

III. BAHAN DAN METODE

Penelitian ini terdiri atas dua percobaan utama dan satu percobaan lanjutan, yaitu:

1. Pengaruh konsentrasi thidiazuron dengan dan tanpa benziladenin terhadap perbanyakan tunas pisang Kepok Kuning, dan Pengaruh TDZ 0,1 mg/l dan TDZ 0,1 mg/l + BA 2 mg/l terhadap Perkembangan nodul embrio somatik pisang Kepok Kuning.
2. Pengaruh konsentrasi thidiazuron dengan dan tanpa benziladenin terhadap perbanyakan embrio somatik pisang Raja Bulu.

3.1. Percobaan I. Pengaruh Konsentrasi Thidiazuron dengan dan tanpa Benziladenin terhadap Perbanyakan Tunas Pisang Kepok Kuning

3.1.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Tanaman, Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, Bandar Lampung. Penelitian ini dilaksanakan dari bulan November 2014 sampai Juni 2015.

3.1.2 Metode Penelitian

Perlakuan diterapkan pada satuan percobaan dalam rancangan acak lengkap (RAL) yang disusun secara faktorial 4x2. Faktor pertama adalah empat taraf konsentrasi TDZ, yaitu 0,005 mg/l, 0,01 mg/l, 0,05 mg/l, 0,1 mg/l. Faktor kedua

adalah 0 mg/l dan 2 mg/l BA. Delapan perlakuan tersebut ditambahkan ke dalam media dasar MS (Murashige and Skoog, 1962). Masing-masing perlakuan diulang lima kali. Setiap satuan percobaan terdiri dari lima botol kultur satu eksplan/botol. Homogenitas data diuji dengan uji Barlet. Apabila asumsi terpenuhi, selanjutnya akan dilakukan analisis ragam. Pemisahan nilai tengah dilakukan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) dengan taraf 5%.

Perlakuan yang diujikan dalam penelitian ini adalah konsentrasi TDZ dan kombinasi antara TDZ dan BA disajikan pada Tabel 1 sebagai berikut.

Tabel 1. Perlakuan yang diujikan pada penelitian.

No.	Media Dasar	TDZ (mg/l)	BA (mg/l)
1	Murashige dan Skoog (1962)	0.005	0
2		0.01	0
3		0.05	0
4		0.1	0
5		0.005	2
6		0.01	2
7		0.05	2
8		0.1	2

3.1.3 Pelaksanaan Penelitian

3.1.3.1 Sterilisasi Botol Kultur

Sterilisasi botol kultur adalah kegiatan awal yang dilakukan pada teknik kultur jaringan. Sterilisasi ini dilakukan dengan memasukkan botol kultur ke dalam autoklaf. Autoklaf yang digunakan adalah autoklaf elektrik. Cara pengoperasian autoklaf yaitu menambahkan air ke dalam autoklaf hingga batas tertentu. Setelah

itu kemudian menyusun botol kultur ke dalam autoklaf dengan menggunakan keranjang hingga penuh. Autoklaf ditutup dan tuas listrik dinaikkan. Waktu diatur selama 30 menit pada suhu 121°C dengan tekanan $1,2\text{ kg/cm}^2$. Setelah sterilisasi dengan autoklaf selesai, autoklaf dimatikan dan dibiarkan hingga tekanan turun menjadi 0 kg/cm^2 . Botol-botol dikeluarkan dari autoklaf dan dibersihkan dari media yang ada di dalam botol. Botol kemudian dicuci dengan menggunakan detergen dan desinfektan (5,25% NaOCl) sebanyak 50%, selanjutnya dibilas dan direndam dalam larutan detergen dan desinfektan (5,25% NaOCl) kembali selama satu hari. Keesokan harinya botol-botol dicuci kembali dan label yang ada pada botol di hilangkan. Setelah itu botol-botol dibilas hingga bersih dan ditutup dengan plastik dan karet kemudian diautoklaf dengan autoklaf Tommy selama 30 menit, suhu 121°C dan tekanan $1,2\text{ kg/cm}^2$.

