

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur *In Vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan Januari – Maret 2019.

B. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian yaitu eksplan tanaman Krisan varietas Suciyono berumur 4 bulan, deterjen, kulit pisang, Pupuk Organik Cair (POC), media Murashige & Skoog, fungisida, bakterisida, agar, gula pasir, spiritus, KOH, HCl, alkohol 70%, akuades steril, larutan BAP, larutan NAA, ppm, aluminium foil, *plastic wrap*, kertas payung, dan pH *stick*.

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

C. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen faktor tunggal 8 perlakuan yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan yang diujikan yaitu jenis media (POC dan kulit pisang) dan Zat Pengatur Tumbuh (NAA, BAP, dan Air Kelapa), sehingga total perlakuan sebanyak 8 perlakuan. Setiap

perlakuan diulang 3 kali, setiap ulangan terdiri dari 3 sampel sehingga terdapat 72 unit.

Adapun perlakuan yang diujikan yaitu:

1. MS + NAA 0,5ppm + BAP 2ppm
2. POC + Air kelapa
3. POC + Air kelapa + Kulit pisang dalam 50 g/l
4. POC + Air kelapa+ Kulit pisang dalam 100 g/l
5. POC + Air kelapa + Kulit pisang luar 50 g/l
6. POC + Air kelapa + Kulit pisang luar 100 g/l
7. POC + Air kelapa +Kulit pisang gabungan 50 g/l
8. POC + Air kelapa + Kulit pisang gabungan 100 g/l

POC yang digunakan sebanyak 3 ml/l dan air kelapa sebanyak 150 ml/l.

D. Cara Penelitian

1. Sterilisasi Alat

a. Sterilisasi Basah

Sterilisasi basah dilakukan dengan cara memasukkan alat yang telah dibungkus kertas pada autoklaf selama 2jam dengan tekanan 1 atm pada suhu 120°C. Alat-alat yang disterilkan antara lain disetting kit, botol kultur, erlenmeyer, 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

Sterilisasi UV bertujuan untuk mensterilisasi LAF sebelum dilakukannya inokulasi. 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, setelah satu jam UV dimatikan dan menghidupkan blower. Inokulasi dilakukan 10 menit setelah blower dihidupkan.

2. Sterilisasi Kulit Pisang

Sterilisasi kulit pisang berdasar pada penelitian Prayogi (2013) bahwa kulit pisang Ambon direndam menggunakan bakterisida dan fungisida dengan lama perendaman 12 jam. Setelah itu, kulit pisang dicuci dengan air hingga bersih, kemudian direbus hingga mendidih. Setelah direbus, kulit pisang dipisahkan bagian dalam dan luar kemudian diblender hingga halus. Kulit pisang yang telah halus ditimbang sesuai dengan perlakuan.

3. Pembuatan Media

1. Pembuatan Larutan Stok

i. Larutan Stok Makro

Menimbang bahan-bahan senyawa seperti NH_4NO_3 33 g; KNO_3 38 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7,4 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8,8 g; dan KH_2PO_4 3,4 g. Bahan yang telah ditimbang dimasukkan dalam gelas piala yang berisi aquadest 100 ml, kemudian diaduk rata. Menambahkan aquadest hingga volume larutan tepat

500 ml, kemudian memberi label pada botol stok larutan makro 50 ml/l. Untuk membuat 1 liter media membutuhkan 50 ml larutan stok makro.

ii. Larutan Stok Mikro

Menimbang bahan-bahan senyawa $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,69 g/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,86 g/l; H_3BO_3 0,62 g/l; KI 0,083 g/l; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,0025 g/l; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,00025g/l; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,00025 g/l. Bahan yang telah ditimbang dimasukkan kedalam gelas piala yang berisi kira-kira 50 ml, kemudian diaduk hingga rata. Menambahkan akuades hingga volume larutan tepat 100 ml, kemudian memberi label pada botol stok larutan mikro 10ml/l. Untuk membuat 1 liter media membutuhkan 10 ml larutan stok mikro.

iii. Larutan Stok Vitamin

Menimbang bahan-bahan kimia vitamin seperti, Nicotinic-acid 0,05 g; Pyridoxine-HCl 0,05 g; Thiamin 0,001 g; Glycine 0,2 g. Bahan yang telah ditimbang kemudian dimasukkan dalam gelas beaker yang berisi 50 ml aquadest, diaduk dengan Magnetic stirrer hingga homogen. Menambahkan aquadest hingga volume larutan tepat 100 ml, kemudian memberi label pada botol larutan stok vitamin 10 ml/l. Untuk membuat 1 liter media membutuhkan 10 ml larutan stok vitamin.

iv. Larutan Stok Mio-Innositol

Menimbang persenyawaan Mio-Innositol sebanyak 10 g. Bahan yang telah ditimbang kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer. Tambahkan aquadest hingga volume mencapai 100 ml. Kemudian memberi label pada botol stok

Mio-Innositol 10ml/l, untuk membuat 1 liter medium diperlukan 10 ml stok Mio-Innositol.

