembimbing I dan pembimbing II pada tanggal 5 Desember 2020;
- 3) Mengajukan judul ke DBS (Dewan Bimbingan Skripsi) pada tanggal 7 Desember 2020;
- 4) Menyusun proposal penelitian dengan bimbingan pembimbing I dan pembimbing II 16 Desember 2020;
- 5) Mengajukan permohonan seminar proposal penelitian ke DBS (Dewan Bimbingan Skripsi) pada tanggal 20 Juli 2021;
- 6) Melaksanakan seminar proposal penelitian dan mendapat saran serta masukan mengenai proposal penelitian pada tanggal 29 Juli 2021;
- 7) Mengonsultasikan proposal penelitian dengan pembimbing I dan pembimbing II untuk memperbaiki proposal penelitian 9 Agustus 2021;
- 8) Melaksanakan proses penelitian selama ± 2 bulan dari mulai tanggal 6 September 2021;
- 9) Mengolah data, menyusun pembahasan skripsi dan bimbingan pembimbing I dan pembimbing II 12 Juli 2023;
- 10) Penyusunan dan bimbingan skripsi 21 Agustus 2023;
- 11) Seminar hasil pada tanggal 22 Desember 2023;
- 12) Sidang skripsi pada tanggal 20 Februari 2024

3.5.2 Tahap Pelaksanaan

3.5.2.1 Tahapan Persiapan Alat

Dalam penelitian ini terdapat beberapa alat yang digunakan (gambar dapat dilihat pada **Lampiran 2**), yaitu:

Tabel 3.1 Alat-alat Penelitian

No	Nama Alat	Jumlah	Fungsi
1.	Pipet ukur 10 μ M	1	Untuk mengukur volume media sesuai konsentrasi yang diinginkan
2.	Botol kultur	25	Untuk tempat planlet tumbuh selama proses subkultur berlangsung
3.	Cawan petri	2	Untuk penyimpanan sementara planlet ketika dikeluarkan dari media tanam yang lama dan dipindahkan ke dalam media tanam yang baru
4.	Gelas kimia 1000 ml	1	Untuk menghomogenkan media <i>murashige and skoog</i> (MS)
5.	Gelas kimia 250 ml	5	Untuk menyimpan media tanam perlakuan
6.	Erlenmeyer 500 ml	5	Untuk menyimpan larutan stok
7.	Pinset	2	Untuk memindahkan planlet
8.	Tangkai <i>scapel</i> dan mata pisau <i>scapel</i>	2	Untuk memisahkan planlet yang saling menempel
9.	Bunsen	2	Untuk sterilisasi pinset dan <i>scapel</i> ketika proses subkultur
10.	<i>Autoclave</i>	1	Untuk sterilisasi alat dan media
11.	Kompas gas	1	Untuk memanaskan <i>autoclave</i>
12.	<i>Hot plate</i>	1	Untuk memanaskan dan menghomogenkan media
13.	Pengukur Ph	5	Untuk mengukur pH media
14.	Batang pengaduk	5	Untuk mengaduk media

15.	Alumunium foil	1	Untuk melapisi botol kultur
16.	Plastik <i>wrapping</i>	1	Untuk melapisi alumunium foil
17.	Kertas payung	2	Untuk melapisi alat ketika akan disterilisasi
18.	Kertas label	1	Untuk memberi nama setiap perlakuan pada botol kultur
19.	Karet	60	Untuk mengikat aluminium
20.	Laminar Air Flow (LAF)	1	Tempat steril untuk pelaksanaan subkultur
21.	Penggaris	1	Untuk mengukur tinggi tanaman

3.5.2.2 Tahap Persiapan Bahan

Dalam penelitian ini terdapat beberapa bahan yang digunakan (gambar dapat dilihat pada **Lampiran 2**), yaitu:

Tabel 3.2 Bahan-bahan Penelitian

No	Nama Bahan	Sumber bahan	Fungsi
1.	Planlet kentang	Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Soedirman	Dibutuhkan 25 <i>planlet</i> kentang granola
2.	Media <i>Murashige and skoog</i> (MS)	Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Siliwangi	Dibutuhkan sebanyak 4,43 g/L
3.	NAA	Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Siliwangi	Dibutuhkan sebanyak 10 μ M NAA