3.1.3.2 Media Kultur

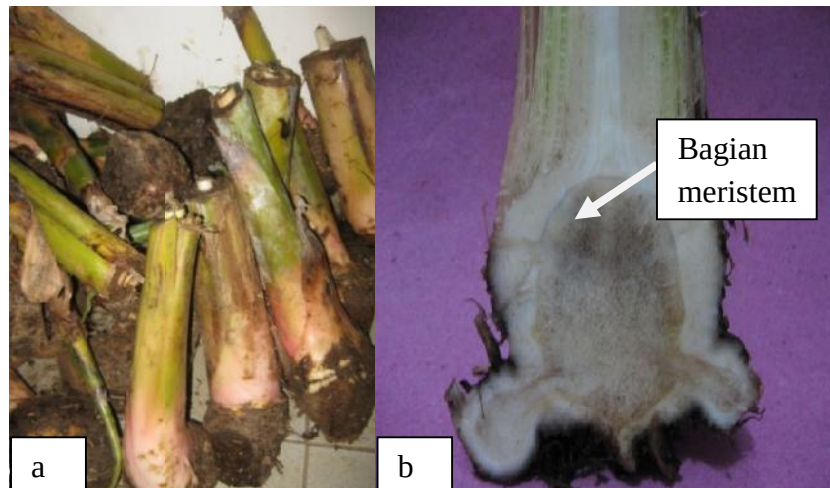
Penelitian ini menggunakan media dasar MS (Murashige and Skoog, 1962). Terdapat 2 macam media yang digunakan yaitu media prekondisi dan media perlakuan. Media prekondisi berisi garam-garam MS; 2 mg/l BA; 0,005 mg/l TDZ; 50 mg/l asam sitrat; dan 150 mg/l asam askorbat. Media perlakuan yang digunakan adalah media prekondisi dengan dan tanpa 2 mg/l BA serta penambahan berbagai konsentrasi TDZ sesuai dengan perlakuan.

Pembuatan media dilakukan dengan melarutkan garam-garam MS; 2 mg/l BA; 0,005 mg/l TDZ; 50 mg/l asam sitrat; dan 150 mg/l asam askorbat; serta 30 g/l sukrosa hingga homogen. Larutan yang telah homogen kemudian ditera dengan menambahkan aquades menggunakan labu ukur 1 L. Setelah ditera, pH larutan

diukur dengan menggunakan pH meter dan ditetapkan menjadi 5,8. Penetapan pH dilakukan dengan cara menambahkan larutan KOH 1 N jika pH larutan kurang dari 5,8 dan larutan HCl 1 N jika pH larutan lebih dari 5,8. Larutan yang telah di pH dimasak dengan 8 g/l agar-agar hingga mendidih. Sebanyak 20 -25 ml media dituangkan dalam botol berukuran 250 ml kemudian ditutup dengan plastik dan diikat dengan karet serta diberi label sesuai komposisi media. Media tersebut kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C pada tekanan 1,2 kg/cm² selama 7 menit. Setelah sterilisasi selesai dan tekanan autoklaf turun menjadi 0 kg/cm², media dikeluarkan dan disimpan dalam ruang kultur.

3.1.3.3 Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan pada penelitian ini berupa eksplan tunas apikal yang berasal dari meristem bonggol tanaman pisang. Kultivar yang digunakan adalah pisang “Kepok Kuning”. Bonggol pisang didapatkan dari Gedong Tataan, Kabupaten Pesawaran, Lampung Selatan. Bonggol pisang yang digunakan berupa anakan pisang dengan diameter 10-20 cm. Bonggol anakan pisang diambil dengan menggunakan sabit dan cangkul yang kemudian dibawa ke lahan sekitar Laboratorium Kultur Jaringan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.



Gambar 2. Bahan eksplan pisang Kepok Kuning yang digunakan (a) bonggol pisang (umur ± 5 bulan) sebagai sumber eksplan dan (b) bagian meristem yang diambil.

3.1.3.4 Persiapan Eksplan

Eksplan pisang yang telah berada di lahan sekitar laboratorium dipersiapkan.

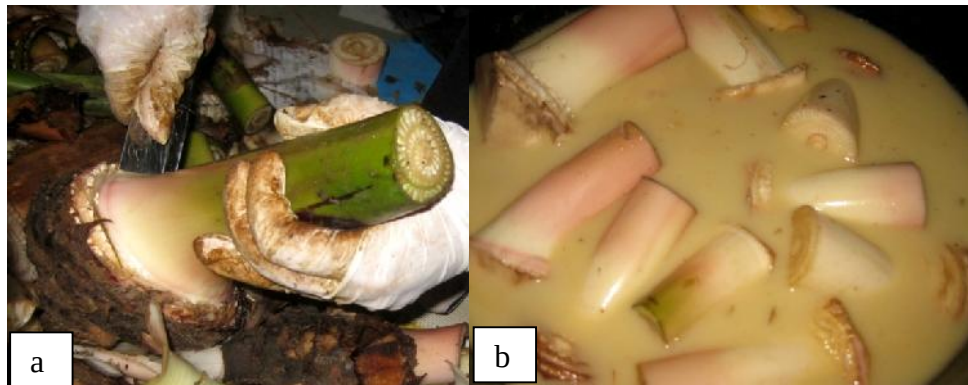
Batang semu dibuang beberapa lapis dengan menggunakan pisau hingga 2 lapis tersisa. Bonggol yang ada diambil dengan cara menyudutkan pisau dengan

