

BAB III METODE PERCOBAAN

3.1 Tempat dan Waktu Percobaan

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi, Tasikmalaya. Percobaan dilaksanakan pada bulan Mei sampai dengan bulan Agustus 2018.

3.2 Alat dan Bahan Percobaan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: *autoclaf*, alat tulis, refrigerator, timbangan analitik, botol-botol kultur, sarung tangan elastis, karet gelang, *erlenmeyer*, gelas piala, *petridish* atau cawan petri, pisau atau *scalpel*, *Hand sprayer*, *laminar air flow* (LAF), pinset, gunting, kertas lakmus, kertas label, aluminium foil.

Adapun bahan-bahan yang digunakan adalah: biji manggis (*Garcinia mangostana* L.) asal Puspahiang, Tasikmalaya, media dasar Murashige dan Skoog (MS), vitamin, agar dan zat pengatur tumbuh : IBA (Auksin) dan BAP (Sitokinin), alkohol, aquadest, bayclin, fungisida, detol, pitagel, plastik PP.

3.3 Rancangan Percobaan

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental dengan Rancangan percobaan Acak Lengkap (RAL) yang diulang sebanyak 3 kali disusun secara faktorial, dengan dua faktor percobaan yaitu:

a. Faktor kesatu yaitu Penambahan IBA (I) pada media dengan konsentrasi yang terdiri dari 3 taraf :

$$i_0 = 0 \text{ mg/L}$$

$$i_1 = 3 \text{ mg/L}$$

$$i_2 = 5 \text{ mg/L}$$

b. Faktor kedua yaitu Penambahan BAP (B) pada media dengan konsentrasi yang terdiri dari 4 taraf :

$$b_0 = 0 \text{ mg/L}$$

$$b_1 = 5 \text{ mg/L}$$

$$b_2 = 10 \text{ mg/L}$$

$$b_3 = 15 \text{ mg/L}$$

Dengan demikian, diperoleh 12 kombinasi perlakuan dan masing-masing kombinasi perlakuan diulang 3 kali, sehingga menghasilkan 36 unit percobaan (Tabel 3.)

Tabel 3. Kombinasi Perlakuan IBA dengan BAP

IBA (i)	BAP (b)			
	b_0	b_1	b_2	b_3
i_0	i_0b_0	i_0b_1	i_0b_2	i_0b_3
i_1	i_1b_0	i_1b_1	i_1b_2	i_1b_3
i_2	i_2b_0	i_2b_1	i_2b_2	i_2b_3

Data hasil perlakuan dianalisis untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap variabel yang diamati dengan ANOVA atau sidik ragam menggunakan uji F (Herdiyantoro, 2013). Model linier rancangan acak lengkap faktorial adalah sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Y_{ijk} : pengamatan pada satuan percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan taraf ke-i dari Faktor kesatu, taraf ke-j dari Faktor kedua

μ : nilai tengah umum

α_i : pengaruh taraf ke-i dari Faktor kesatu

β_j : pengaruh taraf ke-j dari Faktor kedua

$(\alpha\beta)_{ij}$: pengaruh interaksi dari taraf ke-i dari Faktor kesatu dan taraf ke-j dari Faktor kedua

ε_{ijk} : pengaruh acak dari satuan percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij.

Tabel 4. Tabel Analisis Ragam (ANOVA)

Sumber ragam	Db	JK	KT	F hit.	F tab. 5%
Perlakuan	11	$\sum T^2/u - FK$	JK_p/Db_p	KT_p/KT_G	2,22
IBA (i)	2	$\sum i^2/ri - FK$	JK_i/db_i	KT_i/ KT_G	3,40
BAP (b)	3	$\sum b^2/rb - FK$	JK_b/db_b	KT_b/ KT_G	3,01
I x B	6	$JK_p - JK_i - JK_b$	$JK_{i,b}/db_{i,b}$	$KT_{i,b}/ KT_G$	2,51
Galat	24	$JK_T - JK_U - JK_P$	JK_G/db_G		
Total	35	$\sum X^2 - FK$			

Tabel 5. Kaidah Pengambilan Keputusan

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

Jika dari uji F terdapat perbedaan nyata, maka dilakukan uji lanjut jarak berganda Duncan pada taraf tidak nyata 5 % dengan rumus $LSR = S_x \times SSR$.

