

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Jenis, Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen. Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2021 sampai dengan bulan Juni 2022. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Sistem Pertanian Terpadu (SITANDU) Provinsi Banten.

#### **3.2. Alat dan Bahan**

Alat - alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas *jam*, gelas ukur, spatula, cawan petri, autoklaf, timbangan analitik, mikropipet, *Erlenmeyer*, *hot plate*, *stirrer*, *Laminar Air Flow* (LAF), pinset, scalpel, spray, bunsen, korek api, meteran, mata pisau, rak kultur, gelas beaker, kompor, panci, pipet tetes dan kamera.

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sumber eksplan atau bahan tanam berupa mata tunas dari bonggol pisang varietas Mas Kirana dan pisang varietas Tanduk, bahan agar, gula, pH indikator, *wrapping plastic*, *aluminium foil*, NaOH, HCl, media MS, kertas label, indikator pH, *alcohol 70%*, *alcohol 96%*, PPM, ZPT TDZ, *tween 80*, bakterisida, fungisida, dan aquades.

#### **3.3. Metode Pengumpulan dan Pengolahan Data**

##### **3.3.1. Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok Faktorial (RAK) yang terdiri dari 2 faktor. Faktor pertama yaitu varietas pisang (P) dan faktor kedua yaitu pemberian tingkat konsentrasi TDZ (T) yang berbeda.

Faktor pertama yaitu varietas pisang yang terdiri dari 2 taraf, yaitu :

P<sub>1</sub> = Pisang Mas Kirana

P<sub>2</sub> = Pisang Tanduk

Faktor kedua adalah konsentrasi TDZ yang terdiri dari 6 taraf, yaitu :

$$T_0 = 0 \text{ ppm}$$

$$T_1 = 0,1 \text{ ppm}$$

$$T_2 = 0,2 \text{ ppm}$$

$$T_3 = 0,3 \text{ ppm}$$

$$T_4 = 0,4 \text{ ppm}$$

$$T_5 = 0,5 \text{ ppm}$$

Kombinasi kedua faktor tersebut menghasilkan 12 kombinasi perlakuan (Tabel 1). Setiap kombinasi perlakuan masing-masing dilakukan ulangan sebanyak 3 kali sehingga terdapat 36 satuan percobaan. Masing-masing satuan percobaan terdapat 1 botol yang terdiri 1 eksplan, sehingga terdapat 36 eksplan yang ditanam.

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan Varietas Pisang dengan TDZ

Varietas Pisang	Konsentrasi TDZ (mg/L)					
	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>
P <sub>1</sub>	P <sub>1</sub> T <sub>0</sub>	P <sub>1</sub> T <sub>1</sub>	P <sub>1</sub> T <sub>2</sub>	P <sub>1</sub> T <sub>3</sub>	P <sub>1</sub> T <sub>4</sub>	P <sub>1</sub> T <sub>5</sub>
P <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> T <sub>0</sub>	P <sub>2</sub> T <sub>1</sub>	P <sub>2</sub> T <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> T <sub>3</sub>	P <sub>2</sub> T <sub>4</sub>	P <sub>2</sub> T <sub>5</sub>

### 3.3.2. Rancangan Analisis

Model linier yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Rancangan Acak Kelompok Faktorial, berikut rumusannya :

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

Keterangan :

$Y_{ijk}$  : Nilai pengamatan pada faktor perlakuan varietas ke-i, faktor perlakuan tingkat konsentrasi TDZ ke-j

$\mu$  : Nilai rata-rata umum

$\alpha_i$  : Pengaruh faktor varietas pada taraf ke-i, dimana  $i = 1, 2$

$\beta_j$  : Pengaruh tingkat konsentrasi TDZ pada taraf ke-j, dimana  $j = 0, 1, 2, 3, 4, 5$

$(\alpha\beta)_{ij}$  : Pengaruh interaksi antara faktor varietas ke-i dan konsentrasi TDZ ke-j

$\varepsilon_{ijk}$  : Pengaruh galat

$\sigma_k$  : Pengaruh Kelompok ke-K

- i : 1, 2 (perbedaan varietas pisang yang digunakan)  
 j : 0, 1, 2, 3, 4 dan 5 (perlakuan perbedaan konsentrasi TDZ)  
 k : Ulangan 1, 2, 3

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan penelitian ini dianalisis dengan menggunakan analisis ragam pada taraf 5%. Apabila sidik ragam menunjukkan berbeda nyata atau sangat nyata maka dilakukan uji lanjutan menggunakan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf  $\alpha = 5\%$ .

