

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan bulan September 2013 hingga Maret 2014 di laboratorium pemuliaan tanaman dan *screen house* Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika yang berada di Kecamatan Junrejo, Desa Tlekung, Batu, Jawa Timur. Ketinggian tempat ± 950 mdpl, suhu berkisar antara 18 - 29° C.

3.2. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah antara lain adalah labu ukur, gelas ukur, elenmeyer, cawan petri, batang pengaduk, botol kultur, alat-alat diseksi (scalpel dan pinset), *Laminair Air Flow Cabinet* (LAF), timbangan analitik, pipet, alat sterilisasi (autoklaf, lampu spiritus, dan penyemprot alkohol (*hand sprayer*)), pH meter, lemari pendingin, rak kultur, alat pemotret, thermometer, lampu flouresence, kertas label, plastik, karet, kertas tissue, korek, aluminium foil, gunting, beaker glass, *colour chart* RHS (*Royal Horticulture Society*), dan alat tulis. Bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi benih stroberi hasil persilangan yang diperoleh dari kegiatan persilangan sebelumnya. Tanaman tetua stroberi *California*, dan *Holybride*, 109 tanaman F1 yang berasal dari benih hasil persilangan yang terdiri dari 75 tanaman dari hasil persilangan stroberi varietas ♀ *California*/C dengan stroberi varietas ♂ *Holybride*/H, 34 tanaman hasil dari persilangan ♀ *Holybride* dengan ♂ *California*, tetua *California* dan tetua *Holybride*. Larutan stok larutan MS (larutan stok makronutrien dan mikronutrien, aquades, agar, larutan stok organik yaitu sukrosa, vitamin, asam amino), alkohol 70%, dan spiritus.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode *single plant*, artinya pengamatan dilakukan pada seluruh tanaman. Tanaman ditanam dilapang tanpa rancangan. Pengamatan, terhadap 109 tanaman hasil persilangan dan tetua dilakukan pada sifat warna daun, jumlah daun, lebar daun, bentuk daun, warna batang, gerigi daun, jumlah stolon, warna stolon, tinggi tanaman dan ketebalan daun.

Persilangan Stroberi
P : C x H
P : H x C

±1 bulan

Panen biji

4 hari

Penanaman benih
stroberi F1 hasil
persilangan di media
in vitro

4 bulan

Aklimatisasi

1 bulan

Pindah Lapang

1 bulan

Analisis Morfologi
Tanaman

Gambar 1. Diagram Alur Penelitian

3.4. Pelaksanaan Penelitian

Kegiatan yang dilakukan dalam penelitian yaitu :

3.4.1. Teknik Persilangan

Persilangan stroberi menggunakan tetua varietas *California* dan varietas *Holybride* yang dilakukan secara *resiprok*. Pelaksanaan persilangan diawali dengan memilih bunga primer dan sekunder sebagai tetua betina yang masih kuncup (belum mekar), bunga tersebut kemudian dibuang tangkai benang sarinya (emaskulasi) menggunakan pinset yang disterilkan dengan alcohol. Bunga yang

telah di emaskulasi selanjutnya diolesi dengan serbuk sari (varietas lain) sampai merata ke kepala putik tetua betina, kemudian disungkup dengan plastik.

3.4.2. Pembuatan media kultur jaringan stroberi

Pembuatan media pada kultur *in vitro* dilakukan dengan mengambil masing-masing larutan:

- a). Larutan stok Fe 10 ml/l, larutan stok makro 50 ml/l, larutan stok mikro 10 ml/l, larutan stok vitamin 1 ml/l, larutan *sukrosa* 25 g/l, dan *Myo-inositol* 250 mg/l, dicampur menjadi satu dalam *beaker glass*, aquades ditambahkan sampai volume 1000 ml, kemudian bahan-bahan tersebut diaduk sampai homogen.
- b). Media diukur pHnya dengan menggunakan pH meter yang sudah dinetralkan, jika pH kurang dari 5,8 ditambah NaOH tetapi jika pH lebih dari 5,8 maka ditambahkan HCl. Tahap berikutnya adalah dengan menambah agar dalam *beaker glass* (dimana konsentrasi agar 9 gr tiap 1000 ml), setelah itu *beaker glass* dipanaskan diatas kompor sambil diaduk dengan spatula sampai mendidih hingga agarnya larut semua.
- c). Menuangkan larutan tersebut dalam botol kultur \pm 15 ml per botol. Botol di tutup dengan plastik dan diikat, setelah itu masukkan dalam autoclaf dengan suhu 121°C, tekanan 15 psi, selama 15 menit.

3.4.3. Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas dan cawan petri dicuci dengan detergen pada air mengalir, ditiriskan dan ditutup plastik, kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada temperature 121 °C, tekanan 15 psi selama 15-20 menit. Alat *scalpel* dan pinset disterilkan ditempat sterilikator setelah dicuci menggunakan detergen.

3.4.4. Sterilisasi Ruang Tanam

Sterilisasi *Laminair Air Flow* (LAF) dilakukan pada bagian meja dan dinding dengan alkohol 70%. Bahan dan alat yang digunakan untuk sterilisasi eksplan dimasukkan ke dalam LAF, kemudian alat UV dihidupkan \pm selama 1 jam. Bahan dan alat yang akan digunakan setelah UV dimatikan, harus disemprot alkohol terlebih dahulu. Blower dinyalakan selama 20 menit terlebih dahulu kemudian UV dimatikan. Blower dinyalakan, untuk membantu menghindari kontaminasi pada saat menanam eksplant.

