III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai Juli 2011.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari bonggol yaitu dari tunas atau anakan pohon pisang Ambon Kuning yang didapat dari petani pisang di daerah Bernung, Kecamatan Gedong Tataan, Kabupaten Pesawaran, Lampung. Anakan pohon pisang yang digunakan memiliki 2—4 helai daun. Bagian yang diambil sebagai sumber eksplan adalah potongan bonggol yang mempunyai mata tunas.

Bahan-bahan yang digunakan untuk sterilisasi eksplan yaitu Dithane M-45 2 g/l, asam askorbat 150 mg/l, asam sitrat 50 mg/l, deterjen, Bayclin (5,25% NaOCl), Tween 20, aquadest, dan spirtus.

Formulasi media yang digunakan sebagai media dasar pada media prekondisi dan media perlakuan adalah formulasi media Murashige dan Skoog, 1962 (MS) (Tabel 1). Pada media prekondisi, ke dalam media ditambahkan zat pengatur tumbuh

(ZPT) jenis sitokinin yaitu *benzyladenine* (BA) pada konsentrasi 1 mg/l. Pada media perlakuan, media dasar ditambah dengan ZPT jenis sitokinin yaitu *benzyladenine* (BA) dan ZPT jenis auksin yaitu *indole-3-acetic acid* (IAA) masing-masing dalam tiga taraf. Sumber energi dalam media diperoleh dari sukrosa 30 g/l. Sebagai pematat media digunakan agar-agar 7 g/l. Sedangkan dalam pengaturan pH digunakan KOH 1N atau HCl 1N.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat untuk pembuatan media, sterilisasi eksplan, penanaman eksplan, dan perawatan eksplan. Alat yang digunakan untuk membuat media yaitu botol kultur, timbangan analitik, *beaker glass*, gelas ukur, spatula, labu ukur, pH meter, *hot plate*, *stirer*, pipet tetes, panci berlapis enamel, kompor gas, plastik, karet, kertas label dan autoklaf. Alat yang digunakan untuk sterilisasi eksplan dan penanaman eksplan adalah pisau, *beaker glass*, spatula, bak atau ember, *shaker*, *laminar air flow cabinet* (LAF), pembakar bunsen, gelas ukur, botol kultur, *petridish*, alat-alat diseksi (pinset dan pisau bedah), *hand sprayer*, dan alat tulis. Alat yang digunakan untuk perawatan eksplan meliputi rak kultur, *air conditioner* (AC) dan lampu *fluorescent* 1000-2000 lux.

3.3 Metode Percobaan

Penelitian ini dilakukan menggunakan rancangan teracak sempurna (RTS) dengan perlakuan disusun secara faktorial (3x3). Perlakuan yang digunakan adalah berbagai konsentrasi BA yaitu 2 mg/l, 4 mg/l dan 6 mg/l dikombinasikan dengan IAA dengan konsentrasi 0 mg/l, 0,5 mg/l dan 1 mg/l. Sembilan perlakuan tersebut ditambahkan ke dalam media dasar yang sama, yaitu formulasi media Murashige

dan Skoog, 1962 (MS) dan masing-masing perlakuan diulang tiga kali, setiap ulangan terdiri dari tiga botol dan setiap botol terdapat satu buah eksplan pisang Ambon Kuning.

Data hasil pengamatan dianalisis berdasarkan nilai tengah variabel pengamatan dengan menggunakan *standard error of the means* (SE). Adapun Rumus SE yang digunakan adalah sebagai berikut:

$$SE = \pm \sqrt{\frac{\sum Xi^2 - (\sum Xi)^2 / n}{n(n - 1)}}$$

Keterangan :

SE = *standard error of the means*

n = banyaknya pengamatan

Xi = nilai pengamatan ke-i

Dengan menggunakan software Exstat, homogenitas ragam antar perlakuan diuji dengan uji Bartlett dan aditivitas data diuji dengan uji Tukey. Jika data yang diuji homogen maka data tersebut disidik ragam dan diuji lanjut dengan uji beda nyata terkecil (BNT) pada taraf nyata 5%.

3.4 Teknik Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Sterilisasi alat

Alat-alat yang digunakan meliputi botol-botol kultur, alat-alat diseksi, dan alat-alat gelas dibersihkan dengan mencucinya terlebih dahulu dan dikeringkan.

Setelah alat-alat tersebut dicuci dan dikeringkan selanjutnya botol kultur ditutup dengan menggunakan plastik dan karet gelang sedangkan alat-alat diseksi dan alat-alat gelas dibungkus dengan menggunakan kertas dan plastik serta diikat dengan menggunakan karet gelang. Alat-alat tersebut kemudian disterilisasi

menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan $1,2\text{ kgf/cm}^2$ selama 30 menit.

3.4.2 *Media prekondisi dan media perlakuan*

Media prekondisi yang digunakan untuk media tanam awal eksplan adalah media Murashige dan Skoog, 1962 (MS) dengan penambahan $1\text{ mg/l benzyladenine}$ (BA). Pada media perlakuan, media dasar yang sama ditambah dengan BA pada konsentrasi 2 mg/l , 4 mg/l dan 6 mg/l dan dikombinasikan dengan IAA dengan konsentrasi 0 mg/l , $0,5\text{ mg/l}$ dan 1 mg/l . Media prekondisi dan media perlakuan diatur tingkat keasamannya menjadi 5,8 menggunakan pH meter dengan penambahan KOH 1N atau HCl 1N. Sebagai pematat media digunakan agar-agar 7 g/l . Media kemudian dididihkan dan dimasukkan ke dalam botol steril. Botol kemudian ditutup dengan plastik dan diikat dengan karet gelang. Botol-botol yang berisi media tersebut kemudian diautoklaf pada suhu 121°C dan tekanan $1,2\text{ kgf/cm}^2$ selama 15 menit.