kemiringan 45° (berbentuk segi 5 dengan ujung runcing) hingga didapatkan

eksplan berupa 15-20 cm batang semu dengan mata tunas dan jaringan meristematik bonggol. Eksplan tersebut kemudian direndam dalam larutan

fungisida berbahan aktif Mankozeb 2 g/l dan 150 mg/l asam askorbat selama ± 30 menit. Eksplan selanjutnya dibawa ke dalam laboratorium untuk sterilisasi

permukaan eksplan.



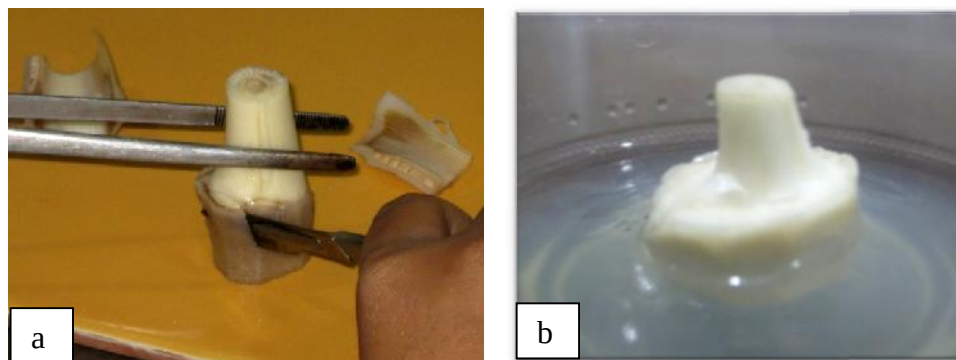
Gambar 3. Proses pengambilan eksplan pisang Kepok Kuning (a) pembentukan sudut 45^0 dan (b) proses perendaman dengan larutan fungisida.

3.1.3.5 Sterilisasi dan Penanaman Eksplan

Sebelum sterilisasi permukaan, eksplan dikecilkan kembali hingga ukuran 7-10 cm. Eksplan kemudian dicuci dengan detergen dan dibilas di air mengalir. Setelah dicuci eksplan dimasukkan dalam botol *shot* hingga sebanyak 10 eksplan. Eksplan kemudian disterilkan dengan larutan desinfektan yang mengandung 5,25% NaOCl berkonsentrasi 50% yang ditambah *Tween-20* sebanyak 5 tetes, kemudian dikocok selama 30 menit. Setelah itu kemudian dibilas dengan air steril sebanyak 3 kali di dalam *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC). Eksplan yang telah bersih dikecilkan kembali hingga berukuran 1,5 x 1,5 x 1 cm.

Eksplan yang telah berukuran kecil direndam dalam larutan asam askorbat berkonsentrasi 150 mg/l selama 15 menit. Eksplan kemudian disterilisasi kembali dengan desinfektan (5,25% NaOCl) berkonsentrasi 15% tanpa *Tween-20* selama 10 menit dengan menggunakan vakum, kemudian dibilas sebanyak 3 kali atau lebih hingga bersih. Sterilisasi tersebut kemudian diulang kembali dan dibilas

hingga bersih. Eksplan yang sudah bersih kemudian ditanam dalam media prekondisi. Satu botol media prekondisi berisi satu eksplan. Setelah eksplan ditanam dalam media kemudian diberi label nama dan tanggal penanaman.



Gambar 4. Proses penanaman eksplan pisang Kepok Kuning (a) pengecilan eksplan dan (b) penanaman ke media prekondisi.

