

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi. Penelitian dimulai dari bulan Juli sampai dengan November 2021.

3.2 Alat dan bahan penelitian

Alat yang digunakan adalah autoklaf, *laminar air flow*, neraca analitik, alat *shaker*, gelas ukur, *beaker glass*, botol kultur, labu erlenmeyer, cawan petri, *scalpel*, pinset, spatula, pipet tetes, pipet ukur, mikropipet, tip mikropipet, *filler*, *hot plate magnetic stirrer*, plastik, lampu bunsen, kompor, tabung gas, masker, kamera, mistar, dan alat tulis.

Bahan yang digunakan adalah eksplan bonggol pisang Cavendish, zat pengatur tumbuh IBA dan BAP, alkohol 70%, Myo-inositol, vitamin (*Nicotinic acid*, *Pyridoxine-HCl*, *Thiamine-HCl*, *Glycine*), akuades, sukrosa, unsur makronutrien dan mikronutrien untuk komposisi media MS (Murashige & Skoog), alkohol 96%, sodium hipoklorit (NaOCl), natrium hidroksida (NaOH), detergen, asam klorida (HCl), bakterisida, fungisida, spiritus, media agar, pH indikator universal.

3.3 Metode penelitian

Penelitian menggunakan metode eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang berpola faktorial dengan dua faktor dan tiga ulangan. Faktor pertama (A) yaitu konsentrasi *Indole Butyric Acid* (IBA) yang ditambahkan ke dalam media, terdiri dari 3 taraf yaitu:

a0 = 0 ppm

a1 = 0,5 ppm

a2 = 1 ppm

Faktor kedua (B) adalah konsentrasi *Benzyl Amino Purine* (BAP) yang ditambahkan ke dalam media, terdiri dari 3 taraf yaitu:

b0 = 0 ppm

b1 = 2 ppm

b2 = 4 ppm

Percobaan terdiri dari 9 kombinasi perlakuan dan diulang sebanyak 3 kali, sehingga terdiri dari 27 unit percobaan. Tahap inisiasi setiap unit terdiri dari 4 botol kultur, setiap botol berisi 1 eksplan. Tahap subkultur setiap unit terdiri dari 3 botol kultur, setiap botol berisi 3 eksplan. Kombinasi perlakuan antara konsentrasi IBA dengan BAP tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan antara Konsentrasi IBA dengan Konsentrasi BAP.

Konsentrasi IBA (A)	Konsentrasi BAP (B)		
	0 ppm	2 ppm	4 ppm
0 ppm	a0b0	a0b1	a0b2
0,5 ppm	a1b0	a1b1	a1b2
1 ppm	a2b0	a2b1	a2b2

Model linier dari Rancangan Acak Lengkap (RAL) 2 faktor menurut Paiman (2015), adalah sebagai berikut :

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

Dengan :

i = 1, 2, 3

j = 1, 2, 3

k = 1, 2, 3

Keterangan :

Y_{ijk} = Nilai pengamatan pada ulangan ke-k dari perlakuan A taraf ke-i dan perlakuan B ke-j

μ = Nilai tengah umum (rata-rata respon)

α_i = Pengaruh perlakuan A ke-i

β_j = Pengaruh perlakuan B ke-j

$(\alpha\beta)_{ij}$ = pengaruh perlakuan A ke-i dan perlakuan B ke-j

ε_{ijk} = Galat percobaan pada ulangan ke-k dari perlakuan A ke-i dan Perlakuan B ke-j

Berdasarkan model linier tersebut, maka disusun daftar sidik ragam sebagaimana tabel berikut ini:

Tabel 2. Sidik ragam (Paiman, 2015).

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	F _{0,05}
A	3 - 1 = 2	JKA	$\frac{JKA}{dbA}$	$\frac{KTA}{KTG}$	3,55
B	3 - 1 = 2	JKB	$\frac{JKB}{dbB}$	$\frac{KTB}{KTG}$	3,55
Interaksi A x B	(3 - 1)(3 - 1) = 4	JKAB	$\frac{JKAB}{dbAB}$	$\frac{KTAB}{KTG}$	2,93
Galat	(3 - 1)(3.3 - 1) = 18	JKG	$\frac{JKG}{dbG}$		
Jumlah	26	JKT			

