

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis Penelitian dan Desain Penelitian**

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian deskriptif. Penelitian ini dilakukan untuk mendeskripsikan respons eksplan daun dari tanaman *Coix lacryma jobi* L. (hanjeli) yang dikultur pada medium N6 dengan berbagai rentang zat pengatur tumbuh (ZPT) auksin. Auksin yang dipakai dalam penelitian ini adalah *2,4-Dikloropenoksiasetik acid* (2,4-D). Penelitian deskriptif merupakan penelitian yang bertujuan untuk memberikan deskripsi atau gambaran secara sistematis, faktual, dan akurat tentang suatu fenomena atau objek yang sedang diteliti. Metode yang digunakan pada penelitian deskriptif dimulai dengan mengumpulkan data, menganalisis data, dan menginterpretasikannya (Suryana, 2010).

Data pada penelitian ini adalah presentase kemunculan respons eksplan dari rentang konsentrasi 2,4-D. Presentase dihitung dari respons berupa pembesaran jaringan eksplan dan pembentukan kalus. Data yang diambil dalam penelitian ini meliputi data kuantitatif dan kualitatif respons eksplan daun tanaman *C. lacryma jobi* L. yang ditanam pada medium N6 dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D. Rentang konsentrasi 2,4-D yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0 ppm, 4 ppm, 4,5 ppm, 5 ppm, dan 5,5 ppm. Hal ini berdasarkan dari penelitian yang sebelumnya yang telah dilakukan oleh Xiaoli (1991), menunjukkan bahwa eksplan hipokotil dari tanaman *C. lacryma jobi* L. pada konsentrasi 4 mg/L 2,4-D yang ditanam pada medium N6 dapat terinduksi menjadi kalus.

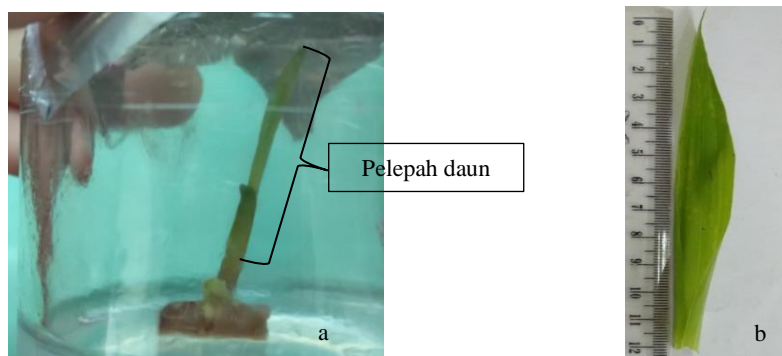
#### **3.2 Waktu Penelitian dan Lokasi Penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan November 2018 hingga Juni 2019. di Laboratorium Kultur Jaringan Botani, FPMIPA, Universitas Pendidikan Indonesia.

#### **3.3 Subjek Penelitian**

Subjek penelitian dalam penelitian ini berupa daun dari tanaman *Coix lacryma jobi* L. liar karena tanaman ini tumbuh di sekitar pesawahan. Tanaman

ini berasal dari desa Cikaramas kabupaten Sumedang provinsi Jawa Barat pada bulan Januari 2019. Bagian daun yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelepah dan helaian daun. Eksplan pelepah daun didapatkan dari tanaman *C. lacryma jobi* L yang masih muda yang tinggi tanamannya berkisar 8-15 cm (Gambar 3.1.a). Eksplan helaian daun diambil dari daun pertama dan daun ke dua dari pucuk yang masih berwarna hijau muda (Gambar 3.1.b).



Gambar 3.1 Eksplan daun tanaman *Coix lacryma Jobi* L  
a. Pelepah Daun (1,54x) , b. Helaian Daun

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Persiapan Penelitian

##### 3.4.1.1 Persiapan Eksplan

Tahap persiapan diawali dengan studi lapangan, yaitu observasi lokasi tanaman *Coix lacryma jobi* L. varietas liar di desa Cikaramas kabupaten Sumedang Jawa Barat untuk mendapatkan tanaman. Biji dari tanaman tersebut ditanam di Kebun Botani Universitas Pendidikan Indonesia. Sebelum dilakukan penanaman, biji direndam di dalam air terlebih dahulu selama 24 jam yang bertujuan untuk terjadinya proses imbibisi pada biji, lalu biji *C. lacryma-jobi* L ditanam di dalam *polybag* yang sudah berisi tanah.

