

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengeksplorasi pengaruh perlakuan yang terkontrol pada variabel lainnya. Menurut Ratmingsih (2010), penelitian eksperimental adalah metode untuk meneliti efek sebuah perlakuan terhadap variabel lain dalam kondisi yang dapat dikendalikan. Tujuannya adalah untuk menguji hipotesis sebab-akibat dengan mengeksplorasi berbagai kombinasi konsentrasi ZPT 2,4-D dan air kelapa terhadap respons eksplan daun *Nepenthes gymnamphora* yang dikultur pada media $\frac{1}{2}$ Murashige dan Skoog (MS).

3.2 Desain Penelitian

Penelitian ini mengadopsi rancangan eksperimen faktorial untuk mengetahui pengaruh kombinasi konsentrasi berbeda dari air kelapa dan 2,4-D terhadap respons eksplan daun *Nepenthes gymnamphora* yang ditanam pada medium $\frac{1}{2}$ MS. Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RAL Faktorial) dilakukan, dengan faktor berupa: 2,4-D yang memiliki 5 taraf penelitian, dan air kelapa dengan 5 taraf penelitian. Beberapa variabel penelitian yang akan diamati dalam adalah sebagai berikut:

1. Variabel kontrol:
 - a. Eksplan daun *Nepenthes gymnamphora*
 - a. Media $\frac{1}{2}$ Murashige & Skoog (MS)
 - b. Temperatur ruang kultur 20-23°C
2. Variabel bebas:
 - a. Konsentrasi 2,4-D: 0 (kontrol); 0,5 ppm; 1ppm; 1,5 ppm; 2 ppm (Diadaptasi dari Novitasari & Isnaini, 2021 dan Purba dkk., 2017).
 - b. Konsentrasi air kelapa (v/v): 0% (kontrol), 10%, 15%, 20%, dan 25% (Diadaptasi dari Akhiriana dkk., 2019; Al-Khayri, 2010; dan Michael, 2011).

3. Variabel terikat:

Persentase eksplan daun *Nepenthes gymnamphora* yang memberikan respons (membentuk kalus atau tunas), yang mengalami *browning*, serta yang tidak memberikan respons.

Tabel 3.1 Kombinasi Media dengan Air Kelapa dan 2,4-D

	Konsentrasi	2,4-D (ppm)				
		0	0,5	1	1,5	2
Air Kelapa (%)	0	D ₀ A ₀	D _{0,5} A ₀	D ₁ A ₀	D _{1,5} A ₀	D ₂ A ₀
	10	D ₀ A ₁₀	D _{0,5} A ₁₀	D ₁ A ₁₀	D _{1,5} A ₁₀	D ₂ A ₁₀
	15	D ₀ A ₁₅	D _{0,5} A ₁₅	D ₁ A ₁₅	D _{1,5} A ₁₅	D ₂ A ₁₅
	20	D ₀ A ₂₀	D _{0,5} A ₂₀	D ₁ A ₂₀	D _{1,5} A ₂₀	D ₂ A ₂₀
	25	D ₀ A ₂₅	D _{0,5} A ₂₅	D ₁ A ₂₅	D _{1,5} A ₂₅	D ₂ A ₂₅

Tabel 3.1 menunjukkan kombinasi air kelapa dan 2,4-D. Setiap sampel akan diberi kode D_nA_n, dengan keterangan sebagai berikut: A merupakan kode untuk air kelapa, D merupakan kode untuk 2,4-D, dan n merupakan kode untuk masing-masing konsentrasi yang digunakan. Pengulangan dalam penelitian ini dilakukan sebanyak dua kali pengulangan. Pengulangan dilakukan berdasarkan perhitungan Federer (1977):

$$\begin{aligned}
 (u - 1)(p - 1) &\geq 15 \\
 (u - 1)(25 - 1) &\geq 15 \\
 24(u - 1) &\geq 15 \\
 24u - 24 &\geq 15 \\
 24u &\geq 15 + 24 \\
 24u &\geq 39 \\
 u &\geq \frac{39}{24} \approx 1,6
 \end{aligned}$$

Keterangan:

u = banyak pengulangan

p = perlakuan

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan selama empat bulan, dimulai dari Bulan Januari hingga April 2024, di Laboratorium Kultur Jaringan, Gedung FPMIPA B, Universitas Pendidikan Indonesia.

3.4 Alat dan Bahan

Daftar alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terlampir pada Lampiran 1.