Keterangan:

$$FK = \frac{Y_{ij}^2}{a \times b \times r}$$

$$JK \text{ total (JKt)} = \sum (Y_{ijk})^2 - FK$$

$$JK \text{ Perlakuan (JKP)} = \frac{\sum (\sum Y_j)^2}{R} - FK$$

$$JK \text{ A} = \frac{\sum (\sum Y_i)^2}{r \times b} - FK$$

$$JK \text{ B} = \frac{\sum (\sum Y_j)^2}{r \times a} - FK$$

$$JKAB = JKP - JKA - JKB$$

$$JK \text{ Galat (JG)} = JKT - JKP$$

Tabel 3. Kaidah pengambilan keputusan (Gomez dan Gomez, 2007)

Hasil Analisis	Kesimpulan Analisis	Keterangan
F _{hit} ≤ F _{0,05}	Tidak berbeda nyata	Tidak ada perbedaan pengaruh antar perlakuan
F _{hit} > F _{0,05}	Berbeda nyata	Ada perbedaan pengaruh antar perlakuan

Jika berpengaruh nyata, maka dilakukan uji lanjut dengan Uji Jarak Berganda *Duncan* pada taraf nyata 5% dengan rumus sebagai berikut:

$$SSR = (\alpha \cdot dbg \cdot p)$$

$$LSR (\alpha \cdot dbg \cdot p) = SSR (\alpha \cdot dbg \cdot p) \times S_x$$

Nilai S_x dicari dengan rumus sebagai berikut:

1. Bila terjadi interaksi

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{KT \text{ galat}}{r}}$$

2. Bila tidak terjadi interaksi, tetapi berbeda nyata pada perlakuan Faktor A

$$S_{\bar{x} \text{ a}} = \sqrt{\frac{KT \text{ galat}}{r \cdot b}}$$

3. Bila tidak terjadi interaksi, tetapi berbeda nyata pada perlakuan Faktor B

$$S_{\bar{x} \text{ b}} = \sqrt{\frac{KT \text{ galat}}{r \cdot a}}$$

Keterangan:

S_x = Galat baku rata-rata (*Standard Error*)

KTG = Kuadrat tengah galat

r = Jumlah ulangan pada tiap nilai tengah perlakuan yang dibandingkan

SSR = *Significant studentized range*

α = Taraf nyata

dbg = Derajat bebas galat

p = Jarak antara perlakuan (*range*)

LSR = *Least significant range*

3.4 Prosedur penelitian

3.4.1 Sterilisasi alat

Alat yang digunakan disterilisasi dengan cara Sekar, Wulandari dan Sabar (2014), yaitu alat-alat logam maupun non logam dicuci menggunakan sabun dan dibilas dengan air bersih. Alat-alat dibungkus menggunakan plastik tahan panas sebelum dimasukkan ke dalam autoklaf. Alat disterilisasi pada suhu 121 °C tekanan 15 psi selama 60 menit. Setelah itu, disimpan di tempat bersih seperti rak ataupun *box* agar tidak terkontaminasi. Saat proses penanaman, alat logam disterilisasi dengan mencelupkan ke dalam alkohol 96% dan dibakar dengan bunsen.

3.4.2 Sterilisasi akuades

Air yang digunakan untuk pembuatan larutan stok dan sterilisasi eksplan adalah akuades steril. Sterilisasi dilakukan dengan memasukan akuades dalam botol kultur sebanyak 3/4 volume botol. Botol ditutup dengan plastik tahan panas dan diikat menggunakan karet gelang agar air tidak menguap. Sterilisasi dilakukan selama 60 menit dalam autoklaf dengan suhu 121°C. Setelah itu, akuades steril disimpan di ruang inkubasi (Sekar dkk., 2014).

3.4.3 Pembuatan larutan stok

Pembuatan larutan stok yaitu melarutkan satu-persatu komponen media secara berurutan. Larutan stok yang akan digunakan dalam media MS (Tabel 4).

Tabel 4. Komposisi larutan stok untuk volume larutan 1 liter.

Kode Larutan Stok dan Pembesarannya	Bahan Unsur	Berat (g) untuk Volume 1 liter
A (50x)	NH ₄ NO ₃	82,5
B (50x)	KNO ₃	95
C (200x)	KH ₂ PO ₄	39
	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
	CaCl ₂ .H ₂ O	88
D (200x)	MgSO ₄ .7H ₂ O	74
	MnSO ₄	4,46
	ZnSO ₄	1,72
	CuSO ₄ .H ₂ O	0,005
E (200x)	Na ₂ EDTA	3,730
	FeSO ₄ .7H ₂ O	2,780
	Vitamin	
Vitamin	Thiamine-HCl	0,01
	Nicotinic acid	0,05
	Pyridoxine-HCl	0,05
	Glycine	0,2
Myo-inositol	Myo-Inositol	10

