

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis, Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen yang dilaksanakan pada bulan Maret 2022 sampai Mei 2022 bertempat di Laboratorium Bioteknologi dan Fisiologi Tanaman, Jurusan Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Sultan Ageng Tirtayasa.

3.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, botol kultur, neraca analitik, *hot plate* dan *stirrer*, gelas beaker, gelas ukur, pipet tetes, mikropipet, tip biru, cawan petri, scalpel dan mata pisau, LAF (*Laminar Air Flow*), shaker, bunsen, pinset, *hand sprayer*, rak kultur jaringan, penggaris, pulpen, kamera *headphone* dan buku catatan.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah anakan pisang merah asal Banten, media MS, *wrapping plastic*, kertas label, korek api, spirtus, zat pengatur tumbuh BAP, zat pengatur tumbuh IAA, NaOH, HCl, alkohol 70%, *ascorbic acid*, alumunium foil, agar, aquades steril, larutan stok, gula pasir, PPM (*Plant Preservative Mixture*), kertas tisu, detergen, larutan bayclin, fungisida, dan bakterisida.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) faktorial, faktor pertama berupa pemberian zat pengatur tumbuh 6-Benzil Amino Purin (BAP) dengan berbagai tingkat konsentrasi dengan simbol (B) yang terdiri dari 3 taraf yaitu 0 ppm BAP (B₀), 2 ppm BAP (B₁), dan 4 ppm BAP (B₂). Sedangkan faktor kedua yaitu pemberian zat pengatur tumbuh Indole-3-acetic acid (IAA) dengan tingkat konsentrasi yang berbeda dengan simbol (I) yang terdiri dari 3 taraf yaitu 0 ppm IAA (I₀), 0,25 ppm IAA (I₁), 0,50 ppm IAA (I₂).

Kombinasi dari kedua faktor tersebut menghasilkan 9 kombinasi perlakuan sebagaimana disajikan pada Tabel 1. Setiap kombinasi perlakuan diulang sebanyak 3 kali ulangan sehingga diperoleh 27 satuan unit percobaan. Dalam satu percobaan terdapat 1 botol yang terdiri dari 1 eksplan anakan pisang merah asal Banten sehingga terdapat 27 eksplan yang ditanam. Tata letak percobaan dapat dilihat pada lampiran 2.

Tabel 1. Kombinasi perlakuan konsentrasi BAP dan konsentrasi IAA

Konsentrasi BAP (B) (ppm)	Konsentrasi IAA (I) (ppm)		
	0 (I₀)	0,25 (I₁)	0,50 (I₂)
0 (B ₀)	B ₀ I ₀	B ₀ I ₁	B ₀ I ₂
2 (B ₁)	B ₁ I ₀	B ₁ I ₁	B ₁ I ₂
3 (B ₂)	B ₂ I ₀	B ₂ I ₁	B ₂ I ₂

3.3.2. Rancangan Analisis

Model linier yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

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

Keterangan :

Y_{ijk} : Nilai pengamatan pada konsentrasi BAP ke-i, konsentrasi IAA ke-j dan ulangan ke-k

μ : Rataan umum

α_i : Pengaruh perlakuan konsentrasi BAP ke-i

β_j : Pengaruh perlakuan konsentrasi IAA ke-j

$(\alpha\beta)_{ij}$: Pengaruh interaksi konsentrasi BAP ke-i dengan konsentrasi IAA ke-j

σ_k : Pengaruh pengelompokkan

ϵ_{ijk} : Nilai galat percobaan pada konsentrasi BAP ke-i dan konsentrasi IAA ke-j dan ulangan ke-k

i : 1, 2, 3

j : 1, 2, 3

k : 1, 2, 3

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan, penelitian ini dianalisis dengan menggunakan analisis sidik ragam pada taraf 5%. Apabila hasil sidik ragam

memberikan hasil berpengaruh nyata, maka dilakukan uji lanjut menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5%.

3.3.3. Rancangan Respon

Respons yang diamati dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Tinggi Eksplan (cm)

Tinggi eksplan diukur pada tunas tertinggi setiap satu minggu sekali dengan cara mengukur eksplan yang tumbuh dari pangkal batang sampai dengan titik tumbuh. Dilakukan pengukuran sejak 1 MST sampai 6 MST dengan menggunakan penggaris.

2. Waktu Muncul Tunas Baru (MST)

Waktu muncul tunas baru diamati dengan cara mengamati waktu pertama muncul tunas baru dari eksplan. Pengamatan waktu muncul tunas baru dilakukan sejak eksplan ditanam hingga tunas baru muncul sampai 6 MST.