2. Pembuatan Media Perlakuan POC

Pembuatan media dilakukan dengan menggunakan campuran pupuk organik cair (POC) dan kulit pisang yang telah diekstrak. Media yang digunakan untuk masing-masing unit berisi 20 ml untuk 1 perlakuan yang terdiri dari 10 botol, sehingga dibutuhkan 200 ml untuk masing-masing perlakuan.

Media POC dibuat dengan memasukkan POC 0,6 ml/l kedalam tabung erlenmeyer yang telah berisi akuades 100 ml, kemudian diaduk sampai homogen. Setelah itu, menambahkan kulit pisang sesuai dengan perlakuan masing-masing yaitu kulit pisang bagian dalam konsentrasi 50 g/l pada erlenmeyer sebanyak 10 g dan konsentrasi 100 g/l sebanyak 20 g. Hal serupa dilakukan pada pembuatan media POC dengan perlakuan penambahan kulit pisang bagian luar dan perlakuan kulit pisang gabungan yaitu dengan konsentrasi 50 ml/l sebanyak 10 g dan konsentrasi 100 ml/l sebanyak 20 g. Pembuatan media POC dengan penambahan kulit pisang gabungan antara kulit dalam dan kulit luar konsentrasi 50 g/l yaitu masing-masing sebanyak 5 g. Sementara untuk konsentrasi 100 g/l yaitu dengan memasukkan kulit pisang masing-masing sebanyak 10 g. Selanjutnya menambahkan sukrosa sebanyak 6g/l, air kelapa sebanyak 30 ml dan ppm sebanyak 0,2ml/l ke dalam larutan media. Selanjutnya dilakukan pengukuran pH larutan media, jika pH media kurang dari 6 maka ditambahkan KOH dan jika lebih dari 6 maka ditambahkan HCl. Setelah semua bahan homogen, kemudian memasukkan pematat agar sebanyak 1,4 g, kemudian diaduk menggunakan

pengaduk sampai homogen. Kemudian menambahkan akuades hingga mencapai volume 200 ml. Larutan tersebut dipanaskan hingga mendidih kemudian dituangkan ke dalam botol kultur masing-masing sebanyak 20 ml dan ditutup dengan plastik kemudian diikat karet. Selanjutnya dilakukan sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121⁰C dengan tekanan 1 atm selama 120 menit. Setelah selesai media disimpan sementara di ruang inkubasi.

3. Pembuatan Media Perlakuan MS

Media dasar yang digunakan adalah media Murashige dan Skoog (MS). Media yang digunakan untuk 1 perlakuan yaitu 10 botol. Masing-masing botol berisi 20 ml, sehingga dibutuhkan 200 ml media perlakuan.

Pembuatan 200 ml media diperlukan bahan-bahan yaitu: larutan stok makro sebanyak 10 ml/l, stok mikro sebanyak 2 ml/l, stok vitamin sebanyak 2ml/l, stok myo-inositol sebanyak 2ml/l, sukrosa sebanyak 6g/l, agar sebanyak 1,4 g/l, dan ppm sebanyak 0,2ml/l. ZPT yang digunakan BAP dan NAA masing-masing sebanyak 2ppm/l dan 0,5 ppm/l.

Larutan stok diambil menggunakan syring yang telah disterilkan menggunakan alkohol 70%. Selanjutnya, larutan stok dimasukkan kedalam erlenmeyer kemudian ditambahkan akuades steril sebanyak 100 ml. Media kemudian dilakukan pengukuran pH menggunakan pH stik dengan pH 5,8-6. Apabila pH larutan media kurang dari 6 maka ditambahkan KOH dan jika lebih dari 6 maka ditambahkan HCl. Selanjutnya menambahkan agar dan dipanaskan sambil diaduk hingga larutan homogen dan mendidih diatas kompor. Kemudian menambahkan akuades hingga mencapai volume 200 ml. Setelah itu, larutan

dituangkan ke dalam botol kultur masing-masing sebanyak 20 ml dan ditutup dengan plastik kemudian diikat karet. Selanjutnya dilakukan sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121⁰C dengan tekanan 1 atm selama 120 menit. Setelah selesai media disimpan sementara di ruang inkubasi.