3.5 Populasi dan Sampel

Tumbuhan *Nepenthes gymnamphora* yang terdapat di wilayah Ciwidey, Kabupaten Bandung menjadi populasi dan sampel yang digunakan dalam penelitian ini.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Tahap Persiapan Penelitian

Tahap awal dalam serangkaian proses kultur jaringan eksplan daun *Nepenthes gymnamphora* yang akan dilakukan berupa tahap persiapan. Tahap persiapan ini terdiri dari persiapan eksplan, pembuatan stok larutan, pembuatan media kultur, serta sterilisasi alat dan akuades.

3.6.1.1 Persiapan Eksplan

Proses ini diawali dengan pengumpulan daun tumbuhan *Nepenthes gymnamphora*. Bagian tanaman yang diambil sebagai eksplan yakni daun ke-1 hingga ke-4 dari ujung apeks. *Nepenthes gymnamphora* yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Ciwidey, Kabupaten Bandung.

3.6.1.2 Pembuatan Larutan Stok

Pembuatan stok ditujukan untuk memudahkan pembuatan media $\frac{1}{2}$ Murashige & Skoog. Larutan stok disimpan ke dalam botol stok berwarna gelap yang kemudian ditutup menggunakan *aluminium foil*, plastik, direkatkan dengan karet, lalu ditempatkan dalam lemari es. Proses pembuatan larutan stok dapat dilihat pada Gambar 3.1.

3.6.1.2.1 Larutan Stok ZPT 2,4-D 100 mL

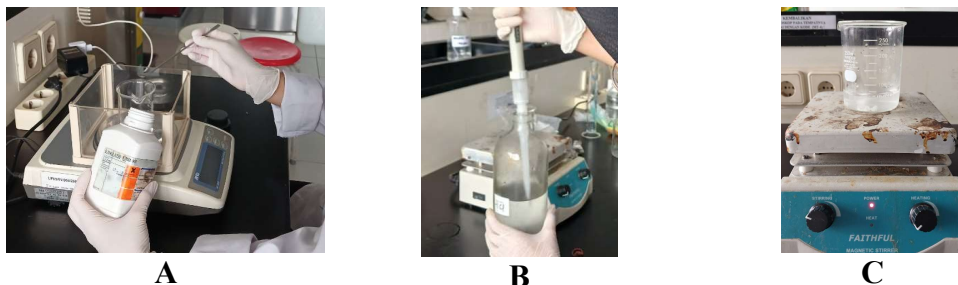
Ditimbang 0,1 gram serbuk 2,4-D, lalu dimasukkan ke dalam *Beaker glass* dan ditetesi NaOH 1 N sebanyak 5-25 tetes hingga serbuk 2,4-D larut. Ditambahkan aquades ke dalam *Beaker glass* tersebut hingga volume mencapai 100 mL, lalu diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah larut dimasukkan ke dalam botol gelap berukuran 250 mL, ditutup dengan *aluminium foil* dan plastik lalu direkatkan dengan karet. Botol stok diberi label 2,4-D dan tanggal pembuatan larutan.

3.6.1.2.2 Larutan stok HCl 0,1 N

Sebanyak 25 mL HCl 1 N diambil menggunakan mikropipet, lalu dimasukkan ke dalam *Beaker glass* dan ditambahkan aquades secara perlahan hingga volume mencapai 250 mL. Larutan diaduk menggunakan *magnetic stirrer*, lalu dimasukkan ke dalam botol gelap dengan ukuran 250 mL, ditutup rapat dengan *aluminium foil* dan plastik lalu direkatkan dengan karet. Botol stok dilabeli HCl 0,1 N dan tanggal pembuatan larutan. Larutan HCl 0,1 N digunakan untuk menyesuaikan pH dalam pembuatan media kultur.

3.6.1.2.3 Larutan stok NaOH 0,1 N

Ditimbang 1 gram serbuk NaOH, kemudian dimasukkan ke dalam *Beaker glass* dan ditambahkan aquades hingga volume mencapai 250 mL, lalu diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah larut dimasukkan ke dalam botol gelap dengan ukuran 250 mL, ditutup dengan *aluminium foil* dan plastik lalu direkatkan dengan karet. Botol stok diberi label NaOH 0,1 N dan tanggal pembuatan larutan. Larutan NaOH 0,1 N digunakan untuk menyesuaikan pH dalam pembuatan media kultur.



