

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimen. Penelitian eksperimen adalah metode penelitian yang dilakukan dengan memanipulasi objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 2003).

B. Desain Penelitian

Desain penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan acak lengkap dapat didefinisikan sebagai rancangan dengan beberapa perlakuan yang disusun secara random untuk seluruh unit percobaan. Desain ini digunakan karena percobaan dilakukan di laboratorium dan kondisi lingkungan dapat dikontrol (Nazir, 2003). Perlakuan yang diberikan adalah NaCl, dengan konsentrasi 0 mM (kontrol), 50 mM, 100 mM, dan 150 mM. Dari taraf perlakuan yang diamati, terdapat 4 perlakuan dengan 6 pengulangan sehingga terdapat 24 sampel pucuk yang diamati. Penentuan banyaknya jumlah pengulangan dalam penelitian ini menurut Gomez & Gomez (1995).

C. Subjek

Subjek dalam penelitian ini adalah plantlet tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.) varietas Granola yang ditanam pada medium MS 0 yang berasal dari Balai Besar Pelatihan Pertanian (BBPP) Lembang yang kemudian dilakukan proses sub-kultur di Laboratorium Kultur Botani untuk memperbanyak jumlah plantlet. Pemeliharaan dilakukan sampai umur kultur berumur empat minggu.

D. Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi pembuatan medium, sterilisasi alat dan medium, penanaman eksplan, serta pemeliharaan kultur dilakukan di Laboratorium Kultur Botani dan pembuatan

larutan stok MS serta pengujian kandungan kadar klorofil dilakukan di Laboratorium Fisiologi FPMIPA UPI. Penelitian dilaksanakan dari bulan Maret sampai September 2014.

E. Prosedur Penelitian

1. Persiapan

a. Persiapan bahan

Bahan eksplan kentang adalah plantlet kentang varietas Granola yang ditanam pada medium MS 0 yang diperoleh dari Balai Besar Pelatihan Pertanian (BBPP) Lembang.

b. Pembuatan larutan stok untuk sub-kultur plantlet

Larutan stok terdiri dari makronutrien, mikronutrien dan vitamin yang dibuat dengan menimbang bahan sesuai Tabel 3.1, kemudian dilarutkan dengan menggunakan aquades. Larutan stok medium MS dikelompokkan menjadi 8 kelompok (Tabel 3.1).

c. Pembuatan medium

Medium yang digunakan adalah medium Murashige dan Skoog (MS) (1962 dalam Pierik, 1987). Pembuatan medium MS digunakan untuk medium sub-kultur dan medium pada tahap inti. Untuk proses tahap inti, medium dibuat untuk 4 perlakuan dengan 6 kali pengulangan (20 ml per botol). Untuk membuat medium sub-kultur dan tahap inti, masing-masing larutan stok diambil sesuai dengan kebutuhan pemakaian. Larutan yang telah tercampur kemudian ditambah dengan sukrosa dan agar. Larutan kemudian diencerkan dengan menggunakan aquades. Selanjutnya memanaskan medium dan diaduk sampai semua bahan larut (Lampiran 2 Gambar 1). Setelah larut, medium dituangkan ke dalam botol sebanyak 20 ml pada masing-masing botol. Botol ditutup dengan menggunakan plastik tahan panas dan karet kemudian botol diberi label dan ditulis tanggal

penanaman. Medium yang telah dibuat dan alat-alat untuk menanam disterilkan dalam autoklaf selama \pm 45 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 Psi.

