

3. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Kebun Percobaan Punten dan Laboratorium Shoot Tip Grafting (STG) Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (BALITJESTRO) Kota Batu. Ketinggian tempat 950 mdpl dengan suhu rata-rata harian 22-26°C serta kelembaban udara rata-rata 74,3%. Penelitian dilaksanakan pada bulan April sampai Juli 2015.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan ialah gunting pangkas, plastik, timbangan analitik, pisau, alat pemeras, tisu, wadah perendam, jangka sorong, stopwatch, mikroskop, gembor, sepotong bambu, mulsa hitam perak, label, penggaris, alat tulis, kalkulator dan kamera.

Bahan yang digunakan ialah buah Japansche Citroen (JC) masak fisiologis dengan 3 kriteria bobot buah yang diambil bijinya dengan 2 kriteria jumlah biji per buah dan 2 kriteria diameter biji, air, abu gosok, polybag ukuran 10 x 30 cm, sekam, tanah berpasir, pupuk urea 1 g.l⁻¹ dan NPK 2 g.l⁻¹ serta fungisida bahan aktif difenokonazol 2 ml.l⁻¹.

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan ialah metode survey yang dilanjutkan dengan observasi, yang terdiri atas observasi laboratorium dan observasi lapang. Data dari observasi lapang digunakan sebagai pembanding dari observasi laboratorium. Observasi tersebut didasarkan pada penelitian pendahuluan yang telah dilaksanakan sebelumnya.

Penelitian pendahuluan mempelajari sifat poliembrioni benih JC berdasarkan bobot buah, diameter buah, jumlah biji per buah dan diameter biji. Sampel pada penelitian pendahuluan diambil dari 5 tanaman secara acak dan setiap tanaman diambil 3 buah. Sampel buah tersebut dihitung berdasarkan kategori bobot buah, jumlah biji per buah dan diameter biji lalu di rata-rata. Dari data tersebut dihitung menggunakan analisis selang kepercayaan (*confidence interval*) taraf 95%. Data bobot buah, jumlah biji per buah dan diameter biji menunjukkan adanya beda nyata yang menjadikan setiap kategori mempunyai beberapa kriteria. Kategori bobot

buah mempunyai kriteria besar, sedang dan kecil, kategori jumlah biji per buah mempunyai kriteria banyak dan sedikit serta kategori diameter biji yang mempunyai kriteria besar dan kecil. Dari hasil penelitian pendahuluan tersebut didapatkan 3 kategori yang dijadikan sebagai dasar kategori penelitian (Lampiran 1) serta angka dari masing-masing kriteria berasal dari hasil analisis selang kepercayaan rata-rata pada setiap kategori, yaitu:

Bobot Buah	= Besar ($\geq 158,09$ g)
	= Sedang (107,68-158,08 g)
	= Kecil ($\leq 107,67$ g)
Jumlah Biji Per Buah	= Banyak (≥ 15 biji)
	= Sedikit (≤ 14 biji)
Diameter biji	= Besar ($\geq 0,41$ cm)
	= Kecil ($\leq 0,4$ cm)

Berdasarkan kategori penelitian pendahuluan tersebut, dapat dijadikan sebagai dasar pengambilan sampel buah. Jumlah sampel yang digunakan pada observasi laboratorium dan observasi lapang ialah 60 buah diambil dari 10 tanaman secara acak, sehingga setiap tanaman terdapat 6 sampel buah. 6 sampel buah yang diambil tersebut mewakili kriteria pada setiap kategori. Biji buah yang diambil merupakan sampel pengamatan secara keseluruhan. Jumlah biji yang digunakan sebagai sampel pengamatan, berdasarkan pada seluruh jumlah biji yang terdapat pada setiap sampel buah dan jumlah tersebut sudah merupakan ulangnya.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Penelitian Pendahuluan

Sebelum penelitian dilakukan, telah dilakukan penelitian pendahuluan mengenai bobot buah, jumlah biji per buah dan diameter biji. Penelitian pendahuluan tersebut bertujuan untuk mengetahui kriteria pada masing-masing peubah yaitu bobot buah, jumlah biji per buah serta diameter biji, disertakan di Lampiran 1.