Gambar 3.1 Proses Pembuatan Larutan Stok

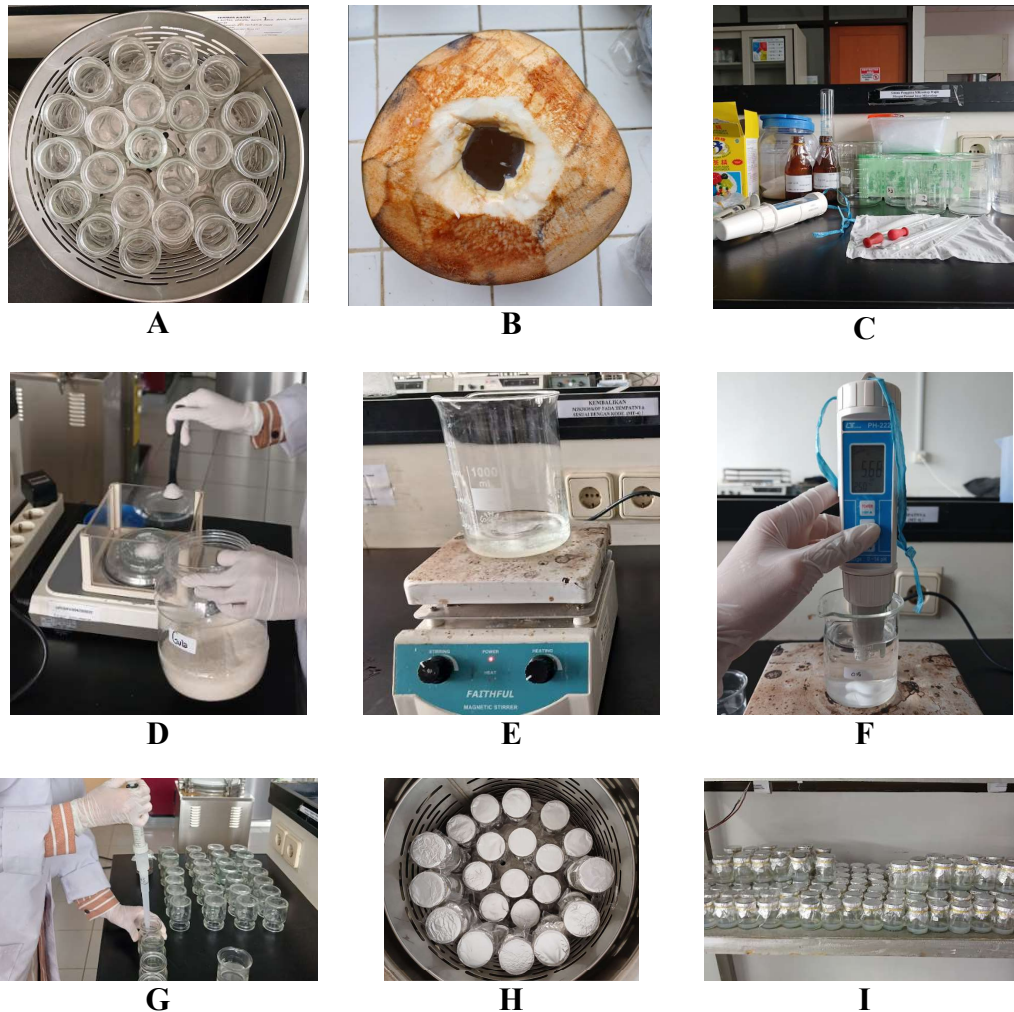
A. Penimbangan bahan stok; B. Pemipetan bahan stok; C. Homogenisasi stok

3.6.1.3 Pembuatan Media Kultur

Media $\frac{1}{2}$ Murashige dan Skoog (MS) dijadikan media dasar kultur dalam penelitian ini. Media dibuat menggunakan serbuk MS dengan kandungan yang telah sesuai dengan komposisi media Murashige & Skoog (1962) pada umumnya. Komposisi serbuk media MS yang digunakan telah dilampirkan di Lampiran 2. Botol kultur yang akan diisi media sebelumnya disterilisasi menggunakan autoklaf terlebih dahulu. Proses pembuatan media dapat dilihat pada Gambar 3.2.