4.	Larutan HCL	Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Siliwangi	Dibutuhkan sebanyak 1M
5.	Larutan NaOH	Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Siliwangi	Dibutuhkan sebanyak 1M
6.	Agar	Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Siliwangi	Dibutuhkan sebanyak 8 g/l (1,6 g/l untuk satu media kontrol, 6,4 g/l untuk empat media perlakuan)
7.	Sukrosa	Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Siliwangi	Dibutuhkan sebanyak 20 g/l
8.	Alkohol 70%-96%	Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Siliwangi	Dibutuhkan secukupnya
9.	Aquades	Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Siliwangi	Dibutuhkan secukupnya

3.5.2.3 Tahap Sterilisasi Alat

Tahap-tahap sterilisasi alat yang digunakan untuk proses subkultur ialah sebagai berikut:

- 1) Berdasarkan **gambar 3.3** mencuci alat-alat hingga bersih, kemudian lap dengan tisu sampai kering. Botol-botol yang akan disterilisasi sebelumnya ditutup dengan aluminium foil dan diikat dengan karet, kemudian dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dan diikat kembali dengan karet. Sedangkan alat-alat selain botol dilapisi dengan kertas payung lalu dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dan diikat dengan karet;



Gambar 3.3 Pencucian Alat
Sumber: Dokumentasi Pribadi

- 2) Alat-alat disterilisasikan menggunakan *autoclave* seperti **gambar 3.4** pada temperature 121 mpa dan tekanan 1 atm selama 30 menit. Alat-alat yang sudah disterilisasikan selanjutnya disimpan pada tempat yang bersih dan siap digunakan;



Gambar 3.4 Sterilisasi Alat
Sumber: Dokumentasi Pribadi

- 3) Sterilisasi *laminar air flow* sebelum melakukan penanaman subkultur seperti **gambar 3.5** dilakukan dengan menyemprotkan alkohol 96% pada permukaan *laminar air flow* kemudian di lap menggunakan tisu yang sudah dicelupkan alkohol 96%. Lalu menyalakan lampu UV pada *laminar air flow* sebelum digunakan selama 1-2 jam untuk mematikan kontaminan yang ada di permukaan *laminar air flow*.



Gambar 3.5 Sterilisasi *Laminar Air Flow*
Sumber: Dokumentasi Pribadi

3.5.2.4 Tahap Pembuatan Media

Untuk perlakuan media dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu:

- 1) Perlakuan A (P0): Tanpa zat pengatur tumbuh NAA
- 2) Perlakuan B (P1): Zat pengatur tumbuh NAA 1 μM
- 3) Perlakuan C (P2): Zat pengatur tumbuh NAA 2 μM
- 4) Perlakuan D (P3): Zat pengatur tumbuh NAA 3 μM
- 5) Perlakuan E (P4): Zat pengatur tumbuh NAA 4 μM

Selanjutnya pembuatan media perlakuan adalah sebagai berikut:

- 1) Menyiapkan bahan media Murashige dan Skoog sesuai dengan takaran, yakni media Murashige dan Skoog sebanyak 4,43 g/L.
- 2) Memasukkan bahan media Murashige dan Skoog ke dalam gelas kimia, kemudian larutkan dengan aquades steril.
- 3) Tambahkan NAA sesuai perlakuan dan 30 g/L gula kedalam media;
- 4) Mengecek derajat keasaman dengan memasukkan indikator pH ke dalam media. Derajat keasaman media Murashige dan Skoog harus antara 5,6-5,8. Jika terlalu basa tambahkan HCl 1N, namun jika terlalu asam tambahkan NaOH 1N.
- 5) Lalu, campurkan pematat (bubuk agar) sebanyak 7 g/L dan tambahkan kembali aquades steril hingga larutan 1000 ml serta panaskan larutan media Murashige dan Skoog tersebut di atas *hot plate* hingga mengeluarkan gelembung seperti **gambar 3.6**.

- 6) Setelah itu media dituangkan ke dalam botol-botol subkultur yang sudah disterilkan terlebih dahulu dan ditutupnya menggunakan *aluminium foil* dan plastik *wrap*.
- 7) Memasukkan media ke dalam *autoclave* selama ± 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm.
- 8) Media bisa digunakan 4 sampai 5 hari setelah proses sterilisasi, hal ini dilakukan supaya melihat kesterilan media sebelum dilakukan penanaman eksplan dan simpan dalam tempat yang steril bersuhu 16°C .