Nilai S_x dapat dicari dengan rumus sebagai berikut :

1. Bila terjadi interaksi

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

2. Bila berbeda nyata pada perlakuan IBA

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

3. Bila berbeda nyata pada perlakuan BAP

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

Keterangan LSR = *Least Significant Ranges*;

SSR = *Studentized Significant Ranges*; S_x = galat baku rata-rata;

KT Galat = kuadrat tengah galat;

r = jumlah ulangan;

i = jumlah perlakuan i;

b = jumlah perlakuan b (sumber: Gomez dan Gomez, 2007).

3.4 Pelaksanaan Percobaan

3.4.1. Sterilisasi alat

Seluruh peralatan yang dipersiapkan dicuci dengan menggunakan sabun cuci, dibilas, kemudian dikeringkan. Alat-alat yang sudah kering dibungkus dengan kertas koran/aluminium foil. Semua alat disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 Psi (kg/cm^2) selama 45 menit. Alat-alat yang tidak tahan dengan suhu panas cukup disterilisasi dengan menggunakan alkohol.

3.4.2 Pembuatan larutan stok

1) Garam mineral, vitamin dan asam amino

Pembuatan larutan stok dilakukan dengan ketentuan seperti pada Tabel 6.

Tabel 6. Larutan Stok

Kode botol	Senyawa	Banyaknya (gram)	Konsentrasi (mg/L)	Volume (ml/L)
A	NH ₄ NO ₃	82,500	1650,000	20
B	KNO ₃	95,000	1900,000	20
C	KH ₂ PO ₄	39,000	195,000	5
	H ₃ BO ₃	1,240	6,200	
	KI	0,166	0,830	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,050	0,250	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,005	0,025	
D	CaCl ₂ .H ₂ O	88,000	440,000	5
E	MgSO ₄ .7H ₂ O	74,000	370,000	5
	MnSO ₄	4,460	22,300	
	ZnSO ₄	1,720	8,600	
	CuSO ₄ H ₂ O	0,005	0,025	
F	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	3,730	37,300	10
	FeSO ₄	2,780	27,800	
MYO	Mioinositol	10	100,000	10
Vit	Thiamine	0,010	0,100	10
	Nicotinic acid	0,050	0,500	
	Pyridoxine	0,050	0,500	
	Glycine	0,200	2,000	

- 2) ZPT IBA dan BAP konsentrasi 1000 mg/L dengan langkah : (a) menimbang IBA dan BAP masing-masing 0,1 g dan masukan ke *beker glass* diberikan 30 ml *aquadest*, (b) mengaduk larutan tersebut sampai homogen, (c) ditambahkan *aquadest* hingga volume larutannya menjadi 100 ml, (d) selanjutnya dipindahkan ke *erlenmeyer* kecil dan tutup rapat, kemudian disimpan di lemari pendingin.

3.4.3 Pembuatan media MS (Murashige dan Skoog)

Langkah – langkahnya sebagai berikut :

- (a) Menuangkan air steril (300 ml) kedalam *erlenmeyer* lalu menambahkan larutan A sampai F sesuai urutan, dan diaduk hingga larut,
- (b) Mencampurkan larutan vitamin dan hormon IBA dan BAP yang telah diberikan konsentrasi yang berbeda sesuai perlakuan
- (c) Menambahkan sukrosa 30 gr/L dan aquadest sampai volume 1 L,
- (d) Kemudian mengukur pH kisaran 5,8 dengan kertas lakmus indikator universal, apabila kurang ditambah NaOH dan apabila pH lebih tinggi ditambahkan HCl,
- (e) Menambahkan kedalam larutan tersebut agar-agar (pitagel) 2,5 g/L dan dipanaskan hingga media larut dan mendidih sambil diaduk-aduk, kemudian menuangkan pada botol kultur dengan segera kedalam *erlenmeyer* (1000ml) yang sudah steril, lalu botol ditutup dengan plastik bening dan mengikatnya dengan karet yang sudah disemprot alkohol 70%,
- (f) Selanjutnya disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan tekanan $\geq 1,5$ psi, dan pada temperatur 121°C, setelah selesai media yang sudah steril tersebut disimpan di ruang penyimpanan media
- (g) Dibiarkan selama 1 sampai 2 minggu dan media siap digunakan atau ditanamkan.