### 3.3.3. Rancangan Respon

Respon yang diamati dalam penelitian yaitu :

#### 1. Waktu Muncul Tunas (MST)

Parameter waktu muncul tunas diamati pada saat eksplan membentuk tunas, dengan dilakukannya pengamatan setiap minggu untuk mengetahui awal waktu tunas terbentuk setelah penanaman (MST)

#### 2. Tinggi Tunas (cm)

Parameter pengamatan tinggi tunas dilakukan dengan mengukur tinggi tunas yang terpanjang dengan meteran pada sampel eksplan. Pengamatan dilakukan pada 4 MST, 8 MST dan 12 MST.

#### 3. Jumlah Tunas (tunas)

Parameter pengamatan jumlah tunas dilakukan dengan menghitung jumlah tunas yang tumbuh, mulai dari saat pertama mulainya tumbuh tunas hingga 12 MST. Pengamatan dilakukan pada 4 MST, 8 MST dan 12 MST.

#### 4. Jumlah Daun (helai)

Parameter pengamatan jumlah daun dilakukan dengan menghitung jumlah daun yang tumbuh, mulai dari saat pertama mulainya tumbuh daun hingga 12 MST. Pengamatan dilakukan pada 4 MST, 8 MST dan 12 MST.

#### 5. Warna Eksplan

Parameter pengamatan warna eksplan dilakukan pada akhir pengamatan yaitu 12 MST dengan cara pengamatan visual warna eksplan yang terbentuk. Penentuan warna eksplan dilakukan berdasarkan buku *Munsell Color Chart for Plant Tissue*.

#### 6. Persentase *Browning* (%)

*Browning* ditandai akibat adanya antioksidan dalam eksplan yang tinggi sehingga menyebabkan perubahan warna pada eksplan. Pengamatan dilakukan secara visual, eksplan yang *browning* ditandai dengan warna kecoklatan pada media maupun eksplan. Persentase eksplan dihitung pada akhir penelitian atau 12 MST. Perhitungan tersebut menggunakan rumus :

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

#### 7. Persentase Eksplan Berakar (%)

Parameter pengamatan dilakukan dengan menjumlahkan eksplan yang berakar dan dihitung persentasenya. Hal ini bertujuan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh perlakuan terhadap pertumbuhan akar pada eksplan. Perhitungan tersebut menggunakan rumus :

$$\% \text{ Eksplan berakar} = \frac{\text{jumlah eksplan yang berakar}}{\text{jumlah total eksplan}} \times 100\%$$

#### 8. Persentase Eksplan Hidup (%)

Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati dan menghitung jumlah eksplan yang masih hidup, tidak terkontaminasi dan tidak mati secara fisiologis, sejak 1 MST sampai dengan 12 MST, dengan interval pengamatan 1 minggu sekali. Persentase eksplan hidup dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

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

#### 9. Persentase Eksplan Terkontaminasi (%)

Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati dan menghitung jumlah eksplan yang terkontaminasi cendawan, bakteri maupun keduanya, sejak 1 MST sampai dengan 12 MST, dengan interval pengamatan 1 minggu sekali. Persentase eksplan terkontaminasi dilakukan dengan menghitung jumlah eksplan yang terkontaminasi dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

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

### 3.3.4. Pelaksanaan Penelitian

Sumber bahan eksplan pisang yang digunakan adalah tunas yang diambil dari mata tunas bonggol anakan pisang Mas Kirana dan pisang Tanduk.

#### 1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Pelaksanaan penelitian diawali dengan sterilisasi alat. Sterilisasi alat meliputi alat-alat penanaman (pinset, scalpel, cawan petri) dan gelas *jam*. Sterilisasi alat-alat seperti cawan petri, pinset dan scalpel dilakukan dengan cara mencuci alat-alat tersebut sampai bersih kemudian dikeringkan. Alat yang sudah dikeringkan dibungkus koran lalu direkatkan dengan perekat bening agar tidak lepas. Alat dan bahan yang sudah dibungkus kemudian disterilkan menggunakan oven dengan suhu 121°C selama 30 menit. Sterilisasi botol kultur (botol *jam*) dilakukan dengan cara mencuci hingga bersih menggunakan sabun pembersih dibawah air mengalir. Setelah itu botol dikeringkan, botol-botol yang sudah kering kemudian disterilkan menggunakan oven dengan suhu 121°C selama 30 menit. Botol yang sudah steril kemudian disimpan pada lemari rak penyimpanan dan diletakkan secara terbalik (mulut botol menghadap kebawah).