4. Persiapan Bahan Tanam

Bahan tanam yang digunakan untuk penelitian ini merupakan eksplan Krisan hasil kultur *in vitro* koleksi dari Laboratorium Kultur *in Vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta berupa planlet steril dan kemudian diperbanyak. Penelitian ini dilakukan subkultur dengan media POC yang dikombinasikan dengan air kelapa dan kulit pisang pada berbagai perlakuan.

5. Inokulasi Eksplan

Penanaman eksplan dilakukan di dalam LAF (*Laminar Air Flow*). Eksplan yang diinokultur adalah potongan batang satu buku tunggal tunas aksilar Krisan. Eksplan diambil secara aseptik dengan bantuan pinset steril dan diletakkan dalam petridis yang berisi larutan betadine, kemudian eksplan dipotong-potong menjadi 1 buku tunas. Eksplan yang telah dipotong selanjutnya dilakukan inokulasi, pada 1 botol berisi 1 eksplan tunas buku tunggal. Selanjutnya eksplan ditanam pada media kultur yang berisi media. Setelah itu botol ditutup menggunakan aluminium foil dan dilapisi kertas *wrap*, masing-masing botol diberi label sesuai perlakuan dan disimpan pada ruang inkubasi.

6. Inkubasi

Botol-botol yang telah ditanami eksplan diletakkan pada rak-rak kultur didalam ruang inkubasi dengan pengaturan suhu 20-25⁰C. Hal ini dilakukan untuk

mengetahui respon eksplan pada beberapa konsentrasi zat pengatur tumbuh terhadap terbentuknya selama 8 minggu.

7. Pengamatan

Pengamatan dilakukan selama 2 bulan dengan parameter yaitu: 1) Persentase eksplan hidup, 2) persentase kontaminasi, 3) persentase eksplan *browning*, 4) saat tumbuh tunas, 5) jumlah tunas, 6) saat tumbuh akar, 7) tinggi tanaman, 8) jumlah daun, 9) warna daun.

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 1 kali setiap minggu selama 2 bulan.

$$\text{Persentase eksplan hidup} = \frac{\sum \text{Eksplan hidup}}{\sum \text{Eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

2. Persentase Eksplan Kontaminasi (%)

Persentase kontaminasi diamati setiap minggu selama 2 bulan dengan cara melihat kondisi permukaan eksplan ataupun pada media. Penyebab kontaminasi yang diamati misalnya cendawan, bakteri, atau virus. Eksplan yang terkontaminasi ditandai dengan lebih dari 50% eksplan terkontaminasi.

$$\text{Persentase eksplan kontaminasi} = \frac{\sum \text{Eksplan kontaminasi}}{\sum \text{Eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

3. Persentase Eksplan *Browning* (%)

Eksplan dinyatakan *browning* jika eksplan mengalami kecoklatan atau kehitaman lebih dari 50%. Pengamatan dilakukan setiap minggu selama 2 bulan. Perhitungan persentase eksplan *browning* dilakukan pada akhir pengamatan.

$$\text{Persentase eksplan } browning = \frac{\sum \text{Eksplan } browning}{\sum \text{Eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

4. Waktu Tumbuh Tunas

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

5. Waktu Tumbuh Akar

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

6. Jumlah Tunas

Jumlah tunas yang terbentuk dihitung semua tunas yang terbentuk pada setiap botol kultur. Diamati setiap minggu selama 2 bulan.

7. Tinggi Tanaman

Pengamatan dilakukan dengan cara mengukur tinggi tanaman menggunakan penggaris mulai dari titik tumbuh tunas baru hingga ujung pucuk tanaman. Pengamatan tinggi tanaman dilakukan 1 kali setiap minggu selama 2 bulan.

8. Jumlah Daun

Pengamatan jumlah daun dilakukan dengan cara menghitung daun yang telah membuka penuh. Pengamatan dilakukan 1 kali setiap minggu selama 2 bulan.

9. Warna Daun

Parameter warna daun diamati dengan cara melihat warna daun dengan menggunakan color chart. Pengamatan dilakukan pada akhir pengamatan.

F. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam (*Analysis of Variance*) pada taraf kesalahan 5%. Jika hasilnya menunjukkan signifikansi pada tahap $\alpha = 0,05$ maka dilakukan pengujian lanjut dengan menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT).