

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian akan dilakukan menggunakan jenis penelitian eksperimen. Penelitian eksperimen menurut Payadnya & Jayantika (2018), dilakukan dengan memodifikasi satu atau lebih variabel terhadap satu (atau lebih) kelompok eksperimental. Kemudian hasil dari kelompok eksperimen yang tidak dimodifikasi dibandingkan dengan hasil dari kelompok kontrol yang dimodifikasi. Tujuan melakukan metode eksperimen adalah untuk mengetahui bagaimana hasil modifikasi berkorelasi satu sama lain. Tujuan dari penelitian eksperimen yang dilakukan pada penelitian ini adalah untuk mengetahui bagaimana perbedaan konsentrasi dari kombinasi zat pengatur tumbuh Asam 2,4-D Diklorofenoksiasetat dan kitosan memengaruhi respons eksplan daun *Nepenthes gymnamphora* yang ditanam pada medis $\frac{1}{2}$ MS.

3.2 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan merupakan desain eksperimen faktorial dengan tujuan penelitian untuk mengetahui bagaimana pengaruh penambahan kombinasi 2,4-D dan Kitosan dalam konsentrasi berbeda terhadap respons eksplan daun *Nepenthes gymnamphora* yang ditanam pada medium $\frac{1}{2}$ MS. Rancangan penelitian yang digunakan merupakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial, yang mencakup 2 faktor, diantaranya 2,4-D dengan 5 taraf penelitian, dan kitosan dengan 5 taraf penelitian. Variabel kontrol yang digunakan dalam penelitian ini berupa medium $\frac{1}{2}$ Murashige-Skoog (MS), eksplan daun *Nepenthes gymnamphora*, dan suhu 20°. Variabel bebas yang digunakan terdiri atas konsentrasi 2,4-D (0 ppm; 0,5 ppm; 1 ppm; 1,5 ppm; 2 ppm, diadaptasi berdasarkan Novitasari, (2019); Novitasari, (2021); Milah, (2023)), dan konsentrasi kitosan (0 ppm; 5 ppm; 10 ppm; 15 ppm; 20 ppm, diadaptasi berdasarkan Dewanty, (2011); Makmuryani, (2016)). Untuk variabel terikat dalam penelitian ini berupa persentase eksplan daun *Nepenthes gymnamphora* yang

memberikan respons induksi kalus atau tunas, bertahan memberikan warna hijau dan mengalami *browning*.

Tabel 3.1 menunjukkan perlakuan Kombinasi ZPT 2,4-D dan Kitosan yang digunakan. Perlakuan ini ditandai dengan kode D_xK_x , D mewakili 2,4-D, K mewakili kitosan dan x mewakili konsentrasi yang digunakan.

Tabel 3.1 Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D dan Kitosan

| | Konsentrasi (ppm) | Kitosan | | | | |
|-------|-------------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 |
| 2,4-D | 0 | D_0K_0 | D_0K_5 | D_0K_{10} | D_0K_{15} | D_0K_{20} |
| | 0,5 | $D_{0,5}K_0$ | $D_{0,5}K_5$ | $D_{0,5}K_{10}$ | $D_{0,5}K_{15}$ | $D_{0,5}K_{20}$ |
| | 1 | D_1K_0 | D_1K_5 | D_1K_{10} | D_1K_{15} | D_1K_{20} |
| | 1,5 | $D_{1,5}K_0$ | $D_{1,5}K_5$ | $D_{1,5}K_{10}$ | $D_{1,5}K_{15}$ | $D_{1,5}K_{20}$ |
| | 2 | D_2K_0 | D_2K_5 | D_2K_{10} | D_2K_{15} | D_2K_{20} |

Pengulangan dilakukan sebanyak 2 kali. Jumlah pengulangan yang dilakukan didasari dengan perhitungan Rumus Federer (1977) sebagai berikut:

$$(25-1) (n-1) \geq 15$$

$$24 (n-1) \geq 15$$

$$24n - 24 \geq 15$$

$$24n \geq 15+24$$

$$24n \geq 39$$

$$n \geq \frac{39}{24} = 1.6$$

3.3 Waktu Penelitian

Penelitian berlangsung selama 4 bulan, dilaksanakan sejak bulan Januari hingga April 2024. Laboratorium Kultur Jaringan yang terdapat di FPMIPA B, Universitas Pendidikan Indonesia menjadi lokasi penelitian dan pengumpulan data selama penelitian berlangsung.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

Lampiran 1 menunjukkan daftar alat dan bahan yang digunakan selama penelitian. Komposisi dari medium MS yang digunakan selama penelitian terlampir pada Lampiran 2.