3.1.3.5 Pengamatan

Pengamatan eksplan dilakukan sejak munculnya tunas aksilar. Adapun variabel pengamatan pada penelitian ini adalah:

1. Rata-rata jumlah mata tunas aksilar. Mata tunas aksilar adalah tunas yang tumbuh dari setiap ketiak bonggol eksplan dengan ukuran $< 0,5$ cm.
2. Rata-rata jumlah tunas aksilar. Tunas aksilar adalah tunas yang tumbuh dari setiap ketiak bonggol eksplan dengan ukuran $\geq 0,5$ cm.
3. Jumlah propagul per eksplan. Propagul adalah jumlah dari mata tunas dan tunas aksilar.
4. Penampilan visual eksplan. Penampilan visual eksplan di dalam kultur diamati pada saat 0, 4, 8, dan 10 MSP. Variabel pengamatan ini digunakan sebagai penunjang hasil pengamatan variabel lainnya.

3.2 Percobaan Lanjutan: Pengaruh TDZ 0,1 mg/l dan TDZ 0,1 mg/l + BA 2 mg/l terhadap Perkembangan Nodul Embrio Somatik Pisang Kepok Kuning

Percobaan menggunakan bahan tanam berupa nodul embrio somatik yang terdapat pada meristem pisang Kepok Kuning. Tujuan percobaan ini adalah untuk melihat perkembangan nodul embrio somatik pada media kultur yang ditambahkan dengan TDZ 0,1 mg/l maupun kombinasi TDZ 0,1 mg/l dan BA 2 mg/l. Nodul embrio somatik yang terdapat pada meristem pisang Kepok Kuning kemudian di potong dan ditanam pada media kultur yang baru dengan kandungan ZPT yang sama. Nodul embrio somatik yang telah dipotong kemudian diinkubasi dan diamati perkembangannya.

3.3 Percobaan II. Pengaruh Konsentrasi Thidiazuron dengan dan tanpa Benziladenin terhadap Perbanyakan Embrio Somatik Pisang Raja Bulu

3.3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Tanaman, Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, Bandar Lampung. Penelitian ini dilaksanakan dari bulan April sampai Juni 2015.

3.3.2 Metode Penelitian

Perlakuan diterapkan pada satuan percobaan dalam rancangan acak lengkap (RAL) yang disusun secara faktorial 4x2. Faktor pertama adalah empat taraf konsentrasi TDZ, yaitu 0,005 mg/l, 0,01 mg/l, 0,05 mg/l, 0,1 mg/l. Faktor kedua adalah 0 mg/l dan 2 mg/l BA. Delapan perlakuan tersebut ditambahkan ke dalam

media dasar MS (Murashige dan Skoog pada tahun 1962). Masing-masing perlakuan diulang enam kali. Setiap satuan percobaan terdiri dari enam botol kultur. Homogenitas data diuji dengan uji Barlet. Apabila asumsi terpenuhi, selanjutnya akan dilakukan analisis ragam. Pemisahan nilai tengah dilakukan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) dengan taraf 5%.

Perlakuan yang dicobakan dalam penelitian ini adalah konsentrasi TDZ dan kombinasi antara TDZ dan BA disajikan pada Tabel 1.

3.3.3 *Bahan Tanam*

Bahan tanam yang digunakan pada penelitian ini berupa eksplan meristem nodul (nodul embrio somatik) yang bersal dari kultur *in vitro* pisang Raja Bulu (genom AAB). Kultur *in vitro* tersebut didapatkan dari hasil penelitian Triayani (2014).



Gambar 5. Eksplan embrio somatik pisang Raja Bulu yang digunakan sebagai bahan tanam pada percobaan II.

3.3.4 *Penanaman eksplan*

Eksplan yang berupa kumpulan nodul embrio diseragamkan ukurannya dengan dipotong menjadi beberapa *clump* sebesar 0,5 cm. Setiap *clump* memiliki jumlah

nodul yang berbeda. *Clump* kemudian dimasukkan kedalam media perlakuan satu botol berisi satu *clump* berukuran 0,5 cm.



Gambar 6. Proses penanaman eksplan pisang Raja Bulu yaitu (a) pemotongan, (b) penyeragaman ukuran, dan (c) penanaman.

3.3.5 Pengamatan

Pengamatan eksplan dilakukan sejak bertambahnya nodul embrio. Adapun variabel pengamatan pada penelitian ini adalah:

1. Rata-rata jumlah propagul. Propagul adalah jumlah nodul embrio dan tunas.
Embrio nodul adalah setiap butir bulatan yang masih berwarna putih.
2. Penampilan visual eksplan. Penampilan visual eksplan di dalam kultur diamati pada saat 0, 4, dan 8 MST. Variabel pengamatan ini digunakan sebagai penunjang hasil pengamatan variabel lainnya.