3.4.5. Persiapan dan Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan benih dilakukan dua tahap, yaitu saat di luar dan di dalam LAFC. Sterilisasi di luar LAFC, buah stroberi dibersihkan menggunakan sikat dan sabun, bilas hingga bersih pada air mengalir. Biji diambil menggunakan pinset steril, dan dipisahkan dari daging buahnya, biji dibilas menggunakan aquades sebanyak 3 kali.

Sterilisasi di dalam LAFC dilakukan setelah sterilisasi tahap I, Biji hasil sterilisasi tahap I diberi clorox murni (tanpa pengenceran), dan langsung dipisahkan benih dari air clorox murni tanpa direndam. Biji direndam dengan clorox 5% selama 5 menit, dan dibilas dengan aquades steril selama 5 menit diulang sebanyak 3 kali.

3.4.6. Penanaman dan Pemeliharaan Eksplan

Eksplan yang telah steril ditanam pada media sebanyak 20 biji stroberi tiap botol. Eksplan yang telah ditanam dalam botol kultur diletakkan di ruangan kultur yang diberi penyinaran dengan lampu fluorescent 36 Watt dengan intensitas 1.000 Lux. Eksplan diinkubasi dalam ruang kultur pada suhu 24° C dan kelembaban ruang 86%.

3.4.7. Aklimatisasi Tanaman

Kegiatan aklimatisasi dilakukan setelah tanaman berumur 12 minggu di media kultur. *Plantlet* dikeluarkan dalam botol, dicuci dengan deterjen secara perlahan, kemudian direndam dengan air yang dicampur fungisida selama 1 jam. Media yang digunakan untuk aklimatisasi berupa campuran pasir dan arang sekam dengan perbandingan 1 : 1 yang dimasukkan pada polibag kecil. Tanaman diletakkan dirak yang berada didalam *screen house* dan disungkup dengan plastik selama 5 minggu.

3.4.8. Penanaman

Penanaman dilakukan setelah berumur 5 minggu diaklimatisasi. Tanaman ditanam pada media sekam, pupuk kandang dan tanah dengan perbandingan 1 : 2 : 3 pada polibag berukuran 25 x 25 cm. Tanaman diletakan dilapang, suhu lapang berkisar antara 18 - 29° C dan kelembapan antara 64 - 96%.

3.4.9. Perawatan Tanaman

1). Penyiangan

Penyiangan gulma dilakukan ketika ada gulma yang tumbuh di polibag, biasanya dilakukan 1 minggu sekali. Penyiangan gulma berfungsi meminimalisir kompetisi menyerap nutrisi, air, cahaya dan ruang tumbuh antara tanaman stroberi dengan gulma.

2). Penyiraman

Penyiraman dilakukan secara kondisional, artinya melihat kondisi lapang apabila tidak terjadi hujan selama seminggu penyiraman dilakukan 2 hari sekali dengan menggunakan gembor.

3). Pemupukan

Pemupukan dilakukan 1 minggu sekali. Pupuk yang digunakan adalah NPK dan pupuk daun dengan dosis 2 g/l dan 2 ml/l.

4). Pengendalian Hama dan Penyakit

Pengendalian hama dan penyakit dilakukan ketika ada serangan hama dan penyakit. Jenis pestisida yang digunakan adalah insektisida dan fungisida.

3.5 Pengamatan

3.5.1 Pengamatan pada Kultur *In Vitro*:

a. Persentase perkecambahan benih yang diamati adalah jumlah benih berkecambah. Pengamatan dilakukan 4 MST. Rumus perhitungan:

$$\% \text{ perkecambahan} = \frac{\text{jumlah benih berkecambah}}{\text{jumlah benih total}} \times 100 \%$$

b. Persentase tanaman hidup dari hasil aklimatisasi. Pengamatan dilakukan 4 minggu setelah aklimatisasi. Rumus perhitungan:

$$\% \text{ tanaman hidup} = \frac{\text{jumlah tanaman hidup}}{\text{jumlah total tanaman}} \times 100 \%$$

3.5.2 Pengamatan Morfologi Tanaman

Pengamatan morfologi dilakukan 1 kali pengamatan pada saat tanaman berumur 4 minggu setelah pindah lapang, karakter kualitatif dan kuantitatif yang diamati meliputi :

a. Karakter kuantitatif :

- 1) Jumlah daun, pengamatan jumlah daun dilakukan dengan menghitung daun yang telah membuka sempurna.
- 2) Lebar daun, pengamatan lebar daun dilakukan dengan menggunakan penggaris, diukur dari ujung daun sampai ujung daun.
- 3) Tinggi tanaman, pengamatan tinggi tanaman dilakukan dengan mengukur dari titik tumbuh hingga daun tertinggi.
- 4) Jumlah stolon, pengamatan jumlah stolon dilakukan dengan menghitung jumlah stolon yang muncul.

b. Karakter kualitatif :

- 1) Warna daun, pengamatan warna daun dilakukan dengan menggunakan *color chart*.
- 2) Warna batang, pengamatan warna batang dilakukan dengan menggunakan *color chart*.
- 3) Bentuk daun, pengamatan bentuk daun dilakukan dengan membandingkan daun hasil persilangan dengan tetua.
- 4) Warna stolon, pengamatan warna stolon dilakukan dengan membandingkan stolon hasil persilangan dengan stolon tetua.
- 5) Gerigi daun, pengamatan gerigi daun dilakukan dengan membandingkan pada literatur Staudt, 1999.
- 6) Ketebalan daun, pengamatan ketebalan daun dilakukan dengan menggunakan jari tangan untuk tebal tipisnya daun.

3.6 Analisis Data

Data pengamatan kualitatif dan kuantitatif morfologi F1 tanaman stroberi hasil persilangan dibandingkan dengan morfologi kedua tetua.