Gambar 3.6 Pembuatan Media
Sumber: Dokumentasi Pribadi

3.5.2.5 Tahap Pemilihan *Planlet*

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah *planlet* kentang (*Solanum tuberosum* L.), *planlet* tersebut merupakan hasil proses kultur *in vitro* pada penelitian-penelitian sebelumnya yang terdapat di Laboratorium kultur jaringan Universitas Siliwangi. Proses penanaman *planlet* membutuhkan cawan petri yang berfungsi sebagai alas untuk memisahkan beberapa eksplan yang menyatu atau menempel sehingga eksplan dapat ditanam di media MS yang sudah disediakan sebelumnya. Selain itu alat yang dibutuhkan yakni pinset untuk mengambil eksplan dan *scapel* untuk memotong atau memisahkan eksplan.

3.5.2.6 Tahap Subkultur (*Overplanting*) *Planlet*

Subkultur (*overplanting*) seperti pada **gambar 3.7** dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut:

- 1) Menyiapkan semua alat yang dipakai yaitu: *scapel*, *planlet*, mata pisau *scapel*, lampu spirtus, botol media, botol berisi *planlet* yang telah tumbuh,

gelas kimia 250 ml berisi aquades steril dan gelas kimia 250 ml berisi alkohol 96%;

- 2) Gelas kimia aquades steril dan alkohol 96% disemprot terlebih dahulu dengan alkohol sebelum dimasukkan ke dalam LAF;
- 3) *Overplanting* dimulai dengan menyiapkan dan memasukan alat-alat yang diperlukan kedalam LAF
- 4) Pinset dan scapel diletakkan pada gelas kimia yang berisi alkohol 90% agar tetap steril, ketika akan digunakan panaskan pinset terlebih dahulu diatas api kemudian masukan ke dalam gelas kimia berisi aquades steril lalu keringkan diatas kertas saring;
- 5) *Planlet* dari botol diambil dengan pinset dan diletakkan di atas cawan petri sebanyak 25 *planlet*, dikeluarkan dengan cara menjepit bagian di antara akar dan daun kemudian ditarik dengan diusahakan akar keluar lebih dahulu. Kemudian pisahkan *planlet* yang masih berhimpitan dengan *planlet* yang lain secara aseptis;
- 6) Pilih bagian tengah batang *planlet* yang siap ditanam, lalu potong sekitar 2 menggunakan scapel;
- 7) *Planlet* ditanam di dalam media steril yang telah diletakkan di lemari inkubasi steril selama 3-4 hari sebelumnya;
- 8) *Planlet* yang telah ditanam di medium yang baru disimpan di dalam rak inkubasi dengan suhu 16°C;
- 9) *Planlet* didiamkan selama 6 minggu tanpa dilakukan subkultur berikutnya dan diamati pertumbuhan pada *planlet* tersebut.



Gambar 3.7 Subkultur
Sumber: Dokumentasi Pribadi

3.5.2.7 Pemeliharaan dan Pengamatan *Planlet*

Planlet kentang (*Solanum tuberosum* L.) hasil dari proses kultur *in vitro* sebelumnya yang terdapat di Laboratorium kultur jaringan Universitas Siliwangi yang telah di tumbuhkan pada media MS (*murashige and skoog*) dilakukan pengecekan terhadap parameter yang telah ditentukan setiap 1 minggu sekali dalam 6 minggu.

3.6 Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah teknik observasi. Observasi dilakukan dengan pengamatan pertumbuhan *planlet* kentang dengan pengecekan jumlah tunas, jumlah daun, jumlah akar dan tinggi batang sebagai parameter pengamatan. Untuk pengamatan jumlah tunas, jumlah daun, jumlah akar, dilakukan satu kali dalam seminggu selama 6 minggu, sedangkan penghitungan tinggi batang dihitung hanya pada awal dan akhir waktu penelitian. Pengamatan jumlah tunas, jumlah daun, jumlah akar menggunakan pengamatan kasat mata tanpa alat bantu, pengamatan tinggi batang dengan menggunakan penggaris.