##### 3.4.1.2 Pembuatan Larutan Stok Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

Zat pengatur tumbuh yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2,4-D (Lampiran 2). Untuk membuat larutan stok ZPT 2,4-D 4 ppm (4 mg/l) untuk 10 kali konsentrasi dilakukan dengan dengan melarutkan 0.040 g/l 2,4-D ke dalam gelas kimia yang berisi akuades 80 ml, ditambahkan beberapa tetes NAOH 0,1% yang berfungsi menghomogenkan ZPT dengan air, dan setelah itu diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai larutan homogen. Larutan dipindahkan ke

dalam gelas ukur dan ditambahkan akuades hingga volumenya mencapai 100 ml. Larutan kemudian dituangkan ke dalam gelas kimia serta diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan stok ZPT 2,4-D dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml, lalu ditutup rapat menggunakan *aluminium foil*, plastik, serta karet. Botol diberi label ZPT 2,4-D 4 mg/l. Penggunaan larutan stok ZPT 2,4-D 4 mg/l adalah 10 ml untuk 1 L medium N6.

Untuk membuat larutan stok ZPT 2,4-D 1 ppm (1 mg/l) untuk 10 kali konsentrasi dilakukan dengan melarutkan 0.010 g/l 2,4-D ke dalam gelas kimia yang berisi akuades 80 ml, ditambahkan beberapa tetes NAOH 0,1% yang berfungsi menghomogenkan ZPT dengan air, dan setelah itu diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai larutan homogen. Larutan dipindahkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan akuades hingga volumenya mencapai 100 ml. Larutan kemudian dituangkan ke dalam gelas kimia serta diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan stok ZPT 2,4-D dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml, lalu ditutup rapat menggunakan *aluminium foil*, plastik, serta karet. Botol diberi label ZPT 2,4-D 1 mg/l. Penggunaan larutan stok ZPT 2,4-D 1 mg/l adalah 10 ml untuk 1 L medium N6.

### **3.4.1.3 Pembuatan Larutan Stok Medium**

Medium yang digunakan dalam penelitian ini medium N6 (Lampiran 3) (Chu, 1988). Dalam pembuatan medium, terlebih dahulu dibuat larutan stok yang kemudian dimasukkan ke dalam botol gelap. Botol berisi larutan stok disimpan dalam refrigador. Pembuatannya dilakukan dengan pengelompokan sebagai berikut:

#### **3.4.1.3.1 Larutan stok makronutrien A = 100 ml (10 kali konsentrasi)**

Pembuatan larutan stok makronutrien A 100 ml untuk 10 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang 28,3 gram  $\text{KNO}_3$ . Zat ini dimasukkan kedalam *beaker glass* yang berisi akuades kurang lebih 90 ml, dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai larut. Larutan kemudian ditambah akuades hingga 100 ml dalam gelas ukur. Larutan ini dipindahkan kedalam *beaker glass* dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah larut, larutan dipindahkan kedalam botol gelap ukuran 250ml dan ditutup rapat. Botol diberi label larutan stok

makronutrien A N6 dan tanggal pembuatan larutan stok tersebut. Penggunaan untuk membuat 1 L medium N6 adalah 10 ml.

#### **3.4.1.3.2 Larutan stok makronutrien B = 100 ml (10 kali konsentrasi)**

Pembuatan larutan stok makronutrien B 100 ml untuk 10 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang 4,63 gram  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Zat ini dimasukkan kedalam *beaker glass* yang berisi akuades kurang lebih 90 ml, sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai larut. Larutan kemudian ditambah akuades hingga 100 ml dalam gelas ukur. Larutan ini dipindahkan kedalam *beaker glass* dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah larut, larutan dipindahkan kedalam botol gelap ukuran 250ml dan ditutup rapat. Botol diberi label larutan stok makronutrien B N6 dan tanggal pembuatan larutan stok tersebut. Penggunaan untuk membuat 1 L medium N6 adalah 10 ml.

#### **3.4.1.3.3 Larutan stok makronutrien C = 100 ml (10 kali konsentrasi)**

Pembuatan larutan stok makronutrien C 100 ml untuk 10 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang 1,904 gram  $\text{MgSO}_4$ . Zat ini dimasukkan kedalam *beaker glass* yang berisi akuades kurang lebih 90 ml, sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai larut. Larutan kemudian ditambah akuades hingga 100 ml dalam gelas ukur. Larutan ini dipindahkan kedalam *beaker glass* dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah larut, larutan dipindahkan kedalam botol gelap ukuran 250ml dan ditutup rapat. Botol diberi label larutan stok makronutrien C N6 dan tanggal pembuatan larutan stok tersebut. Penggunaan untuk membuat 1 L medium N6 adalah 10 ml.