## 2. Pembuatan Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media MS (Murashige dan Skoog). Media MS telah dikenal sebagai media dasar yang paling luas penggunaannya untuk berbagai jenis tanaman. Pembuatan media dimulai dengan cara menimbang media MS dan gula, lalu dilarutkan menggunakan aquades di dalam gelas ukur menggunakan *stirrer* dan *hot plate*. Untuk membuat media perlakuan dilakukan penambahan ZPT TDZ. Pengambilan ZPT dilakukan dengan mikropipet sesuai dengan kebutuhan perlakuan. Media MS yang sebelumnya telah dibuat lalu dilakukan perhitungan sesuai kebutuhan konsentrasi TDZ yang digunakan. Lalu dilakukan pengukuran pH meter, pH untuk tanaman berkisar 5,6-5,8. Penambahan HCl 1 N atau NaOH 1 N dilakukan pada saat pH larutan belum mencapai batas yang ditentukan. Lalu dipanaskan larutan media untuk ditambahkan agar sebanyak 7g. Setelah mendidih, dituangkan media kedalam gelas *jam* masing masing sebanyak 25 ml dan di tutup rapat menggunakan tutup botol *jam* lalu diberi *wrapping plastic* pada bagian tutup botol dan diberi label sesuai perlakuan. Selanjutnya media dimasukkan kedalam autoklaf dengan suhu 121<sup>0</sup>C, tekanan 1,5 Psi selama 15 menit yang berfungsi agar media tetap steril. Media hasil sterilisasi dipindahkan kedalam rak kultur.

## 3. Sterilisasi Eksplan

Prosedur kerja sterilisasi sebagai langkah awal inisiasi yaitu sterilisasi tunas anakan Pisang Mas Kirana dan Pisang Tanduk. Eksplan dibersihkan di bawah air mengalir hingga 30 menit. Hal ini dilakukan untuk mencegah sumber kontaminasi yang masih menempel di permukaan. Sterilisasi dilakukan dengan mencuci bersih dengan air mengalir, rendam selama 20 menit dalam air steril 100 ml yang ditambahkan 2 tetes *tween* 80. Bahan tanam direndam dalam larutan fungisida dan bakterisida 0,2 g/100 ml yang selama 1 jam secara bergantian, lalu dibilas 3 kali. Tahapan sterilisasi selanjutnya dilakukan di dalam LAF. Bahan tanam direndam dalam larutan alkohol 70% selama 1 menit lalu dibilas sebanyak 3 kali. Selanjutnya direndam dalam larutan pemutih sebanyak 30% dan 20% selama 30 menit dan 20 menit lalu dibilas sebanyak 3 kali. Setelah dibilas kupas 1-2 pelepah. Kupas sampai 3 daun pelepah ukuran lebih 1.5 x 1.5 cm.

#### 4. Penanaman Eksplan

Penanaman dilakukan di dalam LAF yang telah disterilkan dengan penyemprotan dengan alkohol 70% dan disinari dengan sinar Ultra Violet (UV) selama 30 menit. Setelah itu, menyalakan lampu dan blower, masukan alat dan bahan yang diperlukan seperti pinset, bunsen, cawan petri, scalpel, tisu kultur, spidol, dan *wrapping plastic* ke dalam LAF. Anakan pisang sesuai dengan ukuran. Pengupasan dan pemindahan eksplan ke dalam botol dilakukan dengan menggunakan pisau dan pinset yang telah disterilkan dengan alkohol 70%. Proses penanaman dilakukan dengan cara botol kultur dipanasi terlebih dahulu di bagian mulut botol untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Tutup botol dibuka dengan hati-hati lalu eksplan ditanam di atas media dengan pinset steril. Sebelum ditutup, mulut botol dipanaskan kembali. Setelah itu, botol diberi label perlakuan dan tanggal penanamannya. Eksplan diinkubasi dalam ruang inkubator dengan suhu ruangan 20<sup>0</sup>C-24<sup>0</sup>C serta disinari dengan lampu TL.

#### 5. Pemeliharaan

Pemeliharaan dilakukan dengan menyemprotkan alkohol 70% pada botol-botol eksplan. Pemeliharaan ini penting untuk menjaga kultur agar tidak terkontaminasi. Selain itu, suhu didalam ruangan juga harus diperhatikan, kisaran suhu yang digunakan yaitu 20<sup>0</sup>C-24<sup>0</sup>C. Botol kultur yang terkontaminasi kemudian

segera dikeluarkan dari ruang inkubasi, hal ini dilakukan untuk meminimalisir kontaminasi menyebar ke botol kultur yang lain.

#### 6. Pengolahan Data

Pengolahan data pada penelitian ini menggunakan metode deskriptif kuantitatif dan kualitatif. Dalam metode ini meliputi pengumpulan data, analisis data, interpretasi data dan kesimpulan. Pengolahan data pada penelitian ini menggunakan perhitungan komputasi program DSAASTAT.