3.4.2 Pengambilan Sampel Buah dan Pengukuran Bobot Buah

Sampel buah Japansche Citroen (JC) yang digunakan ialah buah yang masak fisiologis. Buah diambil dari pohon dengan memangkas tangkai buah diatas

permukaan buah tanpa melukai buah sebanyak 6 buah per tanaman pada 10 tanaman. Sampel buah ditimbang bobot buahnya menggunakan timbangan analitik. Bobot buah yang didapat selanjutnya dikelompokkan berdasarkan kriteria pada kategori bobot buah.

3.4.3 Ekstraksi Biji, Pengukuran Jumlah dan Diameter Biji

Buah JC diiris melingkar menjadi 2 bagian kemudian diputar dan diusahakan pisau tidak memotong biji. Hasil irisan buah diperas menggunakan alat pemeras dan selanjutnya biji dibilas menggunakan air bersih. Biji dapat dibersihkan dari lendir dengan menggunakan tisu, kemudian dihitung jumlah biji per buah serta dikelompokkan berdasarkan kriteria jumlah biji per buah. Selanjutnya biji diukur diameternya dengan posisi pengukuran jangka sorong berada diantara garis lurus atau melintang pada biji (Gambar 5) dan dikelompokkan berdasarkan kriteria diameter biji. Sebagian biji digunakan untuk pengamatan laboratorium dan sebagian akan disemaikan. Biji yang akan disemaikan dan masih berlendir dihilangkan dengan mencampur biji dengan abu gosok kemudian diremas atau dilumat lembut serta dibilas dengan air bersih. Biji dipilih yang baik yaitu biji yang tenggelam atau tidak mengapung. Selanjutnya, biji direndam air panas 52°C selama ± 10 menit kemudian direndam dengan air larutan fungisida bahan aktif Benomyl 5% dosis 5 g.l^{-1} selama ± 1 menit. Biji dikering anginkan atau dapat dilakukan dengan bantuan kipas angin selama 24 jam, selanjutnya biji yang sudah kering disimpan dalam plastik serta apabila akan disemaikan biji diberi bubuk fungisida.



Gambar 5. Pengukuran Diameter Biji Japansche Citroen (JC)

3.4.4 Pengamatan Mikroskop

Biji yang sudah diukur diameternya sesuai dengan kriteria, dikupas kulitnya dan diamati jumlah embrio yang ada di dalam benih di bawah mikroskop.

3.4.5 Penyemaian Benih

Mempersiapkan tempat semai benih dan media tanam yang digunakan ialah sekam dan tanah berpasir dengan perbandingan 1:3. Tanah berpasir yang digunakan diayak untuk mendapatkan keadaan media yang seragam dan bersih dari kotoran. Sekam yang digunakan dimasukkan terlebih dahulu ke dalam 1/3 bagian dari polybag, selanjutnya 2/3 bagian di atasnya diberi tanah berpasir. Media yang sudah dimasukkan ke dalam polybag disiram menggunakan air dan disiram menggunakan larutan fungisida bahan aktif difenokonazol takaran 2 ml.l^{-1} . Media tanam digaris dengan menggunakan sepotong bambu sesuai jarak tanam $1 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$ dan kedalaman $\pm 0,5 \text{ cm}$. Jumlah benih yang disemaikan berdasarkan pada jumlah biji yang ada pada setiap sampel buah dari beberapa kriteria yang telah ditentukan. Benih disemai dengan posisi bagian runcing berada dibawah. Benih yang sudah disemai, ditutup menggunakan media tanah berpasir dengan ketebalan $\pm 0,5 \text{ cm}$. Media tanam disiram menggunakan fungisida takaran 2 ml.l^{-1} . Polybag kemudian ditutup atau dinaungi menggunakan mulsa hitam perak dengan letak warna hitam berada dibagian dalam untuk menjaga suhu dan kelembaban benih pada saat proses perkecambahan. Polybag yang sudah berisi hasil semaian, diletakkan di dalam greenhouse persemaian.

3.4.6 Pemeliharaan Semaian

Benih yang sudah disemai, dibuka penutup atau naungannya pada umur 2-3 minggu setelah semai atau pada saat semaian mulai muncul. Penyiraman dilakukan secukupnya yaitu 2-3 kali dalam seminggu atau apabila kondisi media tanam kering. Pupuk daun dengan dosis 2 g.l^{-1} diberikan setiap 2 minggu setelah semaian mempunyai 2-3 daun sedangkan pupuk urea 1 g.l^{-1} atau NPK 2 g.l^{-1} air setiap 2 minggu sekali silih berganti dengan pemberian pupuk daun. Pengendalian hama dan penyakit dilakukan apabila terjadi serangan. Apabila terdapat serangan, semaian dicabut dan dibuang serta media tanam disemprot fungisida. Penyiangan dilakukan apabila terdapat gulma yang tumbuh. Pemeliharaan dilakukan hingga

umur semaian 3 bulan setelah semai atau saat mempunyai 4-6 helai daun (siap dipindahkan atau transplanting).

