

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur *In Vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan Desember 2018 – Februari 2019.

B. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan sebagai penelitian yaitu eksplan berupa buku tanaman krisan Tadasita Agrihorti steril, alkohol, kulit pisang Ambon, pupuk daun (Growmore), fungisida Dithane, bakterisida Agrept, agar, sukrosa, medium MS, spiritus, ppm, KOH, HCl, aluminium foil, *plastic wrap*, kertas payung, pH *stick* dan aquadest steril.

Alat yang digunakan yaitu autoklaf, *handsprayer*, scalpel, timbangan analitik, botol kultur, *Laminar Air Flow* (LAF), petridish, lampu Bunsen, pinset, gelas piala, pengaduk, pinset, kompor, gunting, gelas ukur, erlenmeyer, pipet tetes dan alat tulis.

C. Metode Penelitian

Penelitian dilaksanakan dengan metode laboratorium faktor tunggal 8 perlakuan. Masing-masing perlakuan diulang 3 kali. Setiap ulangan terdiri atas 3 sampel sehingga ada 72 unit yang disusun menurut Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan yang dicobakan yaitu multiplikasi krisan pada media pupuk daun yang telah ditambahkan dengan air kelapa dengan penambahan kulit pisang Ambon.

1. Penambahan kulit pisang dalam 50 g/l (KD50)
2. Penambahan kulit pisang dalam 100 g/l (KD100)
3. Penambahan kulit pisang luar 50 g/l (KD50)
4. Penambahan kulit pisang luar 100 g/l (KD50)
5. Penambahan kulit pisang gabungan 50 g/l (KD50)
6. Penambahan kulit pisang gabungan 100 g/l (KD50)
7. Tanpa penambahan kulit pisang (KD50)
8. MS + NAA 0,5 ppm + BAP 1 ppm (KD50)

D. Cara Penelitian

1. Sterilisasi Alat

a. Sterilisasi Basah

Alat yang digunakan disterilkan dengan menggunakan dua cara yaitu sterilisasi basah dan sterilisasi bakar. Sterilisasi basah dilakukan dengan cara memasukkan alat yang telah dibungkus kertas pada autoklaf selama 2 jam dengan tekanan 1 atm pada suhu 120°C. Alat-alat yang disterilkan antara lain petridish, botol kultur sebanyak 72 buah, erlenmeyer, pinset, dan aluminium foil.

b. Sterilisasi Bakar

Sterilisasi bakar dilakukan di dalam LAF pada saat alat akan digunakan untuk inokulasi dengan cara merendam alat yang telah disterilkan dalam alkohol 70% dan setiap kali akan digunakan alat tersebut dibakar pada spiritus hingga alkohol kering.

c. Sterilisasi UV

Sebelum digunakan untuk kegiatan inokulasi yang mutlak steril, maka dinding kaca dalam *Laminar Air Flow* disemprot alkohol 70% dan dikeringkan dengan tisu bersih. Alat-alat yang steril untuk digunakan dalam kegiatan inokulasi dimasukkan dalam LAF dan lampu UV dinyalakan selama 1 jam dan menghidupkan blower 10 menit sebelum kegiatan dimulai.

2. Sterilisasi Kulit Pisang

Sterilisasi bahan organik berdasarkan pada penelitian Hasrat (2013). Kulit pisang Ambon direndam menggunakan bakterisida Agrept dan fungisida Dithane selama 12 jam. Setelah itu, kulit pisang dicuci dengan air hingga bersih lalu direbus sampai mendidih. Setelah direbus, kulit pisang diambil bagian dalam dan luarnya lalu dihancurkan menggunakan blender. Kemudian kulit pisang yang telah halus ditimbang sesuai perlakuan yang selanjutnya akan dicampur dengan media pupuk daun dan air kelapa.

3. Pembuatan Media

1. Pembuatan Larutan Stok

a. Larutan Stok Makro

Menimbang persenyawaan NH_4NO_3 16,5 g, KNO_3 19 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,7 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4,4 g, dan KH_2PO_4 1,7 g. Bahan yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam gelas piala bersih yang telah berisi aquadest kira-kira 100 ml, kemudian diaduk rata. Menambahkan aquadest

hingga volume larutan tepat 500 ml. Memberi label stok makro 50 ml/l.

Untuk membuat 1 liter media dibutuhkan 50 ml stok makro.

b. Larutan Stok Mikro

Menimbang persenyawaan $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.223g, H_3BO_3 0.062 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.158 g, KI 0.0083 g, $\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0025g. Bahan yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam gelas piala bersih yang telah berisi aquadest kira-kira 50 ml, kemudian diaduk rata. Menambahkan aquadest hingga volume larutan tepat 100 ml. Memberi label stok makro 10 ml/l.