Media $\frac{1}{2}$ MS dibuat sebanyak 1 L untuk 25 jenis kombinasi air kelapa dan 2,4-D yang akan digunakan dalam penelitian ini. Sebanyak 30 g gula pasir ditimbang lalu ditempatkan ke dalam *Beaker glass* berukuran 2 L kemudian ditambahkan aquades sebanyak 500 mL, lalu diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Selama gula dilarutkan, serbuk MS ditimbang sebanyak 2,2 g untuk 1 L media. Setelah larut, serbuk MS dan aquades ditambahkan ke dalam *Beaker glass* hingga volumenya mencapai 1 L, lalu dihomogenkan kembali. Setelah homogen, larutan media dibagi menjadi 5 *Beaker glass* dengan masing-masing volume 200 mL, kemudian kelima *Beaker glass* tersebut diteteskan 2,4-D sebanyak 0,5 ppm; 1 ppm; serta 2 ppm, dengan satu gelas berisi larutan media tanpa ditambahkan 2,4-D (0 ppm) sebagai perlakuan kontrol. Masing-masing larutan media yang telah ditambahkan 2,4-D tadi dibagi lagi menjadi 5 *Beaker glass* dengan masing-masing volume 40 mL, lalu kelima gelas ditambahkan kombinasi air kelapa sebanyak 10%, 15%, 20%, dan 25%, dengan satu gelas tidak ditambahkan air kelapa (0%) sebagai perlakuan kontrol dan dihomogenkan kembali. Setelah larutan media homogen, pH larutan diukur menggunakan pH meter hingga pH berkisar antara 5,6-5,8. Penambahan beberapa tetes larutan NaOH dilakukan jika pH terlalu kecil, sedangkan penambahan beberapa tetes larutan HCl dilakukan jika pH terlalu besar. Agar-agar yang telah ditimbang sebanyak 0,7 g/100 mL dimasukkan ketika pH sudah sesuai. Seluruh kombinasi media kemudian dipanaskan sambil dihomogenkan menggunakan *hot plate* dan *magnetic stirrer* hingga larut dan mendidih. Media kemudian dituang ke dalam botol kultur menggunakan mikropipet dengan masing-masing botol diisi sebanyak 10 mL larutan media, kemudian

ditutup menggunakan *aluminium foil* lalu plastik tahan panas serta dieratkan menggunakan karet. Botol diberi label sesuai dengan kombinasi 2,4-D dan air kelapa seperti yang sudah tertera dalam Tabel 3.1 sebelum disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan temperatur 121°C dan tekanan sebesar 1,5 atm selama 15-20 menit. Setelah dingin, media disimpan di ruangan yang steril.



Gambar 3.2 Proses Pembuatan Media Kultur

- A. Sterilisasi botol kultur; B. Penyiapan air kelapa; C. Alat dan bahan pembuatan media; D. Penimbangan bahan media; E. Homogenisasi larutan media; F. Pengukuran pH larutan media; G. Penuangan media; H. Sterilisasi media; I. Penyimpanan media

(Dokumentasi Pribadi, 2024)

3.6.1.4 Sterilisasi Alat dan Akuades

Alat-alat seperti *dissecting set* (gunting dan pinset), cawan petri, botol kultur, dan tips mikropipet perlu disterilisasi terlebih dahulu sebelum penelitian dilakukan. Semua alat dicuci bersih dengan sabun, kemudian dikeringkan. Cawan petri dan *dissecting set* yang sudah kering dibungkus menggunakan kertas terlebih dahulu. Seluruh alat tadi kemudian dibungkus menggunakan plastik tahan panas. Seluruh alat disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15-20 menit. Setelah sterilisasi selesai, alat-alat tersebut disimpan di tempat steril tanpa dibuka bungkusannya. Nantinya, pada tahapan penanaman sebelum masuk ke dalam *laminar air flow*, seluruh alat yang akan digunakan di dalam LAF disemprotkan alkohol 70% terlebih dahulu. Sterilisasi akuades dilakukan dengan memasukkan akuades ke dalam botol kaca/botol susu yang ditutup menggunakan *aluminium foil* dan plastik tahan panas. Botol berisi akuades tersebut disusun untuk disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu, tekanan, dan waktu yang sama dengan sterilisasi alat. Setelah sterilisasi selesai, akuades disimpan di tempat steril. Proses sterilisasi alat dan akuades dapat dilihat pada Gambar 3.3.



A



B



C

Gambar 3.3 Proses Sterilisasi Alat dan Akuades

A. Sterilisasi alat tanam; B. Sterilisasi Botol Kultur; C. Akuades yang akan disterilisasi

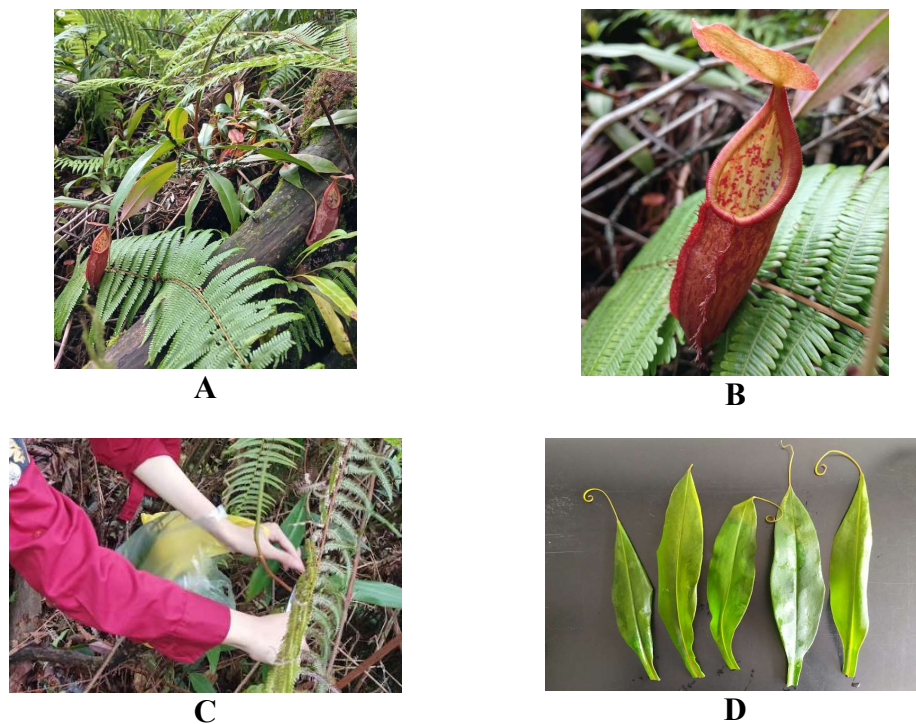
(Dokumentasi Pribadi, 2024)

3.6.2 Tahap Pelaksanaan

Tahap pelaksanaan adalah tahap yang dilakukan setelah tahap persiapan dalam serangkaian proses kultur jaringan eksplan daun *Nepenthes gymnamphora* yang akan dilakukan. Tahap pelaksanaan ini terdiri atas pengambilan eksplan, sterilisasi eksplan, dan penanaman eksplan.

3.6.2.1 Pengambilan Eksplan

Tumbuhan *Nepenthes gymnamphora* yang diambil dari wilayah Ranca Upas Ciwidey, Kec. Rancabali, Kabupaten Bandung, Jawa Barat. Bagian tanaman *Nepenthes gymnamphora* yang diambil untuk digunakan sebagai eksplan adalah daun ke-1 sampai ke-4 dari ujung apeks. Proses pengambilan dan pemilihan eksplan dapat dilihat pada Gambar 3.4.



