

### III. BAHAN DAN METODE

#### 3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium UPT BBI (Balai Benih Induk) Jl. Jendral Besar Dr. Abdul Haris Nasution Gedung Johor Medan Sumatera Utara, selama 3 bulan, mulai bulan Februari 2016 sampai April 2016.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi neraca analitik, LACF (laminar air flow cabinet), autoclaf, hot plate, freezer, rak, beaker glass, botol kultur, batang pengaduk, rak kultur, cawan petri, labu ukur, alat diseksi, pipet tetes, petridish, Erlenmeyer, gelas ukur, handsprayer, timer, termometer, pH meter, kapas, mikrowave, tissue, masker, penutup kepala, aluminium foil, sarung tangan, dan lampu spiritus.

##### 3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi media MS (Murashige dan Skoog), anakan pisang barangan, IBA (*Indole-3-butyric acid*) dengan taraf konsentrasi (0,0; 0,5; 1,00 dan 1,50) mg/l dan BA (*Benzyladenin*) dengan taraf konsentrasi (0,0; 1,5; 3,0; dan 4,5) mg/l, agar-agar, *chlorox* (40%), tween 80%, alkohol 70% dan 96%, akuades steril.

#### 3.3 Metode Penelitian

Data yang diperoleh dianalisis secara Kualitatif dan Kuantitatif. Analisis data kualitatif yang didapatkan dari hasil pengamatan secara visual yang terjadi pada eksplan pisang barangan seperti kontaminasi oleh jamur dan bakteri, pencoklatan (browning), dan tingkat kematian eksplan. Eksplan yang

dideskripsikan meliputi keseluruhan eksplan pisang barangan, yang dihitung dari awal kegiatan penelitian yaitu proses sterilisasi hingga akhir kegiatan penelitian yaitu pemberian IBA dan BA sebagai perlakuan terhadap media kultur.

Perhitungan persentase pengamatan secara visual yaitu tingkat kontaminasi oleh jamur dan bakteri, pencoklatan (browning), kematian, keberhasilan, dan tidak bertunas pada eksplan yang dijabarkan pada rumus berikut ini:

$$\% \text{ Tingkat kontaminasi} = \frac{\Sigma \text{ eksplan terkontaminasi}}{N} \times 100\%$$

$$\% \text{ Tingkat pencoklatan} = \frac{\Sigma \text{ eksplan mengalami pencoklatan}}{N} \times 100\%$$

$$\% \text{ Tingkat kematian} = \frac{\Sigma \text{ eksplan mengalami kematian}}{N} \times 100\%$$

$$\% \text{ Tingkat keberhasilan} = \frac{\Sigma \text{ eksplan yang bertunas}}{N} \times 100\%$$

$$\% \text{ Tingkat tidak bertunas} = \frac{\Sigma \text{ eksplan tidak bertunas}}{N} \times 100\%$$

Keterangan : N = jumlah total eksplan yang tersedia tiap perlakuan.

Analisis data secara statistik dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dua faktor yaitu pemberian IBA dengan taraf konsentrasi (0,0; 0,5; 1,0; dan 1,5) mg/l dan BA dengan taraf konsentrasi (0,0; 1,5; 3,0; dan 4,5) mg/l. Penelitian ini terdiri dari 16 perlakuan dengan 4 ulangan sehingga terdapat 64 satuan percobaan.

Model umum rancangan yang digunakan adalah sebagai berikut (Mattjik dan Sumertajaya, 2000):

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

Dimana :

$$i = 1, 2, 3, \dots, 16$$

$$j = 1, 2, 3, 4$$

Keterangan:

$Y_{ij}$  = Hasil pengamatan terhadap eksplan pisang barangan pada perlakuan ke  $i$  dan ulangan ke  $j$

$\mu$  = Nilai tengah umum (rata-rata populasi)