Tabel 3.1 Komposisi Medium Murashige-Skoog (1962 dalam Pierik, 1987)

Stok	Bahan Kimia	Konsentrasi (g/L)
A.	NH ₄ NO ₃	16,5
B.	KNO ₃	19
C.	CaCl ₂ .H ₂ O	3,33
D.	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,00025
	H ₃ BO ₃	0,062
	KI	0,008
	NaMoO ₄ .2 H ₂ O	0,0025
	KH ₂ PO ₄	17
E.	MgSO ₄ .7H ₂ O	3,7
	MnSO ₄ .4H ₂ O	0,169
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,086
	CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,00025
F.	Na.EDTA	0,373
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,278
G.	Thiamin	0,001
	Nikotin	0,005
	Pyridoxin	0,005
	Glycin	0,02
H.	Inositol	1

d. Perbanyakkan planlet kentang

Perbanyakkan atau subkultur plantlet kentang dilakukan karena dibutuhkan banyak eksplan yang seragam untuk tahap inti dan juga agar umur tanaman yang akan digunakan pada penelitian inti seragam. Umur kultur yang digunakan untuk tahap inti adalah kultur yang sudah berumur empat minggu.



Gambar 3.1 Plantlet Kentang Hasil Subkultur
(Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2014.)

2. Penelitian Inti

a. Pembuatan medium perlakuan

Medium perlakuan yaitu medium MS 0 yang ditambah NaCl dengan berbagai konsentrasi yang berbeda. Perlakuan adalah dengan penambahan 0 mM, 50 mM, 100 mM, dan 150 mM NaCl. MS 0 tanpa penambahan NaCl merupakan medium kontrol atau medium NaCl konsentrasi 0 mM. Medium yang telah tersedia kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada tekanan selama \pm 45 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 Psi. Setelah disterilisasi kemudian medium yang telah dibuat didiamkan di dalam ruang kultur selama tiga hari sebelum ditanami dengan eksplan kentang secara aseptik.

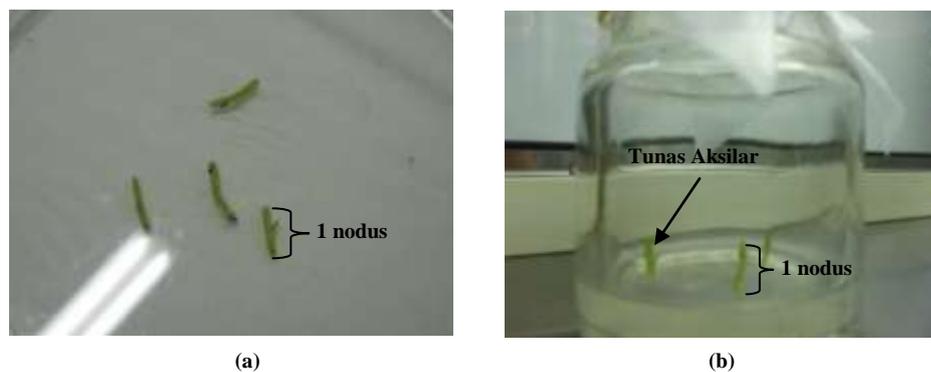
b. Penanaman

Sebelum eksplan ditanam pada medium kultur, semua bahan yang akan digunakan pada proses penanaman disiapkan terlebih dahulu, diantaranya medium, eksplan, alkohol, spirtus, pinset, *scalpel*, *steril blade*, cawan petri dan plastik tahan panas yang sebelumnya telah disterilisasi. Bahan yang telah disiapkan kemudian dimasukkan ke dalam *laminar air flow* dan disinari dengan ultra violet selama kurang lebih 30 menit (Lampiran 2 Gambar 2). Eksplan yang digunakan adalah pucuk dari plantlet hasil subkultur yang sudah berumur empat minggu. Eksplan pucuk yang ditanam pada medium perlakuan berjumlah 6 dalam tiap botol kultur yang masing-masing eksplan dengan 1 jumlah nodus (Gambar 3.2). kemudian di simpan di ruang kultur yang steril (Lampiran 2 Gambar 3)

c. Pengamatan

Pengamatan pertumbuhan dilakukan seminggu sekali selama empat minggu untuk melihat pengaruh cekaman salinitas terhadap parameter pertumbuhan tanaman kentang secara morfologi yaitu pengaruhnya

terhadap multiplikasi pucuk, tinggi pucuk, dan pertambahan jumlah nodus tanaman kentang. Pengamatan untuk multiplikasi pucuk, tinggi pucuk dan pertambahan jumlah nodus dilakukan pengamatan pada tunas yang tumbuh pada tunas aksilar eksplan yang telah ditanam (Gambar 3.2).