Untuk membuat 1 liter media dibutuhkan 10 ml stok mikro.

c. Larutan Stok Vitamin

Menimbang bahan-bahan kimia vitamin; Nicotinic-acid 0,005 g, Pyridoxine-HCL 0,005 g, Thiamine-HCl 0,001 g, Glycine 0,02 g, kemudian melarutkan bahan-bahan tersebut kedalam gelas beaker yang berisi 50 ml aquadest steril dan diaduk dengan *Magnetic stirrer* sampai homogen. Menambahkan aquadest pada larutan stok hingga volumenya menjadi 100 ml, untuk membuat 1 liter medium diperlukan 10 ml larutan stok vitamin. Memberi label pada botol stok vitamin 10 ml/l.

d. Larutan Stok NAA

Menimbang persenyawaan NAA 0,01 g. Bahan yang telah ditimbang dimasukan kedalam erlenmeyer. Tambahkan NaOH untuk melarutkan NAA, dan tambahkan aquadest hingga volume sampai tepat 100 ml

kemudian memberi label 100 ppm = 10 ml/l, untuk membuat 1 liter medium dibutuhkan 10 ml stok NAA.

e. Larutan Stok BAP

Menimbang persenyawaan BAP 0.01 g. Bahan yang telah ditimbang dimasukkan kedalam gelas piala bersih. Kemudian menambahkan beberapa tetes HCl 1 N. Lalu menambahkan aquadest kira-kira 25 ml dan diaduk rata. Menambahkan aquadest hingga volume larutan tepat 100 ml. Memberi label stok BAP 100 ppm= 10 ml/l. Untuk membuat 1 liter media dibutuhkan 1 mg/l BAP diperlukan 10 ml stok BAP.

f. Larutan Mio-Inositol

Menimbang persenyawaan Mio-Inositol 1 g. Bahan yang telah ditimbang dimasukan kedalam erlenmeyer. Tambahkan aquadest hingga volume sampai tepat 100 ml, kemudian memberi label pada botol stok Mio-Inositol 10 ml/l, untuk membuat 1 liter medium diperlukan 10 ml stok Mio-Inositol.

2. Pembuatan Media Pupuk Daun

Media pupuk daun yang diperlukan untuk 1 perlakuan yaitu 10 botol dan tiap botol berisi 20 ml adalah $10 \times 20 \text{ ml} = 200 \text{ ml}$. Media pupuk daun sebanyak 200 ml dibuat dengan menggunakan erlenmeyer. Media pupuk daun dibuat dengan memasukkan bahan pupuk daun 0,6 g kedalam tabung erlenmeyer yang telah diisi akuades 200 ml, kemudian di aduk sampai homogen. Setelah itu tambahkan kulit pisang Ambon bagian dalam

konsentrasi 50 g/l pada 2 erlenmeyer sebanyak 10 g dan 2 erlenmeyer lainnya dengan konsentrasi 100 g/l sebanyak 20 g. Sama halnya dengan pembuatan media pupuk daun dengan penambahan kulit pisang bagian luar. Untuk penambahan kulit pisang gabungan 50 g/l yaitu dengan memasukkan kulit pisang gabungan sebanyak 10 g. Sedangkan untuk konsentrasi 100 g/l yaitu masing-masing sebanyak 20 g. Selanjutnya menambahkan sukrosa sebanyak 6 g. Kemudian tambahkan PPM sebanyak 0,1 ml. Kemudian media dimasak menggunakan kompor. Selanjutnya dilakukan pengukuran pH larutan medium, jika pH medium kurang dari 6 maka ditambahkan KOH dan jika lebih dari 6 maka ditambahkan HCl. Bahan yang terakhir dimasukan adalah pematat agar sebanyak 1,4 g, kemudian diaduk menggunakan pengaduk sampai homogen. Larutan tersebut dipanaskan hingga mendidih kemudian dituangkan ke dalam botol kultur masing-masing sebanyak 20 ml dan ditutup dengan plastik dan diikat karet. Selanjutnya dilakukan sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121⁰C dengan tekanan 1 atm selama 120 menit. Setelah selesai medium disimpan sementara di ruang inkubasi.

3. Media MS (Murashige dan Skoog)

Media MS yang diperlukan untuk 1 perlakuan yaitu 10 botol dan tiap botol berisi 20 ml adalah 10x20 ml = 200 ml. Medium MS sebanyak 200 ml dibuat dengan menggunakan erlenmeyer. Media MS dibuat dengan mencampurkan larutan stok antara lain: larutan stok makro 10 ml, larutan stok mikro 2 ml, stok vitamin 2 ml, mio-inositol 2 ml, dan sukrosa 6 g.