#### **3.4.1.3.4 Larutan stok makronutrien D = 100 ml (10 kali konsentrasi)**

Pembuatan larutan stok makronutrien D 100 ml untuk 10 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang 4 gram  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Zat ini dimasukkan kedalam *beaker glass* yang berisi akuades kurang lebih 90 ml, sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai larut. Larutan kemudian ditambah akuades hingga 100 ml dalam gelas ukur. Larutan ini dipindahkan kedalam *beaker glass* dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah larut, larutan dipindahkan kedalam botol gelap ukuran 250ml dan ditutup rapat. Botol diberi label larutan stok

makronutrien D N6 dan tanggal pembuatan larutan stok tersebut. Penggunaan untuk membuat 1 L medium N6 adalah 10 ml.

#### **3.4.1.3.5 Larutan stok makronutrien E = 100 ml (10 kali konsentrasi)**

Pembuatan larutan stok makronutrien E 100 ml untuk 10 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang 1,254 gram  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Zat ini dimasukkan kedalam *beaker glass* yang berisi akuades kurang lebih 90 ml, sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai larut. Larutan kemudian ditambah akuades hingga 100 ml dalam gelas ukur. Larutan ini dipindahkan kedalam *beaker glass* dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah larut, larutan dipindahkan kedalam botol gelap ukuran 250ml dan ditutup rapat. Botol diberi label larutan stok makronutrien E N6 dan tanggal pembuatan larutan stok tersebut. Penggunaan untuk membuat 1 L medium N6 adalah 10 ml.

#### **3.4.1.3.6 Larutan stok zat besi (Fe) = 100 ml (10 kali konsentrasi)**

Larutan stok zat besi terdiri dari 0,278 gram  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan 0,373 gram NaEDTA untuk 1 L medium N6. Senyawa NaEDTA terlebih dahulu dilarutkan dalam 85 ml akuades pada *beaker glass* diatas *hot plate* dengan suhu kisaran 40-60°C. Setelah homogen larutan dibiarkan kembali pada suhu kamar, ditambahkan  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan akuades hingga 100 ml dalam gelas ukur. Setelah larut, larutan dipindahkan kedalam botol gelap ukuran 250ml dan ditutup rapat. Botol diberi label larutan stok zat besi N6 dan tanggal pembuatan larutan stok tersebut. Penggunaan untuk membuat 1 L medium N6 adalah 10 ml.

#### **3.4.1.3.7 Larutan stok mikronutrien = 100 ml (10 kali konsentrasi)**

Mikronutrien dibuat stok 100 ml untuk 10 kali konsentrasi dibuat dengan melarutkan 0,016 gram  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,015 gram  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,033 gram  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , dan 0,008 gram KI dalam *beaker glass* yang berisi akuades 70 ml. Setiap pemasukan bahan, larutan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan kemudian ditambah akuades hingga 100 ml dalam gelas ukur dan dihomogenkan kembali. Larutan disimpan dalam botol gelap berukuran 250 ml dan ditutup rapat. Botol diberi label larutan stok mikronutrien N6 dan tanggal pembuatan larutan stok tersebut. Penggunaan larutan stok mikronutrien untuk 1 L medium N6 adalah 10 ml.

#### **3.4.1.3.8 Larutan stok vitamin = 100 ml (50 kali konsentrasi)**

Larutan stok vitamin terdiri dari 0,025 gram Asam Nikotinic, 0,025 Pyridoxin-HCl, 0,05 gram Thiamin-HCl dan 0,10 gram L-Glycin. Untuk membuat stok 100 ml dengan 50 kali kepekatan vitamin terlebih dahulu dilarutkan dalam 70 ml akuades didalam *beaker glass*, Setiap pemasukan bahan, larutan langsung diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan kemudian tambah akuades hingga 100 ml dan dihomogenkan kembali dalam gelas ukur kemudian disimpan dalam botol gelap berukuran 250 ml dan ditutup rapat. Botol diberi label larutan stok vitamin N6 dan tanggal pembuatan larutan stok tersebut. Penggunaan larutan stok vitamin untuk 1 L medium N6 adalah 2 ml.