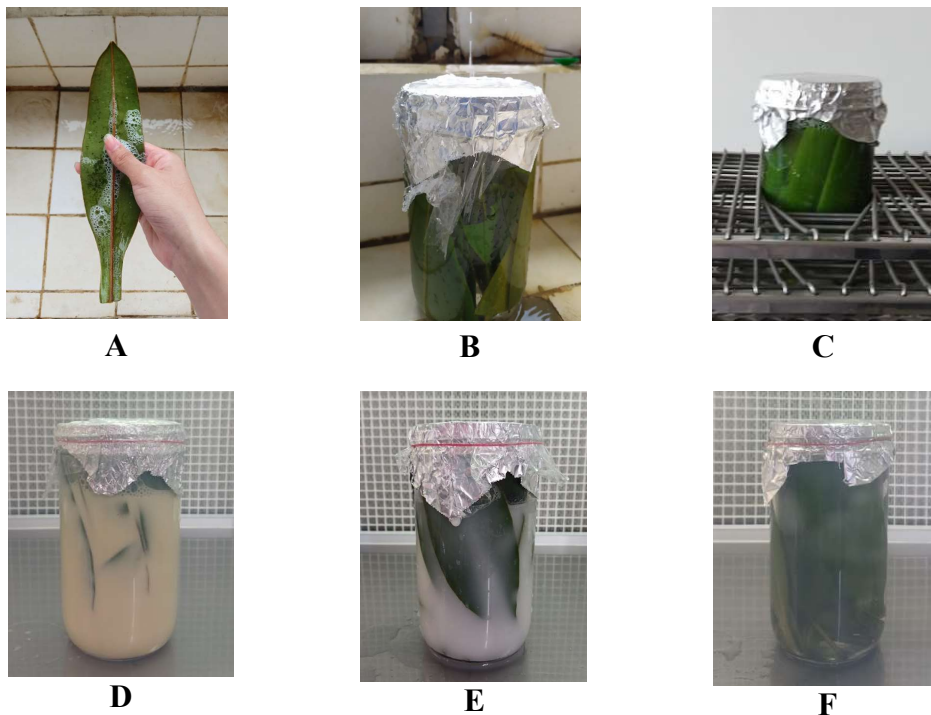
Gambar 3.4 Proses Pengambilan Eksplan

A. Tumbuhan *Nepenthes gymnamphora* di habitatnya; B. Kantong *Nepenthes gymnamphora*; C. Proses pengambilan eksplan; D. Eksplan Daun *Nepenthes gymnamphora*

(Dokumentasi Pribadi, 2024)

3.6.2.2 Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan dilakukan sebanyak dua kali, saat di luar *laminar air flow* dan di dalam *laminar air flow*. Proses sterilisasi di luar LAF diawali dengan pembersihan eksplan daun *Nepenthes gymnamphora* dengan menggunakan sabun di bawah air mengalir. Eksplan daun diusap dengan menggunakan sabun secara berhati-hati hingga bersih dari kotoran yang menempel. Selanjutnya eksplan dibilas selama 15 menit sebanyak 3 kali dengan air mengalir hingga busa hilang. Eksplan kemudian direndam selama 10 menit dalam larutan detergen 1% sembari diguncang menggunakan *shaker*. Setelahnya eksplan dibilas 3 kali dengan air mengalir, kemudian dibilas kembali dengan akuades sampai busa hilang.



Gambar 3.5 Proses Sterilisasi Eksplan

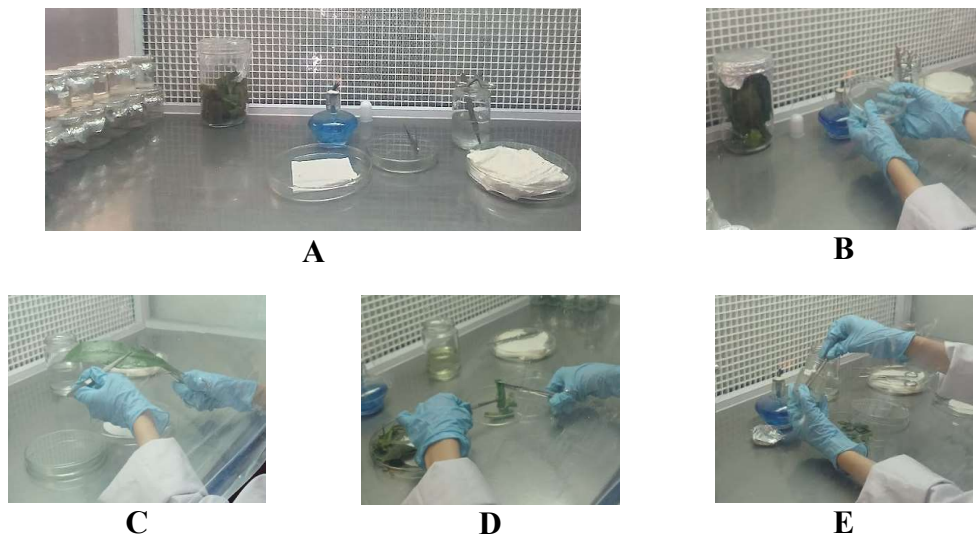
A. Pembersihan eksplan dengan sabun; B. Pembilasan eksplan dengan air mengalir; C. Perendaman eksplan dengan larutan detergen 1%; D. Perendaman eksplan dengan larutan fungisida 2%; E. Perendaman eksplan dengan larutan bakterisida 2%; F. Perendaman eksplan dengan larutan HgCl_2 0,5%

