

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni - Agustus 2018 di Laboratorium Kultur Jaringan Kebun Benih Hortikultura Salaman, Magelang.

3.1. Materi Penelitian

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain *autoclave*, *laminar air flow*, pinset, *scapel*, gelas beker, *hot plate stirrer*, cawan petri, botol kaca, rak, kapas, timbangan, bunsen, spatula, pH meter, kertas dan karet gelang. *Autoclave* digunakan untuk mensterilkan alat dan bahan, *laminar air flow* untuk tempat pemindahan planlet, pinset untuk memindahkan planlet, *scapel* untuk membersihkan planlet pisang, gelas beker ukuran 250 ml untuk menempatkan pinset dan *scapel* di *laminar air flow* ketika melakukan multiplikasi, gelas beker ukuran 150 ml dan labu ukur untuk membuat media, *hot plate stirrer* untuk memanaskan media, cawan petri sebagai alas saat multiplikasi, botol kaca untuk menumbuhkan planlet pisang, rak untuk menempatkan botol, kapas untuk membersihkan peralatan, timbangan untuk menimbang bahan media, kertas dan karet gelang untuk membungkus peralatan yang akan disterilisasi, bunsen untuk sterilisasi alat (pinset dan *scapel*), spatula untuk mengambil bahan media saat menimbang, pH meter untuk mengukur tingkat keasaman media.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain alkohol 96%, aquades, NaOH 1 N, HCl 1 N, hormon BAP dan IAA, serta media MS dengan

komposisi sesuai Tabel 1. Planlet yang digunakan yaitu varietas raja bulu hasil sub-kultur ke-6 dengan kriteria mempunyai tiga daun, tinggi planlet 2,5 cm dan diameter batang 2 mm.

Tabel 1. Komposisi Media Murashige and Skoog*

Nama Stok	Senyawa	komposisi stok (per liter)	Komposisi Media MS (per liter)
A	NH ₄ NO ₃	82,500 g	1,650 mg
B	KNO ₃	95,000 g	1,900 mg
C	KH ₂ PO ₄	34,000 g	170,000 mg
	H ₃ BO ₃	1,240 g	6,200 mg
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,050 g	0,250 mg
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0,005 g	0,025 mg
	KI	0,166 g	0,830 mg
D	CaCl ₂ 2H ₂ O	88,000 g	440,000 mg
E	MgSO ₄ 7H ₂ O	74,000 g	370,000 mg
	MnSO ₄ 4H ₂ O	4,460 g	22,300 mg
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	1,720 g	8,600 mg
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,005 g	0,025 mg
F	Na ₂ EDTA	7,460 g	37,300 mg
	FeSO ₄ 7H ₂ O	5,400 g	27,000 mg
G	Tiamin HCl	0,020 g	0,100 mg
	Asam Nikotinat	0,100 g	0,500 mg
	Pyridoksin HCl	0,100 g	0,500 mg
	Myo-inositol	10,000 g	100,000 mg
	Sukrosa	-	30.000 mg
	Agar	-	7.000 mg

*Kebun Benih Hortikultura Salaman, 2017.

3.2. Metode Penelitian

3.2.1. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial. Faktor pertama adalah hormon BAP dengan taraf masing-masing 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; dan 2 ppm. Faktor kedua yaitu hormon IAA dengan taraf 0, 1, 2, 3, dan 4 ppm. Masing-masing perlakuan diulang

sebanyak 4 kali, sehingga terdapat 100 unit percobaan. Masing-masing kombinasi perlakuan adalah sebagai berikut:

B0A0 = BAP 0 ppm + IAA 0 ppm	B2A3 = BAP 1 ppm + IAA 3 ppm
B0A1 = BAP 0 ppm + IAA 1 ppm	B2A4 = BAP 1 ppm + IAA 4 ppm
B0A2 = BAP 0 ppm + IAA 2 ppm	B3A0 = BAP 1,5 ppm + IAA 0 ppm
B0A3 = BAP 0 ppm + IAA 3 ppm	B3A1 = BAP 1,5 ppm + IAA 1 ppm
B0A4 = BAP 0 ppm + IAA 4 ppm	B3A2 = BAP 1,5 ppm + IAA 2 ppm
B1A0 = BAP 0,5 ppm + IAA 0 ppm	B3A3 = BAP 1,5 ppm + IAA 3 ppm
B1A1 = BAP 0,5 ppm + IAA 1 ppm	B3A4 = BAP 1,5 ppm + IAA 4 ppm
B1A2 = BAP 0,5 ppm + IAA 2 ppm	B4A0 = BAP 2 ppm + IAA 0 ppm
B1A3 = BAP 0,5 ppm + IAA 3 ppm	B4A1 = BAP 2 ppm + IAA 1 ppm
B1A4 = BAP 0,5 ppm + IAA 4 ppm	B4A2 = BAP 2 ppm + IAA 2 ppm
B2A0 = BAP 1 ppm + IAA 0 ppm	B4A3 = BAP 2 ppm + IAA 3 ppm
B2A1 = BAP 1 ppm + IAA 1 ppm	B4A4 = BAP 2 ppm + IAA 4 ppm
B2A2 = BAP 1 ppm + IAA 2 ppm	

3.2.2. Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan dalam beberapa tahap, antara lain adalah sterilisasi alat, pembuatan media, dan *transplanting* planlet. Sterilisasi pinset, scapel, gelas beker, dan cawan petri dilakukan dengan cara membungkusnya dengan kertas dan diikat menggunakan karet gelang, kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 30 menit dengan suhu 121 °C dan tekanan 17,5 psi. Planlet scapel disterilisasi menggunakan alcohol dan dibakar di atas api

bunsen pada saat *transplanting*. Sterilisasi *laminar air flow* dilakukan dengan cara dibersihkan dengan alkohol menggunakan kapas dan menyalakan lampu UV selama 60 menit sebelum melakukan multiplikasi. Sterilisasi ruangan dilakukan dengan cara membersihkan kotoran dalam ruangan dan menyemprot ruangan dengan formalin, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Rak inkubasi media dan tempat menumbuhkan planlet dibersihkan menggunakan alkohol.

Pembuatan media dilakukan dengan cara memasukkan larutan stok (A – G), myo-inositol, dan sukrosa ke dalam labu ukur dengan volume sesuai pada Tabel 2. Setelah itu aquades ditambahkan ke dalam media hingga volumenya mencapai 2 liter, lalu dihomogenkan menggunakan stirer.

Tabel 2. Volume Larutan Stok yang Digunakan

Larutan Stok	Volume yang Digunakan (per 2 liter media)
A	40 ml
B	40 ml
C	10 ml
D	10 ml
E	10 ml
F	10 ml
G	10 ml
Myo-inositol	20 ml
Sukrosa	30 g

Media yang telah homogen dibagi ke dalam 25 gelas beker ukuran 150 ml dengan volume masing-masing 50 ml. Kemudian zat pengatur tumbuh BAP dan IAA dimasukkan ke dalam masing-masing media sesuai dengan konsentrasi perlakuan. Selanjutnya, aquades ditambahkan ke dalam masing-masing media hingga volumenya mencapai 100 ml.

Masing-masing media pada gelas beker diukur pHnya menggunakan pH meter. Media yang baik mempunyai pH antara 5,6 – 5,8. Apabila pH kurang dari 5,6 maka ditambahkan beberapa tetes NaOH dan jika pH lebih dari 5,8 ditambahkan HCL 1 N untuk menurunkan pH media.

Setelah itu masing-masing media ditambahkan agar-agar sebanyak 0,7 g dan karbon aktif sebanyak 0,075 g, lalu diaduk dan dimasak menggunakan *hot plate stirer* hingga mendidih. Setelah mendidih, media dituangkan ke dalam botol dengan volume masing-masing 25 ml lalu ditutup rapat.