$\tau_i$  = Pengaruh perlakuan ke  $i$

1.  $I0B0 = MS + IBA\ 0,0\ \text{mg/l} + BA\ 0,0\ \text{mg/l}$

2.  $I0B1 = MS + IBA\ 0,0\ \text{mg/l} + BA\ 1,5\ \text{mg/l}$

3.  $I0B2 = MS + IBA\ 0,0\ \text{mg/l} + BA\ 3,0\ \text{mg/l}$

4.  $I0B3 = MS + IBA\ 0,0\ \text{mg/l} + BA\ 4,5\ \text{mg/l}$

5.  $I1B0 = MS + IBA\ 0,5\ \text{mg/l} + BA\ 0,0\ \text{mg/l}$

6.  $I1B1 = MS + IBA\ 0,5\ \text{mg/l} + BA\ 1,5\ \text{mg/l}$

7.  $I1B2 = MS + IBA\ 0,5\ \text{mg/l} + BA\ 3,0\ \text{mg/l}$

8.  $I1B3 = MS + IBA\ 0,5\ \text{mg/l} + BA\ 4,5\ \text{mg/l}$

9.  $I2B0 = MS + IBA\ 1,0\ \text{mg/l} + BA\ 0,0\ \text{mg/l}$

10.  $I2B1 = MS + IBA\ 1,0\ \text{mg/l} + BA\ 1,5\ \text{mg/l}$

11.  $I2B2 = MS + IBA\ 1,0\ \text{mg/l} + BA\ 3,0\ \text{mg/l}$

12.  $I2B3 = MS + IBA\ 1,0\ \text{mg/l} + BA\ 4,5\ \text{mg/l}$

13.  $I3B0 = MS + IBA\ 1,5\ \text{mg/l} + BA\ 0,0\ \text{mg/l}$

14.  $I3B1 = MS + IBA\ 1,5\ \text{mg/l} + BA\ 1,5\ \text{mg/l}$

15.  $I3B2 = MS + IBA\ 1,5\ \text{mg/l} + BA\ 3,0\ \text{mg/l}$

16.  $I3B3 = MS + IBA\ 1,5\ \text{mg/l} + BA\ 4,5\ \text{mg/l}$

$\epsilon_{ij}$  = Pengaruh galat percobaan pada eksplan pisang ke  $j$  yang memperoleh perlakuan ke  $i$

Untuk mengetahui pengaruh pemberian IBA dan BA dengan konsentrasi

yang berbeda pada penelitian ini maka dilakukan Uji F dan selanjutnya data yang dikumpulkan selama penelitian berlangsung dianalisis menggunakan sidik ragam dan Duncan Multiple Range Test (DMRT) pada taraf  $\alpha = 5 \%$ .

### **3.4 Metode Kerja**

#### **3.4.1 Pembuatan Media**

##### **3.4.1.1 Pembuatan Larutan Stok**

Larutan stok yang akan dibuat berdasarkan pengelompokannya terdiri dari stok makro, stok mikro, stok Fe-EDTA, stok vitamin dan stok zpt. Pembuatan larutan stok bertujuan untuk menghemat pekerjaan menimbang bahan yang berulang-ulang setiap kali membuat media. Komposisi larutan stok yang digunakan disajikan pada lampiran 1. Unsur hara yang telah ditimbang sesuai dengan massa yang telah ditentukan kemudian dilarutkan dalam air steril atau aquades steril. Larutan stok yang telah selesai dibuat, disimpan di freezer.

##### **3.4.1.2 Pembuatan Media Perlakuan**

Pembuatan media dengan larutan stok dilakukan dengan metode pengenceran. Pengambilan setiap larutan stok yang dibutuhkan untuk pembuatan media MS sebanyak 1 liter dapat dilihat pada lampiran 1. Penambahan gula pasir sebanyak 30 gr/l hendaknya dilakukan sebelum pengenceran, sehingga volume akhir yang akan dibuat tepat. Komposisi media yang sudah lengkap kemudian dilarutkan dan diencerkan dengan menggunakan air aquades hingga mencapai volume akhir (1 liter).

Untuk merangsang multiplikasi tunas dan pertumbuhan eksplan, ke dalam larutan media MS ditambah zat pengatur tumbuh (ZPT) yaitu IBA dengan taraf konsentrasi (0,0; 0,5; 1,00; dan 1,50) mg/l dan BA dengan taraf konsentrasi (0,0;

1,5; 3,0; dan 4,5) mg/l. Penambahan beberapa jenis auksin dan sitokinin tersebut dilakukan sebelum pengukuran pH yang berkisar antara 5,8. Apabila pH > 5,8 dapat ditambahkan HCl, sedangkan jika pH < 5,8 dapat ditambahkan NaOH. Tambahkan agar-agar 7-8 g/l ke dalam media dan selanjutnya diaduk sampai homogen menggunakan magnetik stirer. Larutan tersebut ditutup dengan menggunakan plastik wrap yang diberi lubang untuk proses pemasakan menggunakan microwave. Media perlakuan yang telah homogen, dituang ke dalam botol kultur ± 20-25 ml/botol untuk seluruh perlakuan, kemudian ditutup dan selanjutnya dilakukan proses sterilisasi.