(Dokumentasi Pribadi, 2024)

Proses sterilisasi di dalam *laminar air flow* diawali dengan merendam eksplan dalam larutan fungisida 2% selama 20 menit sembari dikocok menggunakan *shaker*, eksplan kemudian dibilas 3 kali dengan akuades steril. Setelah itu, eksplan direndam dalam larutan bakterisida 2% selama 20 menit sembari dikocok menggunakan *shaker*, lalu dibilas kembali 3 kali dengan akuades steril. Eksplan lalu direndam selama 30 detik dalam alkohol steril, lalu dibilas 3 kali dengan akuades steril. Kemudian dilakukan perendaman eksplan selama 5 menit dalam HgCl₂ 0,5%, lalu dilakukan pembilasan 3 kali dengan akuades steril. Langkah terakhir adalah perendaman eksplan dalam larutan *Bayclin* 5% selama 5 menit, dan pembilasan sebanyak 3 kali dengan akuades steril. Gambar 3.5 memperlihatkan proses sterilisasi eksplan yang dilakukan.

3.6.2.3 Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan dilakukan di dalam *laminar air flow* dalam kondisi aseptik dan steril. Sebelum digunakan, *laminar air flow* di UV terlebih dahulu selama 30 menit-2 jam, kemudian disemprot dan dilap seluruh permukaan dalamnya dengan alkohol 70%. Di dalam *laminar air flow*, pinset dan gunting dicelupkan ke dalam alkohol 70% dan dipanaskan dengan lampu spirtus sebelum digunakan. Cawan petri yang akan digunakan juga dilewatkan dan dipanaskan dengan lampu spirtus. Penanaman eksplan diawali dengan pemotongan sedikit bagian dari kedua ujung daun dan sedikit bagian dari keliling daun, kemudian dilanjutkan dengan pemotongan eksplan dengan ukuran 1x1 cm menggunakan bantuan pinset dan gunting di atas cawan petri. Eksplan yang sudah dipotong ditanam ke dalam media dengan posisi *abaxial* daun menghadap media. Setiap botol ditanami tiga potong eksplan. Botol kultur yang sudah ditanami eksplan ditutup rapat menggunakan *aluminium foil* serta plastik, lalu dirapatkan menggunakan karet. Botol yang sudah berisi eksplan disusun di ruang kultur selama 1 bulan. Proses penanaman eksplan dapat dilihat pada Gambar 3.6.



Gambar 3.6 Proses Penanaman Eksplan

A. Alat dan bahan penanaman; B. Cawan petri yang dipanaskan dengan lampu spirtus; C. Pemotongan sisi dan ujung daun; D. Pemotongan eksplan menjadi ukuran 1x1 cm; E. Penanaman eksplan pada media kultur; F. Botol kultur berisi eksplan yang sudah ditanam; G. Penyimpanan eksplan di ruang kultur
(Dokumentasi Pribadi, 2024)