Tahap selanjutnya yaitu botol yang telah berisi media dengan masing-masing perlakuan disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 30 menit dengan suhu 121 °C dan tekanan 17,5 psi. Setelah disterilisasi, media diinkubasi selama 7 hari untuk mengetahui ada atau tidaknya kontaminan.

Transplantasi planlet pisang raja bulu dilakukan di dalam *laminar airflow*, menggunakan alas cawan petri. Planlet diambil dari botol multiplikasi lama menggunakan pinset, kemudian daun, akar, dan tunas yang tumbuh dibersihkan menggunakan *scapel*, lalu diukur menggunakan penggaris yang ditempatkan di bawah cawan petri. Planlet yang telah bersih dimasukkan ke dalam botol berisi media dengan jumlah masing-masing lima planlet dalam satu botol. Kemudian botol ditutup rapat dan diberi *wrap plastic* pada leher botol sehingga botol tertutup lebih rapat. Setelah selesai transplanting, botol-botol berisi planlet diletakkan di rak dalam ruang pertumbuhan.

3.2.3. Pengamatan Parameter

Pengamatan dilakukan pada semua planlet dengan mengamati aspek morfologinya, yaitu jumlah daun, jumlah akar, panjang akar, tinggi planlet, dan diameter batang. Pengamatan parameter dilakukan saat 35 hari setelah transplanting.

3.2.4. Metode Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan metode *Analysis of Variance* (ANOVA) untuk mengetahui pengaruh perlakuan, dan apabila ada pengaruh nyata perlakuan maka dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5%. Model linier aditif yang menjelaskan setiap nilai pengaruh sebagai berikut:

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

Keterangan:

Y_{ijk} : Hasil parameter pertumbuhan planlet pisang raja dari perlakuan taraf ke-i faktor konsentrasi BAP dan taraf ke-j faktor konsentrasi IAA

μ : Rata-rata populasi

τ_i : Pengaruh taraf ke-i dari perlakuan konsentrasi BAP

β_j : Pengaruh taraf ke-j dari perlakuan konsentrasi IAA

$(\alpha\beta)_{ij}$: Pengaruh taraf ke-i perlakuan BAP dan taraf ke-j konsentrasi IAA

ε_{ij} : Pengaruh acak pertumbuhan planlet pisang raja bulu kelompok ke-j yang mendapat kombinasi perlakuan ij.

Hipotesis statistik yang diuji adalah:

Pengaruh konsentrasi BAP pada pertumbuhan planlet pisang raja bulu:

$H_0 : \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_5 = 0$ (tidak ada pengaruh perlakuan konsentrasi BAP terhadap pertumbuhan planlet pisang raja bulu).

$H_1 : \text{minimal ada satu } \tau_t \neq 0$ (ada pengaruh perlakuan konsentrasi BAP terhadap pertumbuhan planlet pisang raja bulu).

Pengaruh konsentrasi IAA pada pertumbuhan planlet pisang raja bulu:

$H_0 : \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_5 = 0$ (tidak ada pengaruh perlakuan konsentrasi IAA terhadap pertumbuhan planlet pisang raja bulu).

$H_1 : \text{minimal ada satu } \beta_t \neq 0$ (ada pengaruh perlakuan konsentrasi IAA terhadap pertumbuhan planlet pisang raja bulu).

Pengaruh interaksi konsentrasi BAP dan konsentrasi IAA

$H_0 : (\alpha\beta)_{ij} = 0$ (tidak ada pengaruh interaksi terhadap pertumbuhan planlet pisang raja bulu).

$H_1 : \text{minimal ada satu } (\alpha\beta)_{ij} \neq 0$ (ada pengaruh interaksi terhadap pertumbuhan planlet pisang raja bulu).