3.4.4 Sterilisasi Eksplan

Buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) diperoleh dari petani manggis di Kecamatan Puspahiang Kabupaten Tasikmalaya. Bagian buah manggis yang dijadikan eksplan adalah belahan biji manggis.

Tahapan isolasi belahan biji manggis adalah sebagai berikut :

- (a) Mencuci buah manggis dengan air mengalir,
- (b) Membuka kulit manggis sampai daging buahnya terlihat
- (c) Membuka daging buah sampai terlihat biji terbuang lendirnya
- (d) Direndam dengan larutan detol 0,1% (10 ml dalam aquadest hingga volume 1000 ml) selama 2 menit, kemudian dibilas dengan *aquadest*

sebanyak 3 kali , lalu direndam dalam fungisida 0,1% (dilarutkan dengan aquadest hingga volume 1000 ml) selama 2 menit, kemudian bilas dengan *aquadest* sebanyak 3 kali. Selanjutnya disterilisasi di *laminar air flow* (LAF) menggunakan bayclin 1,3% selama 7 menit, dibilas dengan *aquadest* sebanyak 3 kali, kemudian sterilisasi dengan alkohol 70% selama 2 menit, dibilas dengan *aquadest* sebanyak 3 kali.

- (e) Setelah itu dalam LAF direndam dalam larutan antibiotik 0,5% selama 2 jam, kemudian dibilas dengan *aquadest* sebanyak 3 kali.
- (f) Setelah selesai disterilisasi didalam LAF eksplan diletakkan kedalam *petridish*, selanjutnya biji dipotong-potong melintang menjadi 3 kepingan biji, kemudian siap ditanam kedalam media MS yang telah ditambah IBA dan BAP dengan konsentrasi berbeda-beda sesuai perlakuan.

3.4.5 Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan dilakukan dalam LAF, media kultur yang telah disterilisasi dipanasi terlebih dahulu atau didekatkan dengan api bunsen supaya kondisi tetap steril dan mencegah terjadinya kontaminasi. Tutup botol dibuka dengan hati-hati kemudian belahan biji yang telah disterilisasi ditanamkan sebanyak 3 keping biji per botol menggunakan pinset steril. Setelah ditanam ditutup rapat kembali dengan plastik penutup dan diikat dengan karet gelang. Botol media yang sudah ditanami diberi label perlakuan dan tanggal penanaman, kemudian diletakkan pada rak-rak kultur di ruang inkubasi, pada kondisi kultur suhu $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$, tingkat penyinaran 1500 Lux dan fotoperiode 24 jam. Selanjutnya dilakukan pengamatan mengenai kondisi dan perkembangan eksplan secara periodik.

3.5 Parameter pengamatan

3.5.1 Pengamatan Penunjang

Variabel yang diamati meliputi :

a. Saat muncul kalus

Pengamatan dilakukan setiap hari untuk mengetahui kapan saat mulai muncul kalus, dan ditentukan dalam hari setelah tanam (HST).

b. Warna kalus

Pengamatan dilakukan setiap hari untuk mengetahui jenis dan perubahan warna kalus.

c. Saat muncul tunas

Pengamatan dilakukan setiap hari untuk mengetahui kapan saat mulai muncul tunas, dan ditentukan dalam HST.

3.5.2 Pengamatan Utama

Variabel yang diamati meliputi :

a. Jumlah eksplan manggis yang berkalus per botol kultur

Dilakukan pada umur 35 dan umur 75 dengan menghitung berapa jumlah eksplan manggis yang berkalus.

b. Jumlah tunas yang tumbuh pada kalus eksplan manggis per botol kultur

Dilakukan pada umur 35 dan umur 75 dengan menghitung berapa jumlah tunas yang tumbuh pada kalus eksplan.

c. Tinggi tunas yang tumbuh pada kalus eksplan manggis per botol kultur (cm)

Tinggi tunas ditentukan pada umur 75 HST dengan mengukur rata-rata tunas yang tumbuh pada kalus eksplan manggis.

d. Jumlah tunas yang tumbuh langsung pada eksplan manggis per botol kultur

Dilakukan pada umur 35 dan umur 75 dengan menghitung jumlah eksplan manggis yang tumbuh langsung pada tunas.

e. Tinggi tunas yang tumbuh langsung pada eksplan manggis per botol kultur (cm)

Tinggi tunas ditentukan pada umur 75 HST dengan mengukur rata-rata tunas yang tumbuh langsung pada eksplan.