3.5 Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah tumbuhan *Nepenthes gymnamphora* yang terdapat di provinsi Jawa Barat, dengan sampel yang digunakan merupakan tumbuhan *Nepenthes gymnamphora* dari daerah Ciwidey.

3.6 Prosedur Penelitian

Penelitian ini terdiri atas empat tahap penelitian, yaitu:

3.6.1 Persiapan Penelitian

Persiapan penelitian merupakan tahapan pertama yang dilakukan dalam penelitian sebelum tahapan penelitian lainnya dimulai. Dalam persiapan penelitian terdapat tiga tahap persiapan, sebagai berikut:

3.6.1.1 Pembuatan Stok Larutan

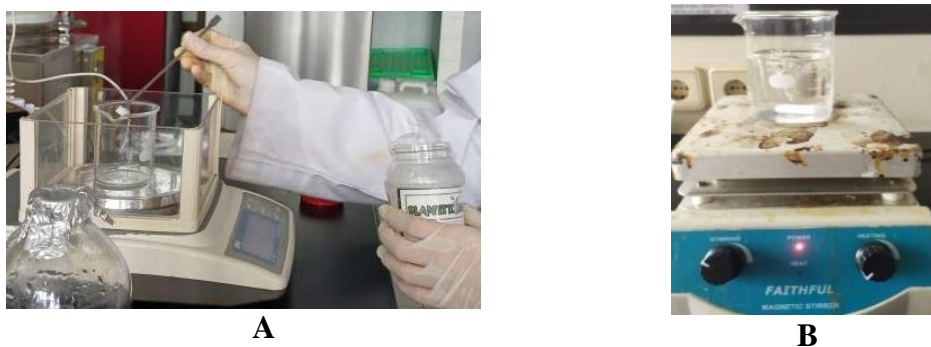
Pembuatan stok larutan dilakukan agar proses pengambilan larutan ZPT yang menjadi komposisi media $\frac{1}{2}$ Murashige and Skoog lebih mudah dilakukan. Stok larutan yang sudah dibuat disimpan dalam botol gelap kemudian ditutup rapat menggunakan plastik bening, dan dieratkan dengan karet. Stok larutan yang sudah dibuat ditempatkan dalam lemari es (Gambar 3.1).

3.6.1.1.1 Larutan Stok ZPT 2,4-D 100 ml

Pembuatan larutan stok 2,4-D dimulai dengan menimbang 0,025 gram bahan stok 2,4-D. Bahan yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan ditambahkan NaOH 1 N sebanyak 5-15 tetes hingga larut. Setelah itu, 100 ml akuades ditambahkan ke dalam *beaker glass* dan dihomogenkan dengan *stirrer*. Setelah larut dimasukkan ke dalam botol kaca gelap berukuran 250 ml, ditutup menggunakan aluminium foil dan plastik serta direkatkan dengan karet. Botol larutan diberi label keterangan (2,4-D dan tanggal pembuatan). Larutan stok 2,4-D diambil berdasarkan konsentrasi yang akan digunakan.

3.6.1.1.2 Larutan Stok Kitosan 100 ml

Pembuatan larutan stok kitosan dimulai dengan menimbang 0,025 gram kitosan. Bahan yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan ditambahkan NaOH 1 N sebanyak 5-15 tetes hingga larut. Setelah itu, 100 ml akuades ditambahkan ke dalam *beaker glass* dan dihomogenkan dengan *stirrer*. Setelah larut dimasukkan ke dalam botol kaca gelap berukuran 250 ml, ditutup menggunakan aluminium foil dan plastik serta direkatkan dengan karet. Botol larutan diberi label keterangan (kitosan dan tanggal pembuatan). Larutan stok 2,4-D diambil berdasarkan konsentrasi yang akan digunakan.



Gambar 3.1 Pembuatan Larutan Stok.