Gambar 3.2 Eksplan Pucuk yang ditanam pada Medium
(a) Potongan eksplan pucuk, (b) Eksplan pucuk yang ditanam pada medium.

(Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2014.)

d. Pemanenan

Pemanenan dilakukan setelah kultur berumur empat minggu. Pengukuran multiplikasi pucuk, tinggi tanaman dan pertambahan jumlah nodus dilakukan kemudian dibandingkan pada setiap perlakuan. Pengujian kadar klorofil dilakukan untuk melihat pengaruh pemberian cekaman salinitas yang berbeda pada kadar klorofil tanaman kentang yang ditanam pada media tanam bergaram

e. Pengujian kadar klorofil

Penentuan kadar klorofil berdasarkan metode Arnon (1949). Sampel daun diambil kemudian dipotong-potong kecil. Potongan daun tersebut kemudian ditimbang sampai berat mencapai 0,5 gram. Sampel daun kemudian digerus dengan menggunakan mortar, kemudian potongan daun yang telah digerus dilarutkan dengan menggunakan aseton 80% sebanyak 10 ml. ekstrak kemudian disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 1000 rpm. Fase cairnya diambil kemudian dipindahkan ke dalam kuvet

spektrofotometer. pengukuran nilai absorbansi hasil ekstrak tersebut dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 663 nm dan panjang gelombang 645 nm (Gambar 3.3).



Gambar 3.3 Pengujian Kadar Klorofil dengan Spektrofotometer
(Dokumentasi Pribadi, 2014)

Untuk mengetahui kadar klorofil, dihitung dengan menggunakan koefisien absorpsi spesifik yang telah ditentukan oleh Mckinney (1941) sebagai berikut:

$$\text{Klorofil a} = 12,7 A_{663} - 2,69 A_{645}$$

$$\text{Klorofil b} = 22,9 A_{645} - 4,68 A_{663}$$

$$\text{Klorofil total} = 20,2 A_{645} + 8,02 A_{663}$$

Keterangan :