Sumber: (Murashige & Skoog, 1962)

a. Pembuatan larutan stok hara makronutrien dan mikronutrien

Larutan stok hara makronutrien dan mikronutrien terdiri dari stok A (NH₄NO₃), stok B (KNO₃), stok C (KH₂PO₄, H₃BO₃, KI, Na₂MoO₄.2H₂O, CoCl₂.6H₂O), stok D (CaCl₂.H₂O), stok E (MgSO₄.7H₂O, MnSO₄, ZnSO₄,

$\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), dan stok F (Na_2EDTA , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Setiap satu larutan stok dibuat untuk masing-masing media, stok A, B dibuat 50 kali pembesaran, sementara stok C, D, E, dan F dibuat 200 kali pembesaran dengan menyesuaikan komposisi media MS. Tahapannya sebagai berikut:

- 1) Bahan kimia yang akan digunakan yaitu unsur hara makro dan mikro, ditimbang menggunakan timbangan analitik sesuai jumlah yang sudah ditentukan.
 - 2) Bahan yang sudah ditimbang kemudian dilarutkan satu persatu ke dalam akuades yang sudah diisikan ke dalam erlenmeyer terpisah sesuai dengan komposisi dari masing-masing larutan stok. Pembuatan larutan dimulai dengan melarutkan unsur NH_4NO_3 sebagai larutan stok A, KNO_3 sebagai larutan stok B, KH_2PO_4 , H_3BO_3 , KI , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sebagai larutan stok C, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebagai larutan stok D, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MnSO_4 , ZnSO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebagai larutan stok E, dan Na_2EDTA , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebagai larutan stok F.
 - 3) Semua bahan yang telah dilarutkan lalu diaduk secara merata menggunakan *hot plate magnetic stirrer*. Setelah semua unsur hara larut, maka larutan ditira sampai volume mencapai 1 L menggunakan gelasukur.
 - 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 pendingin.
 - 5) Botol larutan stok F dibungkus menggunakan aluminium foil agar tidak ada cahaya yang masuk, karena akan mempengaruhi reaksi dalam larutan tersebut.
 - 6) Larutan stok hara ini dapat digunakan untuk 50 kali larutan stok A dan B, dan 200 kali larutan stok C, D, E, dan F untuk pemakaian pembuatan media masing-masing 1 liter.
- b. Pembuatan larutan stok vitamin, dilakukan dengan cara menimbang bahan-bahan yang diperlukan, yaitu Thiamine-HCl, Nicotinic acid, Pyridoxine-HCl, dan Glycine menggunakan timbangan analitik. Masukkan satu persatu bahan-bahan tersebut ke dalam erlenmeyer yang telah berisi akuades sebanyak 50

mL sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah semua bahan terlarut sempurna, dilakukan peneraan volume vitamin menjadi 100 mL menggunakan labu ukur. Larutan stok vitamin disimpan di dalam lemari pendingin.

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. Tahapan pembuatannya sebagai berikut:

- 1) Timbang 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, jika sudah larut ditambahkan akuades steril hingga volume 100 mL.
- 4) Larutan stok hormon disimpan di lemari pendingin.

3.4.4 Pembuatan media MS (Murashige and Skoog)

Menurut George and Sherrington (1984 dalam Syahid & Hadipoentyanti, 2017), media MS merupakan media yang sangat luas pemakaiannya karena mengandung unsur hara makro dan mikro yang lengkap sehingga dapat digunakan untuk berbagai spesies tanaman. Komposisi media MS terdiri dari unsur hara makro, unsur hara mikro, besi, vitamin, myoinositol, sukrosa dan bahan pematat (Tabel 5) (Syahid dan Hadipoentyanti, 2017).

Pengambilan larutan stok menggunakan rumus :

$$V_1N_1 = V_2N_2$$

Keterangan :

V_1 = Volume larutan stok yang akan diambil

V_2 = 1000 ml atau 1 L

N_1 = berat (g)/(mg) senyawa yang disesuaikan dengan kebutuhan komposisi media dalam 100 mL

N_2 = berat (mg) senyawa yang disesuaikan dengan kebutuhan komposisi media dalam 1000 mL atau 1 L

Tabel 5. Komposisi larutan stok dalam media MS 1 liter.