3.5 Pengamatan

1. Pengamatan Mikroskopis

Pengamatan mikroskopis dilakukan setelah benih Japansche Citroen (JC) dikeluarkan dari buahnya atau 1 minggu setelah benih dikeluarkan dari buahnya, dengan jumlah benih yang diamati ialah setengah dari jumlah benih secara keseluruhan pada setiap kriteria yaitu sebesar 375 biji.

Pengamatan yang dilakukan yaitu dengan peubah sebagai berikut :

a. Rerata Jumlah Embrio Per Benih

Jumlah embrio yang terdapat dalam satu benih dihitung dan dijumlahkan kemudian dibagi dengan jumlah sampel benih yang diamati.

$$\text{Rerata jumlah embrio per benih} = \frac{\Sigma (e_1 + \dots + e_n)}{\Sigma \text{ benih yang diamati}}$$

b. Persentase Poliembrioni

Persentase poliembrioni didapat dari benih yang memiliki jumlah embrio lebih dari satu (dua, tiga, empat, dst) dibagi dengan jumlah sampel benih yang diamati. Persentase tersebut dijabarkan berdasarkan pada masing-masing jumlah embrio yang didapatkan.

$$\text{Poliembrioni (\%)} = \frac{\Sigma \text{ benih dengan embrio lebih dari satu}}{\Sigma \text{ benih yang diamati}} \times 100 \%$$

2. Pengamatan Hasil Semaian

Pengamatan dilakukan ketika umur semaian 3 bulan setelah semai (akhir masa persemaian) dengan jumlah sampel yang diamati ialah keseluruhan sampel semaian atau sisa dari sampel pengamatan mikroskopis yaitu sebesar 492 biji. Peubah pengamatan ialah sebagai berikut:

a. Daya Tumbuh Benih

Daya tumbuh benih dihitung saat 3 bulan setelah semai. Pengamatan daya tumbuh dilakukan berdasarkan jumlah benih yang tumbuh menjadi semaian dibagi dengan jumlah benih yang ditanam serta *multiple seedling* hanya dihitung satu semaian.

$$\text{Daya tumbuh (\%)} = \frac{\Sigma \text{ benih yang tumbuh}}{\Sigma \text{ benih yang ditanam}} \times 100\%$$

b. Persentase *Multiple Seedling*

Persentase *multiple seedling* dihitung berdasarkan persentase benih yang menghasilkan semaian lebih dari satu. Persentase *multiple seedling* dijabarkan menjadi persentase berdasarkan pada masing-masing jumlah semaian per benih (dua, tiga, empat, dst).

$$\text{Multiple seedling (\%)} = \frac{\Sigma \text{benih tumbuh menjadi multiple seedling}}{\Sigma \text{benih yang tumbuh menjadi semaian (multiple seedling dan semaian tunggal)}} \times 100 \%$$

c. Total Semaian Hidup

Total semaian hidup dihitung berdasarkan total semua semaian yang tumbuh, serta *multiple seedling* dihitung secara keseluruhan.

d. Persentase Semaian *Off type*

Persentase semaian *off type* dihitung berdasarkan persentase semaian *off type* dari total semaian hidup. Semaian *off type* yang dihitung yaitu semaian yang secara morfologi berbeda dengan semaian JC pada umumnya (*true to type*), baik semaian berakar bengkok, semaian bule maupun semaian terserang penyakit.

$$\text{Semaian off type (\%)} = \frac{\Sigma \text{semaian off type}}{\text{Total semaian hidup}} \times 100 \%$$

e. Total Semaian *True to type*

Persentase semaian *true to type* dihitung berdasarkan persentase semaian *true to type* (semaian nuselar) dari total semaian hidup.