A. Penimbangan bahan untuk larutan stok; B. Proses menghomogenkan larutan stok.

3.6.1.2 Pembuatan Medium Kultur

Medium kultur yang digunakan pada penelitian ini berupa medium $\frac{1}{2}$ MS. Pembuatan medium untuk 25 kombinasi dalam penelitian ini memerlukan sebanyak 1 L medium $\frac{1}{2}$ MS, pembuatan medium disajikan pada Gambar 3.3. Pembuatan medium dimulai dengan menimbang sukrosa sebanyak 30 gr, dan medium MS sebanyak 2,2 gr untuk 1L medium. Sukrosa dan MS yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam *beaker glass* berukuran 2L yang sudah berisi 250 ml akuades kemudian dilarutkan diatas *magnetic stirrer*. Larutan digenapkan sebanyak 1L dengan menambah akuades ke dalam *beaker glass*, dan dihomogenkan diatas *magnetic stirrer*. Media 1L dibagi ke dalam 2 *beaker glass* ukuran 1L lalu ditambahkan 2,4-D sebanyak 1 ml (0,5 ppm) dan 2 ml (1 ppm) lalu dihomogenkan diatas *magnetic stirrer*. Setelah homogen media dituangkan ke dalam 5 *beaker glass* ukuran 100 ml sebanyak 100 ml untuk masing-masing

beaker glass kemudian ditambahkan kitosan dengan konsentrasi 0 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, dan 20 ppm.

Kadar pH diukur menggunakan pH meter hingga nilainya mencapai 5,6 – 5,8. Jika pH terlalu asam ditambahkan larutan 0.1 N NaOH, atau jika pH terlalu basa ditambahkan larutan 0.1 N HCL sedikit demi sedikit pada medium hingga kadar pH yang diinginkan tercapai. Zat pematat (agar) ditambahkan sebanyak 0.7 gr per 100 ml ke dalam masing-masing medium. Medium kemudian dipanaskan diatas *hot plate* dan dihomogenkan dengan *stirrer* hingga larut. Dengan menggunakan pipet, medium dimasukkan sebanyak 10 ml ke dalam masing-masing botol kultur. Botol kultur kemudian ditutup menggunakan aluminium foil serta plastik dan direkatkan dengan karet. Botol kultur disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Setelah itu, botol kultur berisi medium disimpan di ruang kultur steril. Hal serupa dilakukan pada kombinasi 2,4-D (0 ppm; 1,5 ppm; 2ppm).



A



B



C



D



E



F



G



H



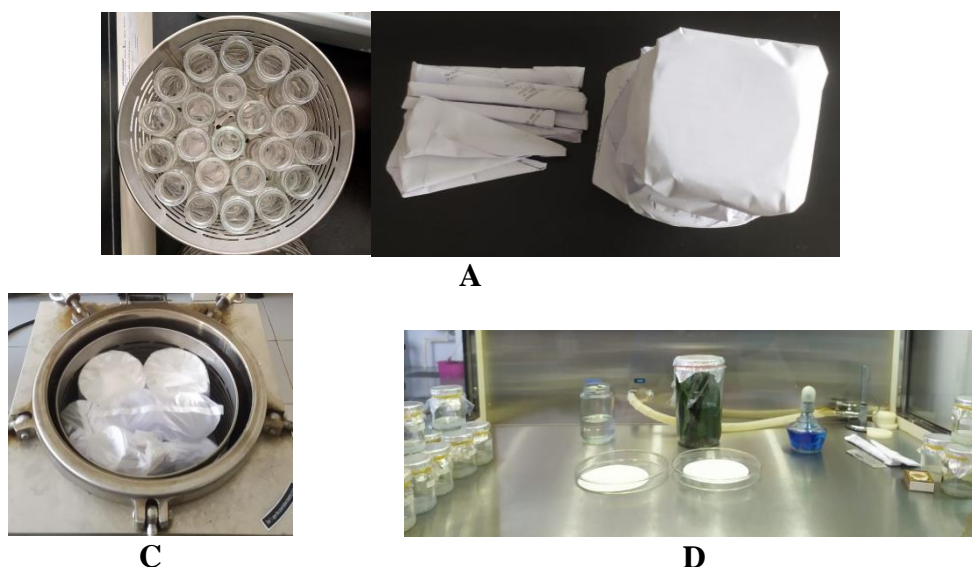
I

Gambar 3.2 Pembuatan Medium Kultur

A. Botol Kultur; B. Larutan Stok; C. Penimbangan Sukrosa; D. Medium yang dihomogenkan; E. Pengukuran pH; F. Penimbangan Agar; G. Pemanasan medium; H. Medium yang dituangkan ke dalam botol kultur; I. Sterilisasi Medium.