3.4.3 *Eksplan dan sterilisasi eksplan*

Eksplan yang digunakan adalah bagian bonggol yang memiliki mata tunas dan dipotong dengan membentuk kubus ukuran $2,5\text{ cm} \times 2,5\text{ cm} \times 3\text{ cm}$. Mula-mula potongan eksplan direndam dalam larutan Dithane M-45 2 g/l , asam askorbat 150 mg/l dan asam sitrat 50 mg/l selama 30 menit. Larutan ini digunakan untuk sterilisasi awal, antioksidan dan mencegah pencoklatan. Setelah itu eksplan dibilas dengan air keran. Eksplan kemudian direndam kocok dalam larutan deterjen selama 15 menit dan dibilas sebanyak 3 kali dengan menggunakan air

keran untuk menghilangkan detergen dan Dithane M-45 yang masih menempel, kemudian diletakkan di dalam *laminar air flow cabinet* (LAFC).

Dalam *laminar air flow cabinet* (LAFC), eksplan disterilisasi dengan cara merendam kocok selama 30 menit dengan menggunakan *shaker* dalam larutan pemutih Bayclin 50% dan ditambah Tween 20 1—2 tetes. Setelah 30 menit eksplan dibilas dengan air steril sebanyak tiga kali. Eksplan tersebut kemudian dipotong dan dikecilkan menjadi ukuran 2 cm x 2 cm x 2,5 cm. Setelah dikecilkan eksplan direndam kocok kembali selama 20 menit dalam larutan pemutih Bayclin 30% dan ditambah Tween 20 1—2 tetes. Setelah 20 menit eksplan dibilas dengan air steril sebanyak tiga kali. Eksplan tersebut kemudian dipotong dan dikecilkan menjadi ukuran 1,5 cm x 1,5 cm x 2 cm. Setelah dikecilkan eksplan direndam kocok kembali selama 10 menit dalam larutan pemutih Bayclin 10% dan ditambah Tween 20 1—2 tetes. Setelah 10 menit eksplan dibilas dengan air steril sebanyak tiga kali dan siap ditanam pada media prekondisi.

3.4.4 *Inisiasi kultur dan subkultur*

Penanaman eksplan steril dan subkultur dilakukan dalam kondisi aseptik di ruang transfer di dalam *laminar air flow cabinet* (LAFC). Eksplan yang sudah ditanam pada media prekondisi selama 4 minggu dan dianggap steril dan tidak terkontaminasi oleh jamur maupun bakteri dapat dipindahkan ke dalam media perlakuan. Setelah 7 minggu berada di media perlakuan eksplan dicacah di bagian mata tunasnya untuk menekan terjadinya dominansi apikal dan ditanam kembali

di media baru dengan perlakuan sama. Subkultur ke media dengan perlakuan yang sama dilakukan setiap 4 minggu sekali.

3.4.5 *Pemeliharaan*

Eksplan yang sudah ditanam atau disubkultur, diletakkan di atas rak di dalam ruang kultur dengan penerangan lampu *fluorescent* berintensitas 1000—2000 lux sebagai sumber cahaya. Suhu di dalam ruang kultur diatur menjadi 24—26⁰ C selama 24 jam setiap hari dan terus menerus.

3.4.6 *Pengamatan*

Pertumbuhan dan perkembangan kultur diamati secara umum dimulai dari umur 11 minggu setelah tanam hingga berumur 23 minggu setelah tanam. Variabel pengamatan meliputi jumlah tunas per eksplan, jumlah propagul per eksplan, jumlah akar per eksplan, jumlah daun per eksplan, rata-rata tinggi tunas per eksplan, rata-rata panjang akar per eksplan dan penampakan visual kultur pisang Ambon Kuning.

1. Jumlah tunas per eksplan

Jumlah tunas per eksplan dihitung berdasarkan semua tunas yang terbentuk dari eksplan. Tunas adalah stuktur bermeristem yang memiliki ukuran lebih dari 0,5 cm.

2. Jumlah Propagul per eksplan

Jumlah propagul per eksplan dihitung berdasarkan semua tunas dan mata tunas yang terbentuk dari eksplan.

3. Jumlah akar per eksplan

Jumlah akar per eksplan dihitung berdasarkan semua akar yang terbentuk dari eksplan dan memiliki ukuran lebih dari 0,5 cm.

4. Jumlah daun per eksplan

Jumlah daun dihitung berdasarkan semua daun yang terbentuk dari eksplan dan sudah terbuka sempurna.

5. Rata-rata tinggi tunas per eksplan (cm)

Panjang tunas diukur dari pangkal tunas di atas permukaan eksplan sampai ujung daun terpanjang. Rata-rata panjang tunas diperoleh dengan menghitung rata-rata panjang tunas per eksplan.

6. Rata-rata panjang akar per eksplan (cm)

Panjang akar diukur dari pangkal akar sampai ujung akar. Rata-rata panjang akar diperoleh dengan menghitung rata-rata panjang akar per eksplan.

7. Penampakan visual kultur

Penampakan visual kultur ditunjukkan dengan melakukan pengamatan kultur pada setiap pengamatan menggunakan kamera Canon Ixus 60.