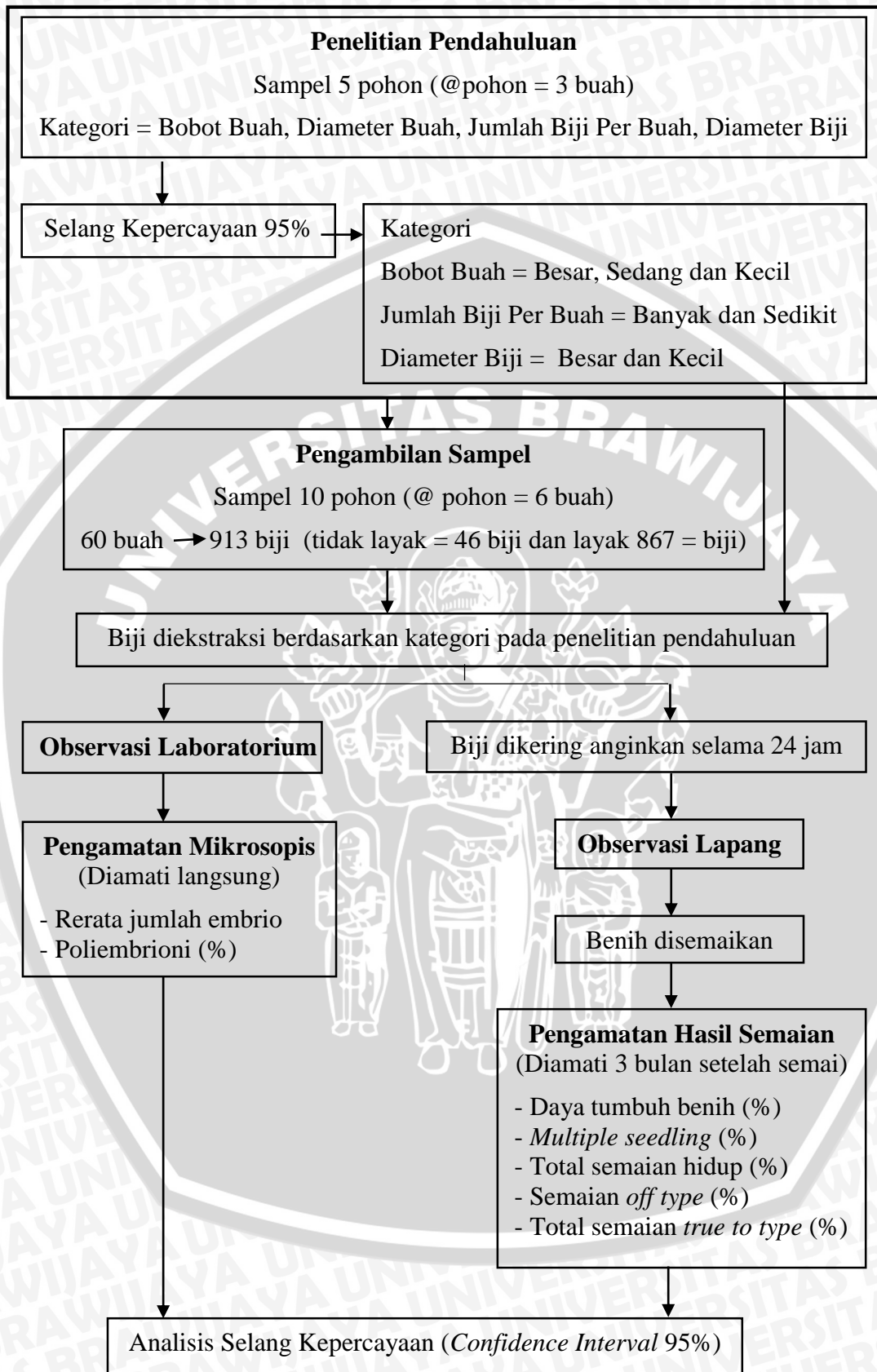
$$\text{Semaian true to type (\%)} = \frac{\Sigma \text{semaian true to type}}{\text{Total semaian hidup}} \times 100 \%$$

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan dianalisis menggunakan analisis selang kepercayaan (*confidence interval*) taraf 95%. Analisis selang kepercayaan diperoleh dari rumus sebagai berikut:

$$\text{Selang Kepercayaan (CI) 95\%} = \text{Rata-rata} \pm t \text{ tabel} \times \text{standar error}$$

Menurut Sugiyatno *et al.* (2013), untuk membedakan pengaruh antar perlakuan dari materi awal yang tidak seragam atau untuk memberikan gambaran masing-masing perlakuan, maka data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis selang kepercayaan taraf 95%.



Gambar 6. Alur Penelitian