3.6.1.3 Sterilisasi Alat dan Akuades

Tahapan sterilisasi alat dilakukan untuk meminimalisir terjadinya kontaminasi dari bakteri atau jamur pada kultur, sterilisasi alat dan akuades disajikan pada Gambar 3.2. Alat yang digunakan untuk menanam eksplan, seperti gunting, scapel, pinset, cawan petri, botol kultur, dan tips mikropipet disterilisasi pada tahap ini. Sterilisasi alat dimulai dengan mencuci bersih semua alat menggunakan sabun kemudian dibilas dengan air bersih dan dikeringkan. Alat-alat yang sudah kering dibungkus kertas dan dimasukkan ke dalam plastik tahan panas, lalu disterilisasi dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm. Setelah tahapan sterilisasi selesai, semua alat disimpan di tempat yang bersih.



Gambar 3.3 Sterilisasi Alat dan Akuades.

A. Alat Tanam dan botol kultur yang siap untuk disterilisasi; C. Sterilisasi akuades dan alat tanam menggunakan *autoclave*; D. Sterilisasi LAF.

Pada tahapan penanaman eksplan, alat-alat yang hendak digunakan disemprotkan terlebih dahulu dengan alkohol 70% agar alat tetap dalam kondisi aseptik. Prosedur ini dilakukan setiap hendak memasukkan alat ke dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Sterilisasi akuades dilakukan agar akuades yang digunakan

Hana Khoirun Nisa, 2024

RESPONS EKSPLAN DAUN *NEPENTHES GYMNAMPHORA* PADA MEDIUM $\frac{1}{2}$ MS DENGAN PENAMBAHAN ASAM 2,4-DIKLOROFENOKSIASETAT DAN KITOSAN

Univesitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

selama sterilisasi eksplan merupakan akuades yang steril, dan untuk meminimalisir kontaminasi akibat bakteri atau jamur pada kultur. Sterilisasi akuades dimulai dengan memasukkan akuades ke dalam botol kaca dan ditutup menggunakan aluminium foil. Botol kaca yang sudah berisi akuades dimasukkan ke dalam autoclave dan disterilisasi dengan suhu 121°C. Saat tahapan sterilisasi eksplan, akuades yang sudah steril disemprotkan alkohol 70% terlebih dahulu sebelum masuk ke dalam *Laminar Air Flow* (LAF).

3.6.2 Pelaksanaan Penelitian

Prosedur kedua dalam penelitian ini adalah pelaksanaan penelitian. Proses pelaksanaan penelitian terdiri dari tiga tahapan, yaitu:

3.6.2.1 Pengambilan Eksplan

Tumbuhan *Nepenthes gymnamphora* yang digunakan pada penelitian ini berasal dari daerah Ranca Upas Ciwidey, Kec. Rancabali, Kabupaten Bandung, Jawa Barat. Bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan berupa bagian daun ke-1 sampai 4 (Gambar 3.4) pada *Nepenthes gymnamphora*.