3.7 Instrumen Penelitian

3.7.1 Konsepsi

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabel pengamatan (Lampiran 3)

3.7.2 Standar Pengukuran

- 1) Tinggi *planlet* (cm) diukur dari pangkal batang sampai ujung daun terpanjang, pengukuran dilakukan menggunakan penggaris. Pengamatan dilakukan sekali dalam satu minggu selama enam minggu (selama Subkultur/ *overplanting* berlangsung);
- 2) Jumlah daun (helai) dihitung dari semua daun yang terbentuk, pengamatan dilakukan sekali dalam satu minggu selama enam minggu (selama Subkultur/ *overplanting* berlangsung);
- 3) Jumlah tunas (anakan) dihitung dari jumlah tunas yang terbentuk, pengamatan dilakukan sekali dalam satu minggu selama enam minggu (selama Subkultur/ *overplanting* berlangsung);

- 4) Jumlah akar (helai) dihitung dari semua akar yang terbentuk, pengamatan dilakukan sekali dalam satu minggu selama enam minggu (selama Subkultur/ *overplanting* berlangsung)

3.8 Teknik Analisis Data

Setelah pengumpulan data dilakukan, maka data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan program perhitungan SPSS-23 atau secara singkat adalah melalui tahap sebagai berikut:

1) Uji Normalitas Data

Data yang diperoleh diolah secara statistic menurut cara Lilliefors dengan menggunakan metode Kolmogorov, jika signifikan kurang dari 0,05 ($P\text{-Value} < 0,05$) maka H_a diterima dan H_0 ditolak dan kesimpulannya data tidak berdistribusi normal, jika signifikan lebih dari 0,05 ($P\text{-Value} < 0,05$) maka H_a ditolak dan H_0 diterima dan kesimpulannya data berdistribusi normal. Pada penelitian ini, nilai signifikan kurang dari 0,05 ($P\text{-Value} < 0,05$) maka H_0 ditolak dan H_a diterima yang artinya data tidak berdistribusi normal maka dilanjut ke uji non parametrik kruskal wallis.

2) Uji Kruskal Wallis

Uji kruskal wallis digunakan untuk menganalisis adakah perbedaan signifikan diantara perlakuan yang dilakukan. Uji kruskal wallis merupakan salah satu test yang digunakan untuk membandingkan median dari tiga atau lebih sampel pada satu variabel dependen (Kruska-Miller, 2014). Dengan kata lain, hasil pengujian kruskal wallis untuk tiga atau lebih sampel independen memperlihatkan apakah tiga atau lebih sampel tersebut berasal dari distribusi yang sama. Penarikan kesimpulan dilihat dari nilai signifikansi 5%. Jika hasil dari analisis sidik ragam adalah nilai signifikansi lebih dari 0,05 ($P\text{ Value} > 0,05$) maka H_0 diterima dan H_a ditolak dengan kesimpulan “Tidak terdapat pengaruh secara signifikan”. Jika nilai signifikansi kurang dari 0,05 ($P\text{ Value} < 0,05$) maka H_0 ditolak dan H_a diterima dengan kesimpulan “Terdapat Pengaruh secara signifikan” atau “Berpengaruh nyata/Berpengaruh sangat nyata”. Pada penelitian ini, parameter pertumbuhan yang memiliki kesimpulan dari uji kruskal wallis adalah “terdapat pengaruh secara signifikan” atau “berpengaruh

nyata/berpengaruh sangat nyata” maka dilanjut dengan *post hoc test* (uji lanjutan) menggunakan uji Dunn.

3) Uji lanjut

Uji non parametrik kruskal wallis hanya memberikan indikasi tentang ada atau tidak beda antara rata-rata keseluruhan perlakuan, namun belum memberikan informasi tentang ada tidaknya perbedaan antar individu perlakuan yang satu dengan yang lain atau untuk mengetahui perlakuan terbaik yang mempengaruhi variabel terikat yang telah ditentukan. Oleh sebab itu dilakukan *Post-Hoc Test* (Uji Lanjut) dengan menggunakan uji Dunn. Uji Dunn digunakan untuk perbandingan ganda antara kelompok-kelompok dalam uji non parametrik setelah uji Kruskal Wallis. Uji ini membantu mengidentifikasi perbedaan yang signifikan antara pasangan kelompok dengan mengoreksi tingkat signifikansi untuk menghindari kesalahan.

Hasil pengolahan data menggunakan program perhitungan SPSS-23 secara rinci terlampir pada **Lampiran**.

3.9 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu pelaksanaan ini dimulai bulan Agustus 2021 sampai Desember 2021. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Jurusan Pendidikan Biologi Universitas Siliwangi.