#### **3.4.1.3 Pembuatan Medium**

##### **3.4.1.3.1 Pembuatan Medium N6**

Pembuatan 1 L medium untuk 5 konsentrasi dilakukan dengan masing-masing larutan stok diambil sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan dan dicampur dalam *beaker glass* yang telah terlebih dahulu diisi dengan akuades. Setelah tercampur merata, ditambahkan 30 g/L sukrosa dan ditambah akuades menjadi 950 ml. Medium ini dibagi kedalam lima *beaker glass* dengan masing-masing 190 ml. Kemudian ZPT ditambahkan ke dalam setiap *beaker glass* sesuai dengan kombinasi yang akan diperlakukan, medium ditambah akuades hingga mencapai volume sekitar 195 ml dan pH medium dibuat menjadi  $5,7 \pm 5,9$  dengan penambahan 0,1 N NaOH dan/atau 0,1 N HCl. Medium ditambahkan akuades hingga 200 ml. Larutan ditambahkan agar-agar sebanyak 1,6g/200ml dan dipanaskan sehingga seluruh agar terlarut. Masing-masing kombinasi sebanyak 10 ml media dituangkan ke dalam botol kultur. Botol ditutup dengan *aluminium foil* dan plastik anti panas, lalu diikat menggunakan karet. Botol diberi label dan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  pada tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Medium kemudian disimpan diruangan yang bersih dan pada suhu kamar.

##### **3.4.1.4 Sterilisasi Alat**

Alat yang digunakan (Lampiran 1) dalam pembuatan medium dan alat untuk sterilisasi eksplan di dalam laminar seperti botol medium, batang pengaduk, *magnetic stirrer*, *tips* mikropipet, *beaker glass*, gelas ukur disterilisasi terlebih

dahulu di dalam autoklaf dengan suhu 121 °C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Alat yang sudah disterilisasi kemudian disimpan pada ruang kultur untuk dipergunakan dalam pembuatan medium dan sterilisasi eksplan di dalam laminar.

#### 3.4.1.5 Sterilisasi *Laminar Air Flow*

Sebelum dilakukan sterilisasi dan penanaman eksplan didalam *Laminar Air Flow*, laminar harus dibersihkan terlebih dahulu menggunakan larutan natrium hipoklorit (Bayclin) serta menggunakan alkohol 70%. Alat-alat yang akan digunakan seperti alat untuk sterilisasi eksplan didalam laminar, alat penanaman, serta medium N6 dimasukan kedalam laminar setelah disemprot terlebih dahulu menggunakan alkohol 70%. Kaca laminar ditutup dengan kain gelap kemudian disterilkan dengan sinar *Ultra-violet* selama satu jam. Setelah *Laminar Air Flow* disterilisasi menggunakan *Ultra-violet* selanjutnya *blower* yang terdapat didalam laminar dinyalakan yang bertujuan untuk mengeluarkan udara yang terdapat didalam laminar.

#### 3.4.1.6 Penanaman

##### 3.4.1.6.1 Pengambilan Eksplan

Eksplan yang digunakan merupakan potongan jaringan pelepah dan helaian daun dari tanaman *Coix lacryma jobi* L. Potongan pelepah daun diambil dari daun yang masih menggulung dari tanaman *C. lacryma jobi* L. yang tingginya sekitar 8-15 cm (Gambar 3.2). Potongan helaian daun diperoleh dari daun pertama dan daun ke dua yang masih berwarna hijau muda (Gambar 3.2). Eksplan pelepah daun dan helaian daun diperoleh dari tanaman *C. lacryma jobi* L yang ditanam di Kebun Botani Universitas Pendidikan Indonesia (UPI).



Gambar 3.2 Pelepah dan helaian daun yang digunakan

### 3.4.1.6.2 Sterilisasi Eksplan

Dalam teknik kultur jaringan terdapat dua tahap sterilisasi eksplan yaitu sterilisasi eksplan di luar laminar dan sterilisasi eksplan di dalam laminar. Tahapan pertama yang dilakukan untuk sterilisasi eksplan di luar laminar adalah pelepah daun yang masih menggulung dan helaian daun dibersihkan, kemudian eksplan pelepah daun dan helaian daun dipotong menjadi dua potong atau sampai tiga bagian menggunakan gunting. Eksplan pelepah daun dan helaian daun yang sudah bersih dimasukan kedalam cawan Petri untuk dibersihkan menggunakan air mengalir selama 30 menit (Gambar 3.3).