Kode Larutan Stok dan Pembesaran	Bahan Unsur	Berat (g) untuk Volume 1 liter	Konsentrasi dalam Media MS (mg/L)	Volume Larutan Stok untuk 1 liter Media (mL/L)
A (50x)	NH ₄ NO ₃	82,5	1650	20
B (50x)	KNO ₃	95	1900	20
C (200x)	KH ₂ PO ₄	39	195	5
	H ₃ BO ₃	1,24	6,2	
	KI	0,166	0,83	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,05	0,25	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,005	0,025	
	D (200x)	CaCl ₂ .H ₂ O	88	440
E (200x)	MgSO ₄ .7H ₂ O	74	370	5
	MnSO ₄	4,46	22,3	
	ZnSO ₄	1,72	8,6	
	CuSO ₄ .H ₂ O	0,005	0,025	
	F (100x)	Na ₂ EDTA	3,730	37,3
Vit (100x)	FeSO ₄ .7H ₂ O	2,780	27,8	
	Thiamine-HCl	0,01	100	10
	Nicotinic acid	0,05	0,1	
	Pyridoxine-HCl	0,05	0,5	
	Glycine	0,2	0,5	
Myo (100x)	Myo-Inositol	10	2	10

- 1) Komposisi senyawa tiap media dapat dilihat dalam Tabel 5.
- 2) Setelah dapat pengambilan larutan stok dan ZPT sesuai perlakuan, larutan dimasukan dalam erlenmeyer ukuran 1 liter.
- 3) Setelah itu, dimasukkan sukrosa 3g/L dan zat pengatur tumbuh dengan konsentrasi sesuai perlakuan, dan ditambahkan akuades sampai volume 900 ml.
- 4) Kemudian, pH larutan diukur menggunakan pH meter dan diusahakan pH antara 5,5 sampai 5,8. Jika pH terlalu rendah dinaikkan dengan menambahkan NaOH 0,1 N dan jika pH terlalu tinggi diturunkan dengan menambahkan HCl 0,1 N.
- 5) Agar 7g/L ditambahkan ke dalam larutan, kemudian ditambahkan akuades sampai 1 liter.

- 6) Sambil diaduk medium yang berisi larutan media dipanaskan sampai mendidih kemudian dimasukkan kurang lebih 25 mL (sesuaikan dengan volume botol) ke dalam botol kultur dan tutup rapat dengan penutup botol.
- 7) Memberi label yang bertuliskan jenis dan konsentrasi ZPT yang ditambahkan.
- 8) Sterilkan media dengan *autoclave* pada suhu 121°C tekanan 15 psi selama kurang lebih 60 menit.
- 9) Botol kultur dikeluarkan dari *autoclave* dan simpan di ruang penyimpanan.

3.4.5 Persiapan dan sterilisasi eksplan

Eksplan pisang yang digunakan adalah anakan dari induk pohon pisang yang sudah berbuah. Tinggi anakan yang digunakan adalah sekitar 30 cm sampai 50 cm. Anakan dipisahkan dari induknya untuk dilakukan sterilisasi. Sterilisasi eksplan bertujuan untuk mematikan kontaminan yang melekat pada eksplan. Sterilisasi dilakukan berdasarkan Ferdous dkk. (2015), yaitu terdiri dari sterilisasi luar (dilakukan di luar *laminar air flow*) dan sterilisasi dalam (dilakukan di dalam *laminar air flow*).

Sterilisasi luar terdiri dari pembersihan dan pemotongan tunas menjadi ukuran 3 cm sampai 4 cm, eksplan dicuci dengan air mengalir selama 5 menit, dilanjutkan dengan perendaman dalam larutan detergen 10 menit lalu dibilas dengan akuades steril 3 kali. Selanjutnya, eksplan direndam dalam larutan bakterisida (Benlate) 2g/L dan fungisida (Antracol) 2g/L selama 60 menit lalu di bilas menggunakan akuades steril 3 kali. Terakhir dilakukan perendaman dalam asam sitrat dan asam askorbat dengan masing-masing 50 mg/L selama 60 menit sebagai upaya untuk mengurangi *blackening* lalu dibilas air steril sebanyak 3 kali. Sterilisasi dalam *laminar air flow*, yaitu eksplan direndam dalam larutan alkohol 70% selama 5 menit, lalu dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Kemudian direndam dalam larutan pemutih (NaClO) 1,04 % selama 20 menit, lalu dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Selanjutnya direndam dalam larutan pemutih (NaClO) 0,78% selama 10 menit dan dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Setelah itu eksplan siap untuk ditanam pada media.

