

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu penelitian

Percobaan dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Benih Hortikultura Pasirbanteng, Jalan Raya Ir. Soekarno Km. 23 Dusun Margamekar RT 01 RW 12 Desa Hegarmanah Kecamatan Jatinangor Kabupaten Sumedang. Waktu pelaksanaan berlangsung dimulai pada tanggal 05 April sampai dengan 07 Juni 2021.

3.2 Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam percobaan ini meliputi gelas beker, pipet tetes, gelas ukur, erlenmeyer, panci, kompor gas, spatula, pH meter, botol kultur berkapasitas 100 ml (UC 1000), kertas saring steril, timbangan analitik, autoklaf, oven, LAF (*Laminar Air Flow*), pinset, gunting, cawan petri, dan *bunsen burner*.

Bahan tanaman yang digunakan adalah tanaman *Chrysanthemum morifolium* Ramat varietas Tadasita Agrihorti dalam aseptik kultur *in vitro* dari Balai Benih Hortikultura, larutan stok media $\frac{1}{2}$ MS, alkohol 70% dan 96%, pupuk Growmore (32%:10%:10%), spirtus, air steril, sukrosa/gula, agar-agar dan zat pengatur tumbuh BAP.

3.3 Metode penelitian

Percobaan menggunakan metode eksperimen dan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan empat taraf perlakuan serta diulang enam kali sehingga terdapat 24 plot percobaan (Lampiran 2).

Taraf perlakuan adalah sebagai berikut :

- A : $\frac{1}{2}$ MS + BAP 1 mg/l
- B : Growmore 1 g/L + BAP 1 mg/l
- C : Growmore 2 g/L + BAP 1 mg/l
- D : Growmore 3 g/L + BAP 1 mg/l

Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan analisis ragam/anova dengan model linier yang digunakan adalah sebagai berikut :

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

Keterangan :

Y_{ij} : Nilai pengamatan pada perlakuan ke-i dalam ulangan ke-j

μ : Nilai tengah umum

τ_i : Pengaruh perlakuan ke-i

ε_{ij} : Galat percobaan perlakuan ke-i ulangan ke-j

Data yang diperoleh dimasukkan ke dalam daftar sidik ragam dan dilakukan kaidah pengambilan keputusan seperti pada tabel di bawah ini:

Tabel 2. Daftar sidik ragam

SK	Db	JK	KT	Fhit	Ftabel 5%
Perlakuan	$t - 1 = 3$	$(\sum y_{ij})^2 / r) - FK$	JKP/dbp	KTP/KTG	3.10
Galat	$t(r - 1) = 20$	JKT-JKP	JKG/dbg		
Total	$tr - 1 = 23$	$\sum (y_{ij})^2 - FK$			

Sumber: (Gomez dan Gomez, 1995)

Tabel 3. Kaidah pengambilan keputusan

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

Apabila terjadi perbedaan pada perlakuan maka akan dilanjutkan dengan uji Jarak Berganda *Duncan* pada taraf kesalahan 5% dengan rumus sebagai berikut:

$$LSR = SSR(\alpha, dBg, p) \cdot S_x$$

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

Keterangan:

S_x : Simpangan baku rata-rata perlakuan

KTG : Kuadrat tengah galat

r : Jumlah ulangan pada setiap nilai tengah perlakuan yang dibandingkan

LSR : Least significant range

SSR : Studentized Significant Range

α : Taraf nyata
dbg : Derajat bebas galat
p : Jarak

3.4 Pelaksanaan penelitian

3.4.1 Sterilisasi alat

Alat yang akan digunakan sebelumnya dicuci menggunakan sabun dengan air mengalir kemudian dilakukan sterilisasi botol kultur dalam dua tahapan. Tahap pertama disterilisasi menggunakan autoklaf selama 60 menit pada suhu 121°C dan tekanan 14,5 psi. Tahap kedua dioven selama 60 menit dengan suhu 121°C . Sedangkan untuk pinset, gunting, cawan petri, dan kertas saring hanya dioven selama 60 menit dengan suhu 121°C.

3.4.2 Pembuatan media

Pembuatan media tanam dilakukan sebagai berikut : menimbang pupuk Growmore dan bahan media sesuai dengan taraf perlakuan yang dibutuhkan (Lampiran 5). Menambahkan ZPT BAP pada masing-masing taraf perlakuan dengan konsentrasi 1 mg/L seperti yang dideskripsikan oleh Mellisa (2010). Menambahkan air steril sebanyak 600 ml pada bahan media pupuk Growmore dan BAP, aduk hingga homogen. Mengukur pH media menjadi 5,8 sampai dengan 6,4 (jika pH terlalu asam maka ditetaskan KOH dan jika pH terlalu basa maka ditetaskan HCl). Setelah itu, menambahkan 3,6 gram agar-agar tanpa rasa dan gula 12 gram kemudian panaskan hingga mendidih. Larutan media dituangkan ke dalam botol kultur sebanyak 20 ml dan ditutup dengan plastik bening lalu diikat dengan karet. Media disterilisasi dengan autoklaf selama 90 menit pada suhu 121°C dan tekanan 14,5 psi, setelah sterilisasi berakhir media dikeluarkan dari autoklaf, lalu disimpan di ruang inkubasi (selama 3 hari).