3. Waktu Muncul Daun (MST)

Waktu muncul daun diamati dengan cara mengamati waktu pertama muncul daun dari eksplan. Diamati sejak 1 MST hingga daun muncul sampai 6 MST.

4. Waktu Muncul Akar (MST)

Waktu muncul akar diamati dengan cara mengamati waktu pertama muncul akar dari eksplan. Diamati sejak 1 MST hingga akar muncul sampai 6 MST.

5. Jumlah Tunas (tunas)

Pengamatan jumlah tunas dilakukan setelah munculnya tunas pada eksplan, dilakukan setiap satu minggu sekali selama 6 MST, dengan cara menjumlahkan tunas yang tumbuh dari keseluruhan eksplan yang ditanam.

6. Jumlah Daun (helai)

Pengamatan dilakukan setelah terbentuknya daun yang telah terbuka sempurna pada eksplan. Dilakukan dengan cara menghitung jumlah daun pada

setiap masing-masing eksplan hidup. Pengamatan dilakukan setiap satu minggu sekali sampai 6 MST).

7. Jumlah Akar (akar)

Pengamatan jumlah akar diamati setelah terbentuknya akar pada bagian eksplan yang dilakukan setiap satu minggu sekali sampai 6 MST dengan cara menghitung jumlah akar yang tumbuh pada eksplan tunas pisang merah.

8. Persentase Eksplan Hidup (%)

Pengamatan dilakukan satu minggu sekali dimulai sejak 1 MST sampai 6 MST dengan cara mengamati dan menghitung jumlah eksplan yang masih hidup ditandai dengan pertumbuhan eksplan yang terus berlanjut, tidak mengalami kontaminasi dan tidak mati secara fisiologis. Persentase eksplan hidup dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Eksplan hidup} = \frac{\text{Jumlah eksplan hidup}}{\text{Jumlah total eksplan}} \times 100\%$$

9. Persentase Browning (%)

Browning merupakan kondisi yang terjadi apabila eksplan mengalami perubahan warna menjadi kecoklatan. Hal ini disebabkan karena adanya antioksidan yang tinggi pada eksplan. Pengamatan eksplan yang browning dilakukan satu minggu sekali dimulai sejak 1 MST sampai dengan 6 MST dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Browning} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang browning}}{\text{Jumlah total eksplan}} \times 100\%$$

10. Persentase Kontaminasi (%)

Kontaminasi terjadi akibat adanya mikroorganisme seperti bakteri dan jamur yang terdapat pada media tanam atau eksplan sehingga pertumbuhan eksplan menjadi terhambat. Perhitungan persentase kontaminasi ini dilakukan satu minggu sekali dimulai sejak 1 MST sampai dengan 6 MST dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Kontaminasi} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang terkontaminasi}}{\text{Jumlah total eksplan}} \times 100\%$$

3.3.4. Pelaksanaan Penelitian

Adapun tahapan dalam penelitian dimulai dari persiapan eksplan, sterilisasi alat, pembuatan media, sterilisasi media kultur, sterilisasi lingkungan kerja, sterilisasi eksplan, penanaman eksplan, pemeliharaan, pengamatan eksplan, dan analisis data. Alur penelitian dapat dilihat pada lampiran 6.

1. Persiapan Bahan Eksplan

Bahan eksplan berupa anakan pisang merah diperoleh dari Kampung Tawing Marapat Rt 05 Rw 02 Desa Karang Suraga Kecamatan Cinangka Kabupaten Serang Provinsi Banten. Sebelum dijadikan eksplan anakan pisang tersebut dilakukan perbanyakan terlebih dahulu dengan menggunakan metode *split* bonggol yang ditanam pada polybag berukuran 35x35 cm yang berisikan media tanah, dan diletakan pada tempat yang ternaungi untuk menghindari cipratan air hujan. Bonggol anakan pisang merah dengan ukuran berkisar antara 0,5-1,5 cm kemudian diambil untuk dilakukan perbanyakan secara *in vitro* sampai kebutuhan eksplan dalam penelitian ini terpenuhi.

2. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat dari logam yang disterilkan dalam autoklaf dibungkus dengan kertas tebal. Botol-botol kultur disterilkan dengan cara dicuci hingga bersih kemudian dipanaskan dengan menggunakan autoklaf. Temperatur yang digunakan dalam sterilisasi alat ini adalah 121°C pada tekanan 1 atm selama 20 menit. Cawan petri dan alat tanam setelah disterilisasi disimpan dalam ruang inkubasi dengan keadaan terbungkus kertas sampai digunakan kembali. Alat-alat tanam seperti pinset dan scalpel disterilkan setiap akan dipakai dengan dicelupkan pada alkohol 70% kemudian dibakar pada lampu spiritus, dan selanjutnya dicelupkan dalam air steril.