### **3.4.2 Sterilisasi**

#### **3.4.2.1 Sterilisasi Alat-alat dan Media Kultur**

Alat-alat yang digunakan dalam penanaman harus dalam keadaan steril. Alat-alat logam (pinset, gunting, scalpel), gelas (cawan petri, beaker glass, botol kultur, pipet) disterilkan dengan autoklaf pada temperatur 121<sup>0</sup>C dan tekanan 17,5 psi selama 30 menit. Pada saat proses penanaman alat-alat tanam dicelupkan ke dalam alkohol 96%, kemudian bakar di atas api bunsen. Proses sterilisasi media kultur dilakukan dengan autoclave pada tekanan 17,5 psi dan suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Sterilisasi air steril dapat dilakukan dengan tekanan, suhu, dan waktu yang sama dengan sterilisasi media.

#### **3.4.2.2 Sterilisasi Eksplan**

Bahan tanaman (eksplan) disterilisasi sebelum ditanam. Sterilisasi dilakukan sesuai dengan prosedur yang telah dilakukan di laboratorium kultur jaringan tanaman BBI. Eksplan yang diambil dari alam dibersihkan dengan air yang mengalir, kemudian eksplan direndam dengan deterjen (10 ml deterjen ke

dalam 5 l air) selama 5-10 menit, selanjutnya eksplan dibersihkan dengan akuades steril selama 3 kali pengulangan, selanjutnya eksplan dibawa keruang kultur. Eksplan kemudian direndam ke dalam 70% alkohol selama 20-30 detik, lalu di rendam ke dalam 40% *clorox* selama 20 menit, setelah itu eksplan direndam ke dalam akuades steril selama 3x15 menit. Lalu eksplan diletakkan pada kertas tisu steril agar air yang melekat pada eksplan diserap kertas tissue. Semua pekerjaan di ruangan kultur terjadi di dalam laminar air flow. Tahap selanjutnya penanaman eksplan pada media perlakuan.

### **3.4.3 Kultur Eksplan**

Eksplan-eksplan yang steril dikultur dalam media MS sesuai perlakuan dengan ukuran eksplan 0,8-1,5 cm. Penanaman dilakukan dengan cara memotong eksplan dan menanam pada media perlakuan.

### **3.5 Pengamatan**

Pengamatan tanaman dimulai 1 minggu setelah tanam sampai tanaman berumur 8 minggu dengan interval waktu pengamatan seminggu sekali tanpa mengeluarkan tanaman dari botol kultur. Parameter yang diamati meliputi:

#### **1. Persentase Keberhasilan**

Persentase keberhasilan ialah persentase pembentukan tunas tanaman hidup yang diamati tiap minggu sampai akhir pengamatan. Persentase pembentukan tunas dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$P = \frac{A}{B} \times 100 \%$$

P = Persentase keberhasilan

A= Jumlah eksplan membentuk tunas

B= Jumlah eksplan pada perlakuan

## 2. Persentase Kontaminasi

Persentase kontaminasi ialah persentase hadirnya mikroorganisme pengganggu eksplan dan diamati tiap minggu sampai akhir pengamatan.

Persentase kontaminasi dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$P = \frac{A}{B} \times 100 \%$$

P = Persentase kontaminasi

A = Jumlah eksplan yang terkontaminasi

B = Jumlah eksplan pada perlakuan

## 3. Persentase Browning

Persentase browning ialah persentase pencoklatan eksplan pada media kultur dan diamati tiap minggu sampai akhir pengamatan. Persentase pembentukan browning dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$P = \frac{A}{B} \times 100 \%$$

P = Persentase browning

A = Jumlah eksplan yang browning

B = Jumlah eksplan pada perlakuan

## 4. Persentase Kematian

Persentase kematian ditandai dengan perubahan warna eksplan menjadi lebih gelap dan tidak adanya tanda-tanda pembentukan tunas. Persentase kematian dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$P = \frac{A}{B} \times 100 \%$$

P = Persentase kematian

A = Jumlah eksplan yang kematian

B = Jumlah eksplan pada perlakuan

## 5. Persentase Tidak Bertunas

Persentase tidak bertunas eksplan ditandai dengan tidak adanya tanda-tanda pembentukan tunas serta tidak menunjukkan perubahan baik warna maupun penambahan massa eksplan. Persentase tidak bertunas eksplan dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$P = A/B \times 100 \%$$

P = Persentase tidak bertunas

A= Jumlah eksplan yang tidak bertunas

B= Jumlah eksplan pada perlakuan

## 6. Jumlah Tunas

Jumlah tunas yang diamati ialah jumlah tunas yang terbentuk per eksplan dan diamati secara rutin setiap seminggu sekali sampai akhir pengamatan.