3.4.6 Persiapan ruang tanam dan penanaman

Semua bagian dalam LAF disemprot dengan alkohol 70% kecuali filter hefa, dibersihkan dengan tissue, disemprot dengan alkohol 70% dan dibiarkan menguap. Lampu Ultra Violet (UV) dinyalakan selama 30 menit. Kemudian lampu UV dimatikan, blower dan lampu LED dihidupkan (Shinta, 2017).

Penanaman dilakukan dengan cara menurut Syahid dan Hadipoentyanti (2017), yaitu eksplan yang sudah disterilisasi diletakkan dalam cawan petri steril. Bagian eksplan yang terkena bahan sterilan dipotong, serta batang semu (pelepah) dibuka hingga bagian tunas dalam. Eksplan dimasukkan ke dalam botol media menggunakan pinset steril. Botol ditutup rapat dengan tutup botol yang telah steril, kemudian dilapisi dengan *cling wrap* untuk menghindari masuknya kontaminan ke dalam botol media. Kemudian dilakukan pelabelan dan tanggal saat penanaman. Botol-botol kultur yang telah ditanami diinkubasi selama pengamatan pada rak-rak kultur di dalam ruang inkubasi yang memiliki suhu 20°C sampai 22°C dengan intensitas penyinaran sebesar 1000 lux selama 24 jam dalam sehari.

3.4.7 Subkultur

Subkultur dilakukan 1 bulan setelah inisiasi, eksplan yang tidak terkontaminasi disubkultur dengan cara memotong eksplan menjadi 3 bagian kemudian ditanam kembali dalam media baru sesuai dengan perlakuan sebelumnya. Subkultur dilakukan untuk merangsang pertumbuhan propagul.

3.4.1 Pemeliharaan

Botol-botol kultur yang sudah ditanam dipelihara di dalam ruang inkubasi dengan suhu 20 sampai 22°C dan penyinaran lampu TL 40 watt yang menyala selama 24 jam. Kemudian membuang eksplan yang terkontaminasi dan menjaga kesterilan alat-alat yang masuk ke dalam ruangan (Sihotang dan Riyanto, 2016).

3.5 Variabel pengamatan

3.5.1 Pengamatan penunjang

1. Persentase *blackening*

Pengamatan dilakukan setiap hari dengan cara menghitung lalu mempersentasekan jumlah eksplan yang mengalami *blackening* atau pencoklatan akibat aktivitas fenol, dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Blackening} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang mengalami blackening tiap perlakuan}}{\text{Jumlah eksplan yang ditanam tiap perlakuan}} \times 100\%$$

2. Persentase eksplan berkalus

Pengamatan dilakukan setiap hari dengan cara menghitung lalu mempersentasekan jumlah eksplan yang berkalus, dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Eksplan berkalus} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang tumbuh kalus tiap perlakuan}}{\text{Jumlah eskplan yang ditanam tiap perlakuan}} \times 100\%$$

3.5.2 Pengamatan utama

1. Waktu muncul tunas

Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati setiap hari dan mencatat pada hari ke berapa setelah subkultur tunas terbentuk (Wahidah & Hasrul, 2017).

2. Jumlah tunas

Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung jumlah tunas yang muncul setiap 2 minggu sekali, yaitu pada 14 hari setelah subkultur (hss), 28 hss, 42 hss, dan 56 hss.

3. Panjang tunas

Pengamatan dilakukan setiap 2 minggu sekali, yaitu pada 14 hari setelah subkultur (hss), 28 hss, 42 hss, dan 56 hss dengan cara mengukur panjang tunas menggunakan mistar dari luar botol kultur. Pengukuran dimulai dari pangkal batang hingga ujung tunas tertinggi.

4. Jumlah akar

Pengamatan jumlah akar dilakukan setiap 2 minggu sekali, yaitu pada 14 hari setelah subkultur (hss), 28 hss, 42 hss, dan 56 hss dengan menghitung jumlah akar yang terbentuk (Siregar dkk., 2013).

5. Panjang akar

Pengamatan setiap 2 minggu sekali, yaitu pada 14 hari setelah subkultur (hss), 28 hss, 42 hss, dan 56 hss, dengan cara mengukur panjang akar menggunakan mistar dari luar botol kultur. Pengukuran dimulai dari pangkal akar hingga ujung akar terpanjang.

6. Jumlah daun

Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung jumlah daun yang terbentuk setiap 2 minggu sekali, yaitu pada 14 hari setelah subkultur (hss), 28 hss, 42 hss, dan 56 hss.