3. Pembuatan Media dan Sterilisasi Media Kultur

Garam-garam dari media MS yang telah dibuat menjadi larutan stok diambil sesuai dengan konsentrasi yang dibutuhkan dan ditambah zat pengatur tumbuh BAP dan IAA sesuai perlakuan yaitu 0 ppm BAP, 2 ppm BAP, 4 ppm BAP, 0 ppm IAA, 0,25 ppm IAA, 0,50 ppm IAA. Kemudian ditambahkan *ascorbic acid* 100 mg/l, gula 30 g, PPM 0,5 ml/l dan aquades hingga mencapai 800 ml. Penyesuaian pH

antara 5,6-5,8 dengan menambahkan NaOH 0,1 N bila pH kurang dari 5,6 dan ditambahkan HCl 0,1 N bila pH lebih besar dari 5,8. Selanjutnya ditambahkan agar-agar 7 g dan akuades sampai volume media mencapai 1 liter, kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga mendidih dan homogen. Selanjutnya media dimasukkan ke dalam botol kultur steril masing-masing 35 ml dengan menggunakan corong yang steril, lalu ditutup dengan menggunakan tutup botol plastik dan direkatkan dengan plastik *wrap*, kemudian disterilisasi. Proses sterilisasi media dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Media yang telah disterilisasi diletakkan dalam ruang inkubasi selama satu minggu untuk melihat ada tidaknya media yang terkontaminasi.

4. Sterilisasi Lingkungan

Sterilisasi dilakukan dengan cara menyemprot permukaan *laminar air flow cabinet* (LAFC) dengan menggunakan alkohol 70%, alat-alat penanaman disemprotkan alkohol 70% terlebih dahulu ketika hendak dimasukan kedalam LAFC, lalu menyalakan lampu ultraviolet minimal 30 menit sebelum digunakan, untuk mematikan kontaminan yang ada di permukaan meja. Pekerja menyemprot tangannya dengan alkohol, sebelum bekerja menggunakan masker dan jas laboratorium. Setelah selesai digunakan, permukaan meja disemprot kembali dengan menggunakan alkohol 70%.

5. Sterilisasi Eksplan dan Penanaman

Tunas pisang merah asal Banten dicuci dengan menggunakan detergen dan dibilas hingga bersih, lalu direndam ke dalam botol berisi fungisida sebanyak 2 g/l selama 30 menit dengan cara digoyang, larutan dibuang lalu direndam ke dalam botol berisi bakterisida sebanyak 2 g/l selama 30 menit dengan cara digoyang. Selanjutnya diambil dan dimasukkan ke dalam LAF yang sudah disterilkan dengan alkohol 70% dan disinari sinar UV selama 30 menit lalu penyinaran dihentikan lampu blow dinyalakan. Selanjutnya eksplan dikupas sekali lalu dicuci dengan aquades steril sebanyak 3 kali selama 10 menit, lalu direndam dalam campuran bayclin 40%, twin 7 tetes dan air selama 20 menit dengan cara digoyang, kemudian dicuci dengan aquades steril sebanyak 3 kali selama 10 menit. Selanjutnya eksplan

dikupas sekali lagi lalu dicuci dengan aquades steril sebanyak 3 kali selama 10 menit, kemudian eksplan diletakkan pada petridish dan ditanam pada media kultur dengan pinset steril dan botol ditutup dengan menggunakan tutup botol dan direkatkan dengan plastik *wrap*.

6. Subkultur

Eksplan membutuhkan nutrisi dengan jumlah yang cukup untuk pertumbuhannya, sehingga perlu dilakukannya subkultur. Subkultur dilakukan dengan cara memindahkan eksplan pada media baru pada umur 4 MST yang bertujuan untuk mengoptimalkan pertumbuhan eksplan pisang merah.

7. Pemeliharaan dan Pengamatan

Eksplan yang telah ditanam kemudian diletakan pada rak kultur dalam ruangan steril dengan suhu terjaga antara 20-25°C dengan 24 jam penyinaran. Menyemprotkan alkohol 70% pada sekitar botol dan rak kultur setiap hari untuk menjaga lingkungan kultur agar tetap steril dan tidak terjadi kontaminasi. Apabila eksplan mengalami kontaminasi segera pindahkan dan keluarkan dari rak kultur untuk menghindari eksplan lain dari kontaminasi. Pengamatan eksplan dilakukan berdasarkan parameter pengamatan sampai dengan 6 MST.

8. Pengolahan Data

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif kuantitatif. Dalam metode ini meliputi pengumpulan data, analisis data, interpretasi data, dan kesimpulan. Pengolahan data pada penelitian ini menggunakan perhitungan komputerisasi program DSAASTAT ver. 1. 101.