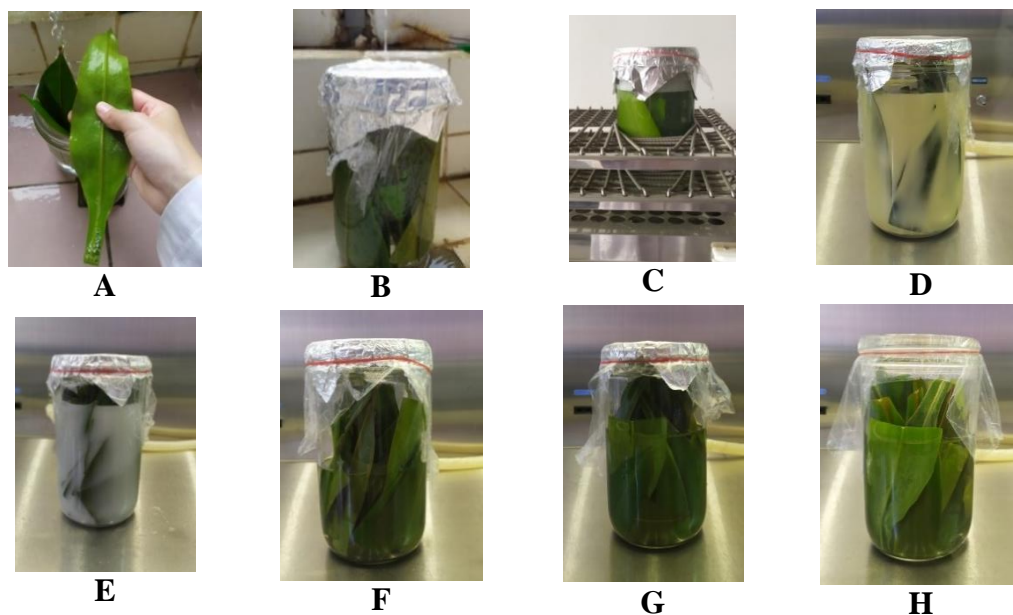
Gambar 3.4 Eksplan Daun *Nepenthes gymnamphora* (1/6 ×).

3.6.2.2 Sterilisasi Eksplan

Tahapan sterilisasi eksplan dilakukan dalam dua proses, yaitu proses di luar LAF dan di dalam LAF (Gambar 3.5). Proses sterilisasi diluar LAF dimulai dengan membersihkan eksplan daun dibawah air mengalir menggunakan sabun sambil diusap secara perlahan. Eksplan dibilas menggunakan air mengalir sebanyak 3×15 menit (45 menit) sampai busa hilang. Eksplan direndam dalam detergen 1% selama 10 menit dan diletakkan diatas *shaker* untuk memastikan seluruh bagian daun terkena larutan detergen. Eksplan dibilas sebanyak 3 kali

menggunakan air mengalir, lalu dibilas lagi dengan akuades sampai busa hilang sebelum masuk ke proses sterilisasi di dalam LAF.

Proses sterilisasi eksplan di dalam LAF dimulai dengan merendam eksplan dalam larutan fungisida 2% selama 20 menit dan dikocok menggunakan *shaker*, dan dibilas menggunakan akuades steril sebanyak 3 kali. Eksplan lalu direndam dalam larutan bakterisida 2% selama 20 menit dan dikocok menggunakan *shaker*, selanjutnya dibilas menggunakan akuades steril sebanyak 3 kali. Eksplan direndam dalam alkohol steril 70% selama 30 detik, dan dibilas menggunakan akuades steril sebanyak 3 kali. Kemudian eksplan direndam dalam HgCl₂ 0,5% selama 5 menit, dan kembali dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Langkah terakhir pada proses sterilisasi berupa perendaman eksplan dalam Clorox 5% selama 5 menit, dan dibilas dengan akuades steril sebanyak 5 kali.



Gambar 3.5 Proses Sterilisasi Eksplan.

A. Pencucian eksplan dengan sabun; B. Eksplan di aliri air mengalir; C. Perendaman eksplan dalam larutan detergen; D. Perendaman eksplan dalam larutan fungisida 2%; E. Perendaman eksplan dalam larutan bakterisida 2%; F. Perendaman eksplan dalam larutan alkohol steril 70%; G. Perendaman eksplan dalam larutan HgCl₂ 0,5%; H. Perendaman eksplan dalam larutan Chlorox 5%.