Bahan – bahan tersebut dimasukkan kedalam tabung erlenmeyer yang telah diisi akuades 200 ml, kemudian di aduk sampai homogen. Setelah itu tambahkan NAA konsentrasi 0,5 ppm sebanyak 1 ml dan BAP dengan konsentrasi 1 ppm sebanyak 2 ml pada erlenmeyer. Selanjutnya menambahkan sukrosa sebanyak 6 g. Kemudian tambahkan PPM sebanyak 0,1 ml. Kemudian media dimasak menggunakan kompor. Selanjutnya dilakukan pengukuran pH larutan medium, jika pH medium kurang dari 6 maka ditambahkan KOH dan jika lebih dari 6 maka ditambahkan HCl. Bahan yang terakhir dimasukan adalah pematat agar sebanyak 1,4 g, kemudian diaduk menggunakan pengaduk sampai homogen. Larutan tersebut dipanaskan hingga mendidih kemudian dituangkan ke dalam botol kultur masing-masing sebanyak 20 ml dan ditutup dengan plastik dan diikat karet. Selanjutnya dilakukan sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121⁰C dengan tekanan 1 atm selama 120 menit. Setelah selesai medium disimpan sementara di ruang inkubasi.

4. Persiapan Bahan Tanam

Bahan tanam yang digunakan untuk penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Kultur *In Vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta berupa eksplan buku krisan varietas Tadasita Agrihorti steril dan kemudian diperbanyak.

5. Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan dilakukan dengan cara merendam eksplan dalam larutan betadine yang dicampur dengan aquadest steril pada petridish.

6. Inokulasi Eksplan

Penanaman eksplan dilakukan di dalam LAF (*Laminar Air Flow*). Eksplan yang disubkultur adalah potongan batang satu buku krisan steril. Selanjutnya mengambil eksplan secara aseptik dengan bantuan pinset steril. Eksplan siap ditanam pada media kultur yang berisi media pupuk daun 3g/l dan air kelapa 150 ml/l dengan penambahan berbagai konsentrasi kulit pisang bagian dalam, luar, dan gabungan kulit dalam dan kulit luar. Setelah itu masing-masing botol diberi label sesuai perlakuan dan disimpan pada ruang inkubasi.

7. Inkubasi

Botol-botol yang telah ditanami eksplan diletakkan pada rak-rak kultur didalam ruang inkubasi dengan pengaturan suhu 25-28°C dan cahaya UV 100-400 ft-c (1000-4000 lux).

E. Parameter yang Diamati

1. Persentase Eksplan Hidup (%)

Persentase eksplan hidup dihitung dengan cara membandingkan jumlah eksplan yang hidup dengan jumlah eksplan keseluruhan pada botol kultur. Pengamatan dilakukan pada minggu ke-8 setelah tanam.

$$\% \text{Eksplan hidup} = \frac{\text{Eksplan hidup}}{\text{Eksplan keseluruhan}} \times 100\%$$

2. Persentase Kontaminasi (%)

Persentase kontaminasi diamati dari 1 MST hingga 8 MST. Penyebab kontaminasi yang diamati misalnya cendawan, bakteri, atau virus.

$$\% \text{Eksplan kontaminasi} = \frac{\text{Eksplan kontaminasi}}{\text{Eksplan keseluruhan}} \times 100\%$$

3. Persentase *Browning* (%)

Persentase eksplan yang mengalami pencoklatan (*browning*) diamati dari 1 MST hingga 8 MST.

$$\% \text{Eksplan } \textit{browning} = \frac{\text{Eksplan } \textit{browning}}{\text{Eksplan keseluruhan}} \times 100\%$$

4. Pertumbuhan Tanaman (Hari Ke-)

Pertumbuhan tanaman yaitu proses munculnya tunas pada eksplan yang diamati setelah eksplan ditanam sampai muncul tunas mulai dari 1 MST sampai 8 MST.

5. Tinggi Tanaman (cm)

Pengamatan dilakukan dengan cara mengukur tinggi tanaman menggunakan penggaris mulai dari titik tumbuh tunas baru hingga ujung pucuk tanaman. Pengamatan tinggi tanaman dilakukan setiap minggu mulai dari 1 MST hingga 8 MST.

6. Jumlah Daun (helai)

Pengamatan jumlah daun dilakukan dengan cara menghitung daun yang telah membuka penuh. Pengamatan dilakukan setiap minggu mulai dari 1 MST hingga 8 MST.

7. Jumlah Tunas

Jumlah tunas yang terbentuk dihitung semua tunas yang terbentuk pada setiap botol kultur. Diamati setiap minggu setelah tanam selama 8 minggu.

8. Saat Tumbuh Akar (Hari Ke-)

Saat muncul akar diamati setelah eksplan ditanam sampai muncul tunas mulai dari 1 MST sampai 8 MST.

9. Warna Daun

Warna daun ditentukan pada akhir pengamatan yaitu minggu ke-8 setelah tanam menggunakan *Munsell Color Chart for Plant Tissues*.

F. Analisis Data

Data yang telah diperoleh dianalisis dengan analisis sidik ragam (*Analysis of Variance*) dengan taraf kesalahan 0,05. Apabila terdapat beda nyata antar perlakuan maka dilakukan uji lanjut menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) taraf kesalahan 0,05. Hasil disajikan dalam bentuk tabel dan grafik dan sebagian data disajikan dalam bentuk gambar. Adapun hasil persentase disajikan dalam bentuk tabel.