3.4.3 Penanaman eksplan

Penanaman eksplan dilakukan di dalam LAF (*Laminar Air Flow*) yang telah disterilisasi dengan sinar UV selama 60 menit. Penanaman dimulai dengan melakukan sterilisasi pada alat tanam dalam LAF menggunakan alkohol 70% dan dilewatkan diatas api. Eksplan dipotong pada bagian buku batang dengan ukuran kurang lebih 1,5 cm dengan menyisakan satu helai daun pada setiap bukannya, lalu

ditanam pada media perlakuan. Botol yang telah berisi eksplan ditutup rapat menggunakan plastik *wrapping*, kemudian ditutup dengan plastik bening dan diikat dengan karet, setiap botol berisi 1 eksplan krisan. Masing-masing perlakuan terdapat 30 sampel botol kultur yang kemudian disusun di ruang inkubasi.

3.4.4 Sterilisasi ruang inkubasi dan pengamatan hasil kultur

a. Sterilisasi ruang inkubasi

Kegiatan sterilisasi ruang inkubasi selama pengamatan berlangsung meliputi membersihkan rak dan menyemprotkan alkohol di sekitar botol kultur. Suhu, kelembapan dan pencahayaan telah diatur sesuai kebutuhan tanaman. Membawa botol eksplan yang terkena kontaminasi dan daun yang menguning keluar ruang inkubasi.

b. Pengamatan hasil kultur

Pemeriksaan hasil subkultur dilakukan tujuh hari sekali, hal ini dilakukan untuk melihat pertumbuhan dan perkembangan eksplan krisan.

3.5 Parameter pengamatan

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap pertumbuhan eksplan krisan (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) secara *in vitro* maka dilakukan pengamatan selama 56 hari. Parameter-parameter pengamatan sebagai berikut :

3.5.1 Parameter penunjang

Pengamatan penunjang adalah pengamatan terhadap parameter yang datanya tidak diuji secara statistik untuk mengetahui kemungkinan pengaruh lain dari luar perlakuan meliputi :

a. Persentase eksplan hidup

Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati dan menghitung jumlah eksplan yang masih hidup, yang ditandai dengan pertumbuhan eksplan yang terus berlanjut, tidak mengalami kontaminasi dan tidak mati secara fisiologi dan morfologi. Persentase hidup eksplan dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ eksplan hidup} = \frac{\Sigma \text{eksplan hidup}}{\Sigma \text{seluruh eksplan setiap perlakuan}} \times 100\%$$

b. Kontaminasi eksplan

Pengamatan dilakukan dengan mengamati eksplan krisan yang terkena kontaminasi oleh jamur, bakteri maupun keduanya. Eksplan yang terkena kontaminasi langsung dipisahkan dan botol kultur segera dibersihkan. Persentase kontaminasi eksplan dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ kontaminasi eksplan} = \frac{\sum \text{eksplan yang terkena kontaminasi}}{\sum \text{seluruh eksplan setiap perlakuan}} \times 100\%$$

c. Eksplan *browning*

Pengamatan dilakukan dengan mengamati eksplan krisan yang berubah warna menjadi kecokelatan (*browning*). Persentase eksplan *browning* dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ eksplan } \textit{browning} = \frac{\sum \text{eksplan yang terkena } \textit{browning}}{\sum \text{seluruh eksplan setiap perlakuan}} \times 100\%$$

3.5.2 Parameter utama

Pengamatan utama adalah pengamatan terhadap parameter yang datanya diuji secara statistik. Pengamatan utama yang dilakukan meliputi :

a. Waktu muncul tunas

Waktu muncul tunas letak tumbuhnya pada bagian buku batang. Pengamatan dilakukan dalam botol kultur pada setiap eksplan krisan yang hidup. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 14 hari karena biasanya muncul sekitar 7 – 14 HST (Hari Setelah Tanam).

b. Jumlah tunas

Jumlah tunas diamati dengan cara menghitung tunas dalam botol kultur pada setiap eksplan krisan yang hidup. Pengamatan dilakukan pada 56 HST.

c. Jumlah daun

Jumlah daun diamati dengan cara menghitung daun dalam botol kultur setiap eksplan krisan yang hidup. Pengamatan dilakukan pada 56 HST.

d. Tinggi eksplan

Tinggi eksplan diamati dengan cara mengukur tinggi dengan menggunakan penggaris berskala sentimeter (cm) dengan mengambil sampel acak pada setiap ulangan sebanyak 3 sampel eksplan krisan. Pengamatan tinggi tanaman dilakukan pada 56 HST.