3.6.2.3 Penanaman Eksplan

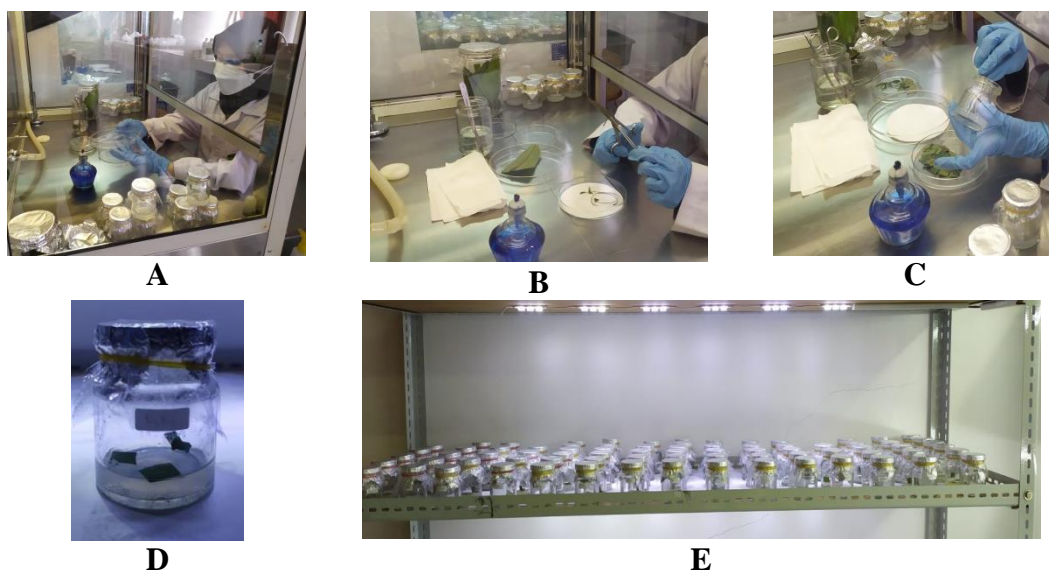
Penanaman eksplan dilakukan dalam keadaan yang steril di dalam *Laminar air flow* (Gambar 3.6). Sebelum digunakan, semua alat tanam disemprot

Hana Khoirun Nisa, 2024

RESPONS EKSPAN DAUN *NEPENTHES GYMNAMPHORA* PADA MEDIUM ½ MS DENGAN PENAMBAHAN ASAM 2,4-DIKLOROFENOKSIASETAT DAN KITOSAN

Univesitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

dan direndam dengan alkohol 70% lalu dipanaskan di sekitar bunsen. Penanaman eksplan dimulai dengan pemotongan eksplan dengan ukuran 1×1 cm menggunakan *steril blade* di dalam cawan petri. Eksplan daun yang sudah dipotong kemudian ditanam pada medium yang sudah disiapkan. Setiap botol kultur berisikan 3 buah potongan eksplan. Botol kultur yang sudah ditanami eksplan ditutup dengan aluminium foil serta plastik bening kemudian dieratkan dengan karet. Botol kultur selanjutnya diletakkan dalam ruang kultur yang aseptik dengan suhu 20°C.



Gambar 3.6 Tahapan Penanaman Eksplan.

A. Sterilisasi alat yang akan digunakan dengan bunsen; B. Eksplan daundi potong; C. Eksplan daun ditanam ke dalam medium; D. Botol kultur berisikan 3 potong eksplan; E. Botol kultur yang disimpan dalam ruang kultur.

3.6.3 Pengumpulan Data

Pengamatan respons eksplan daun *Nepenthes gymnamphora* dilakukan 2 hari sekali selama 1 bulan. Pengamatan dilakukan dengan melihat respons yang diberikan eksplan daun seperti pembengkakan, munculnya bulatan-bulatan kecil pada eksplan berupa kalus, atau yang akan membentuk tunas, eksplan yang mempertahankan warna hijau dan yang mengalami *browning*. Setiap respons yang ditunjukkan oleh eksplan didokumentasikan. Jumlah eksplan yang memberikan respons dari berbagai perlakuan kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan Kitosan dihitung jumlahnya. Eksplan daun yang menunjukkan respons

Hana Khoirun Nisa, 2024

RESPONS EKSPAN DAUN *NEPENTHES GYMNAMPHORA* PADA MEDIUM $\frac{1}{2}$ MS DENGAN PENAMBAHAN ASAM 2,4-DIKLOROFENOKSIASETAT DAN KITOSAN

Univesitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

pembengkakan, mempertahankan warna hijau atau *browning* dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