3.6.3 Tahap Pengumpulan Data

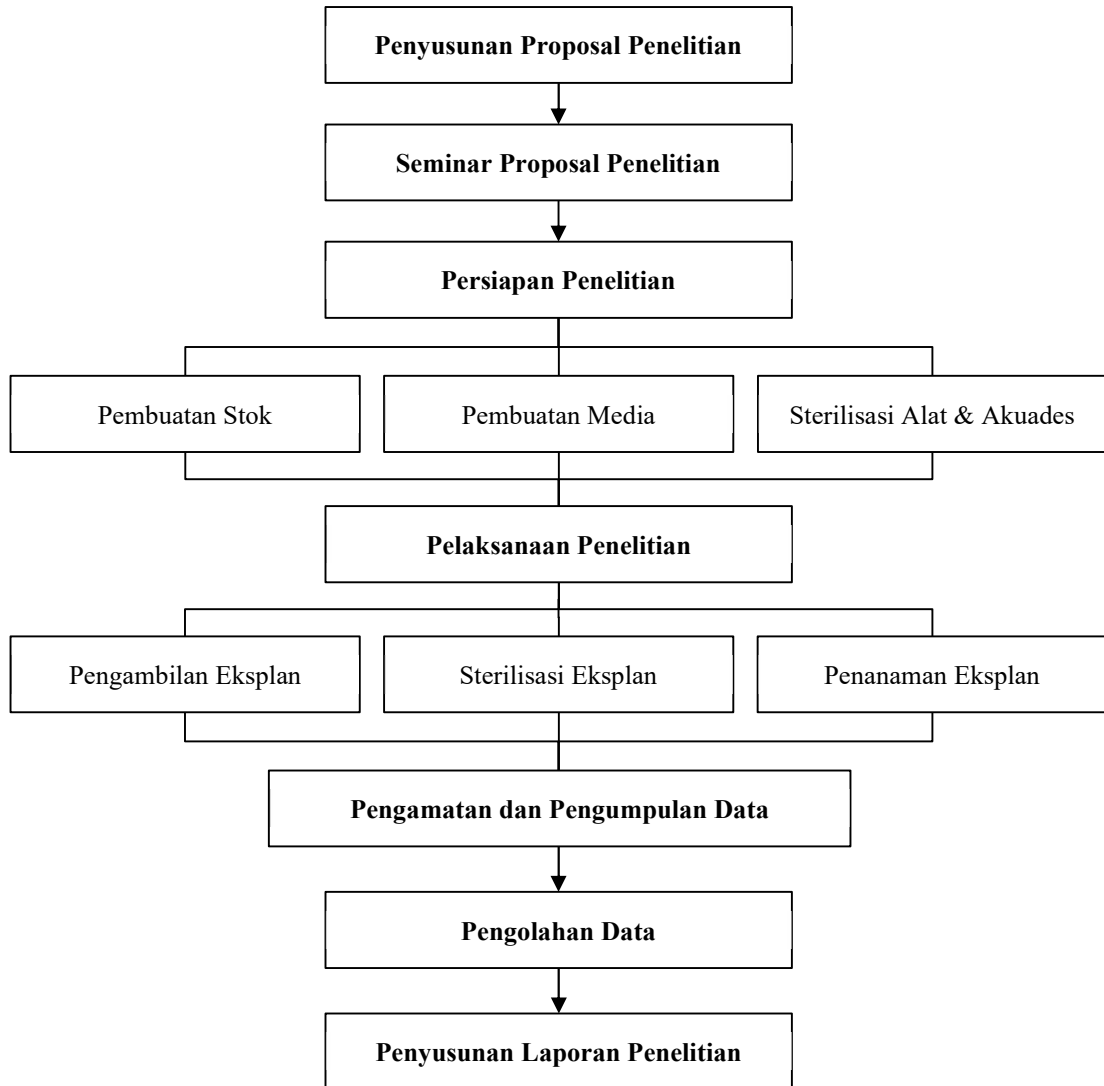
Pengamatan respons eksplan dilakukan setiap dua hari selama satu bulan. Pengamatan dilakukan dengan melihat respons yang diberikan eksplan daun *Nepenthes gymnamphora* berupa perubahan morfologi seperti munculnya lengkungan pada eksplan, munculnya kalus dan tunas atau akar, serta perubahan warna pada eksplan. Setiap respons yang ditunjukkan oleh eksplan akan dihitung dan didokumentasikan. Respons perubahan morfologi dan perubahan warna pada eksplan daun *Nepenthes gymnamphora* dihitung sebagai persentase (%) dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\% \text{ Respons eksplan} = \frac{\text{jumlah eksplan yang merespons}}{\text{jumlah eksplan total}} \times 100\%$$

3.6.4 Analisis Data

Data hasil pengamatan yang didapatkan akan dianalisis secara statistik dengan menggunakan analisis kualitatif. Pertama-tama dilakukan uji normalitas menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov dengan bantuan perangkat lunak *Statistical Program for Social Science* (SPSS). Data yang tidak normal kemudian ditransformasi menggunakan metode arcsine ($Y(s) = \sin^{-1}(Z(s))$). Uji normalitas dan transformasi data dilakukan sebagai syarat uji ANOVA. Selanjutnya dilakukan uji ANOVA Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan bantuan *Microsoft Excel*. Analisis ANOVA RAL ini bertujuan untuk mengevaluasi interaksi dan efek dari 2,4-D dan air kelapa terhadap respons eksplan. Selanjutnya, uji Duncan atau *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) akan dilakukan menggunakan SPSS untuk mengevaluasi perbedaan efek antar konsentrasi perlakuan yang memiliki signifikansi ketika diuji dengan ANOVA RAL.

3.7 Alur Penelitian



Gambar 3.7 Diagram Alur Penelitian