A_{663} = Absorban pada panjang gelombang 663 nm,

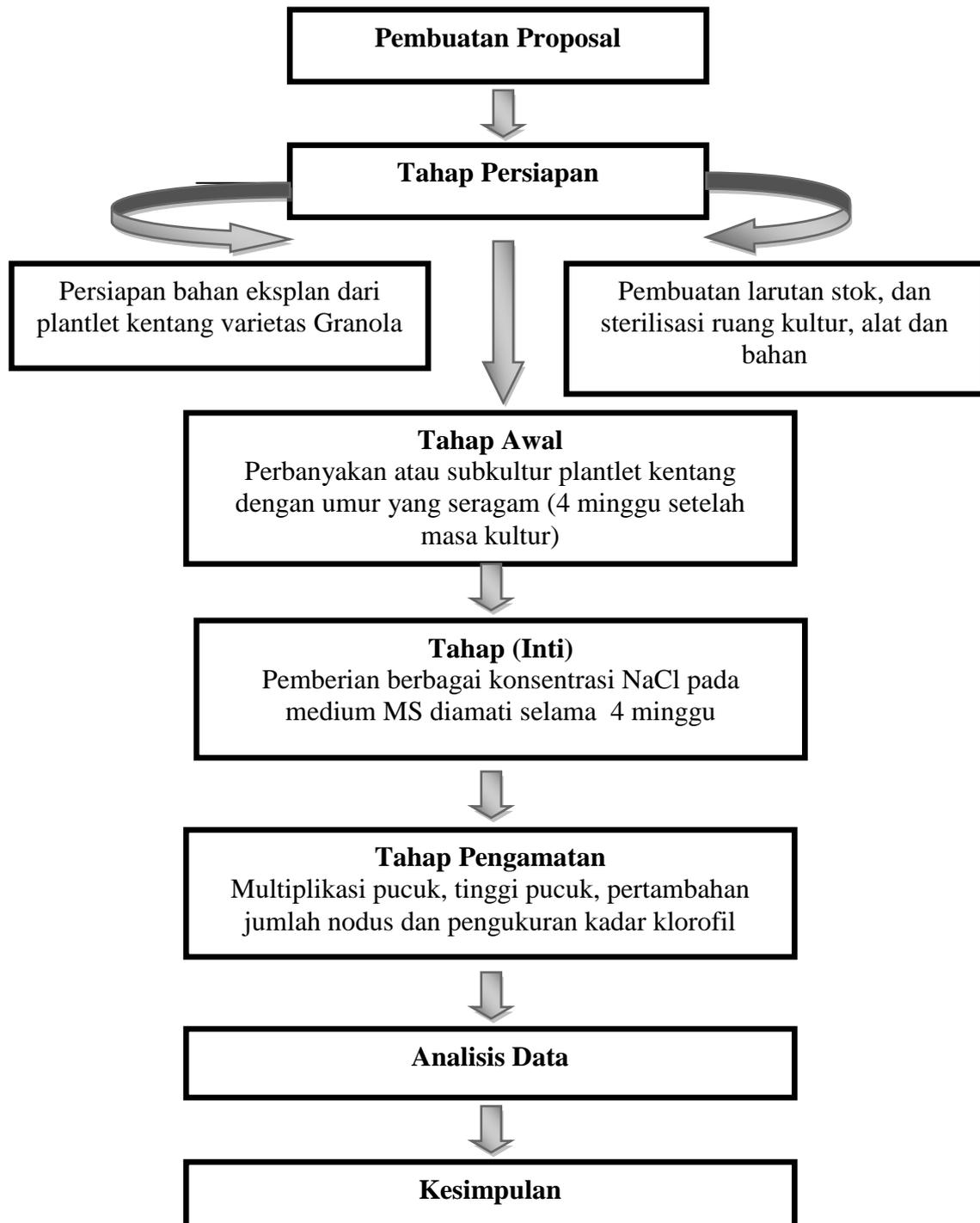
A_{645} = Absorban pada panjang gelombang 645 nm,

F. Analisis Data

Data dianalisis dengan uji statistik. Langkah pertama yang dilakukan adalah analisis prasyarat yang meliputi dua uji, yaitu uji Normalitas dan uji Homogenitas. Uji normalitas data menggunakan uji Kolmogrov-Smirnov yang bertujuan untuk

mengetahui apakah data berdistribusi normal atau tidak sehingga data dapat digunakan dalam statistik parametrik. sedangkan uji homogenitas menggunakan uji Lavene yaitu uji yang dilakukan untuk menentukan apakah sampel berasal dari varians yang homogen atau tidak. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa data tersebut variansinya homogen dan terdistribusi secara normal maka dilakukan uji F Parametrik yaitu dengan ANOVA untuk menguji kesamaan beberapa rata-rata secara sekaligus pada taraf signifikansi 95% menggunakan program SPSS 18. Hasil yang menunjukkan bahwa pada uji ANOVA H_0 ditolak (berbeda signifikan) maka dilakukan pengujian lebih lanjut untuk melihat adanya perbedaan pengaruh pemberian perlakuan terhadap parameter yang diuji yaitu multiplikasi pucuk, tinggi pucuk, pertambahan jumlah nodus dan kadar klorofil plantlet kentang dengan menggunakan uji jarak berganda Duncan (*Duncan Multiple Range Test*) yang dilakukan untuk mengetahui perlakuan yang berpengaruh paling baik terhadap variabel yang diukur. Semua perhitungan statistik uji ANOVA dan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* untuk semua pengujian parameter terdapat pada lampiran 3.

G. Alur Penelitian



Gambar 3.4 Bagan Alur Penelitian