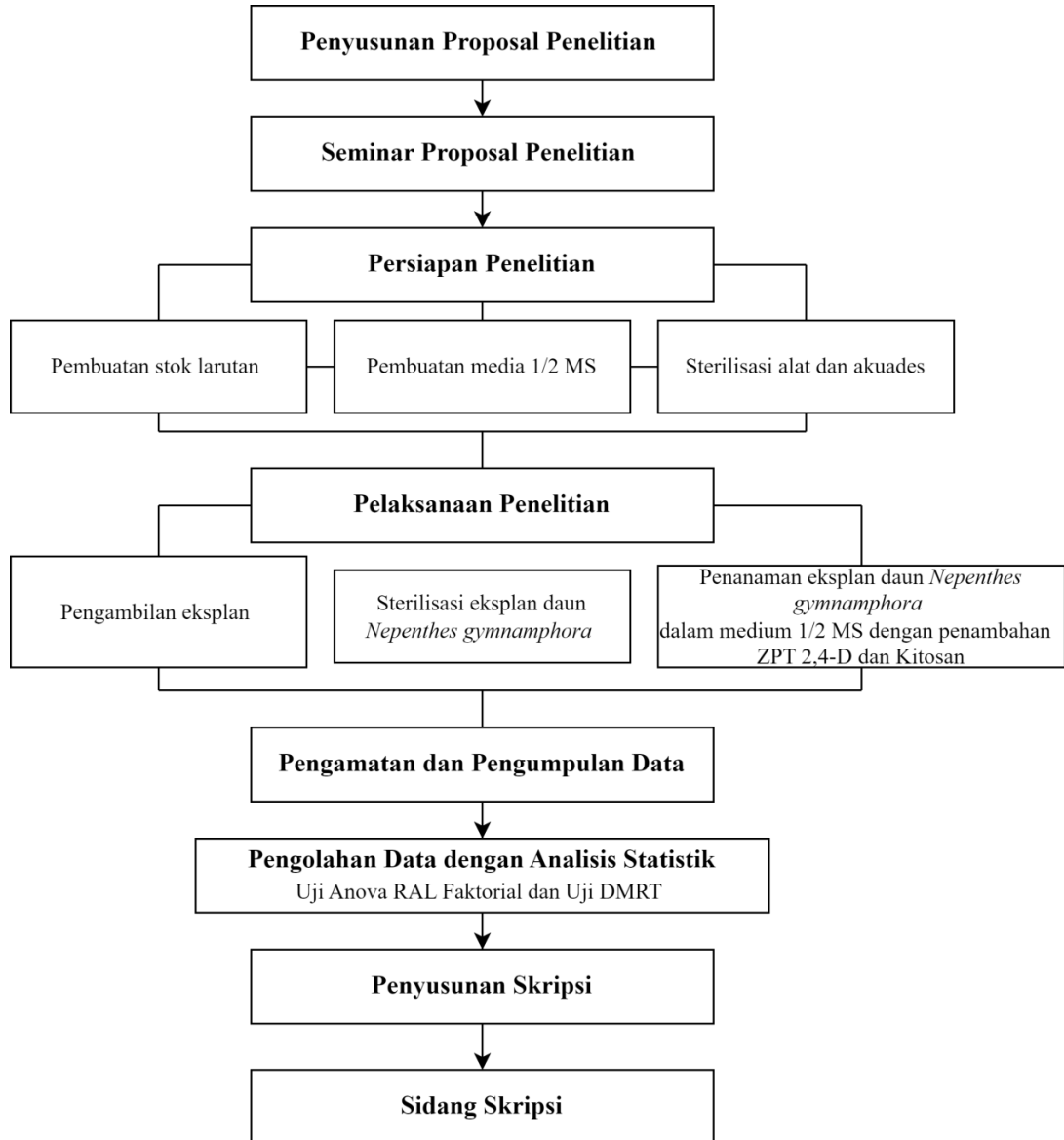
$$\% \text{ Respons eksplan: } \frac{\text{Jumlah eksplan yang merespons}}{\text{Jumlah eksplan total}} \times 100\%$$

3.6.4 Analisis Data

Analisis data yang diperoleh diolah secara kuantitatif menggunakan uji ANOVA RAL faktorial dengan bantuan aplikasi *Microsoft Excel* untuk mengetahui interaksi dan pengaruh dari setiap perlakuan yang diberikan. Dilakukan juga uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) menggunakan *software Statistical Program for Social Science* (SPSS) untuk mengetahui perbedaan pengaruh antar perlakuan yang diberikan.

3.7 Alur Penelitian

Gambar 3.7 menunjukkan alur penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini.



Gambar 3.7 Alur Penelitian