Gambar 3.3 Eksplan yang sedang dibersihkan di air mengalir

Eksplan dimasukan ke dalam *beaker glass* ukuran 100 ml yang sudah berisi detergen 2% (Gambar 3.4) untuk direndam selama 10 menit kemudian eksplan dibilas menggunakan air mengalir sebanyak 3x sampai busa hilang.



Gambar 3.4 Eksplan direndam dalam detergen 2 %



Eksplan disterilisasi didalam *laminar air flow*. Pelepah daun dan helaian daun *Coix lacryma jobi* L. direndam dalam fungisida benstar dan bakterisida agrep 0,2 % masing-masing selama 10 menit (Gambar 3.5), kemudian dibilas menggunakan akuades steril sampai eksplan bersih dari fungisida benstar dan bakterisida agrep.



Gambar 3.5 Eksplan pelepah dan helaian daun disterilisasi menggunakan Benstar dan Agrep

Eksplan direndam dalam alkohol 70% selama tiga menit dan setelah itu dibilas menggunakan akuades steril sebanyak satu kali. Selanjutnya eksplan direndam kedalam *beaker glass* yang sudah berisi natrium Hipoklorit (Bayclin) 20% dan kemudian diberi tween sebanyak dua tetes lalu direndam selama tujuh sampai sepuluh menit (Gambar 3.6). Bilas menggunakan akuades steril sampai eksplan bersih dari cairan natrium Hipoklorit dan Tween.



Gambar 3.6 Eksplan pelepah dan helaian daun disterilisasi dengan bayclin 20% dan Tween di dalam *Laminar Air Flow*

### 3.4.1.6.3 Penanaman Eksplan dan Penyimpanan Botol Kultur

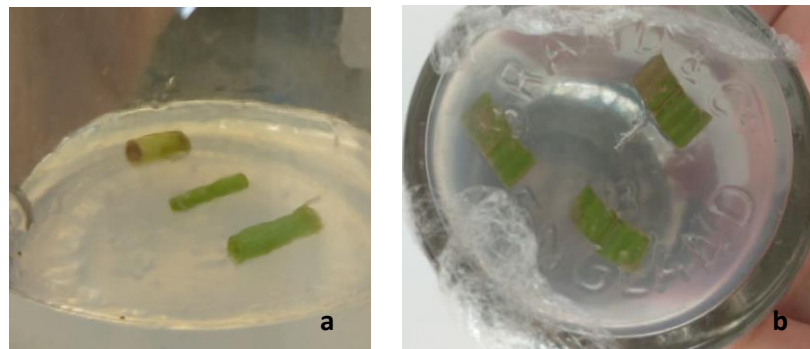
Eksplan pelepah daun dipotong menggunakan *steril blade* sampai berukuran 1 cm sedangkan untuk helaian daun dipotong sampai berukuran sekitar 2 x 1 cm.

Fridayova Meidiana, 2019

**RESPONS IN VITRO EKSPLAN DAUN HANJELI YANG DIKULTUR PADA MEDIUM N6 DENGAN PENAMBAHAN ZAT PENGATUR TUMBUH 2,4-D**

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

Sebelum ditanam didalam medium, eksplan dilukai terlebih dahulu dibagian abaksial dibagian ibu tulang daunnya. Setelah itu, eksplan ditanam pada medium kultur yang berisi N6 padat. Pada setiap botol kultur masing-masing berisi eksplan sebanyak 2-3 eksplan (Gambar 3.7).



Gambar 3.7 Botol kultur yang berisi tiga eksplan  
a. Eksplan pelepah daun (1, 54 x), b. Eksplan helaian daun (1,54 x)

Eksplan pelepah daun dan helaian daun yang telah ditanam didalam botol-botol kultur disimpan ditempat gelap, disimpan pada rak yang berada di ruang kultur yang sebelumnya telah dibersihkan menggunakan alkohol 70%, dan suhu yang digunakan didalam ruang kultur adalah 25°C.

### 3.4.2 Teknik Pengumpulan Data dan Analisis Data

Eksplan diamati setiap tiga hari sekali selama dua bulan. Setiap respons yang terjadi seperti pembesaran jaringan eksplan dan pembentukan kalus dicatat serta didokumentasikan. Respons yang terjadi terhadap eksplan seperti pembesaran jaringan eksplan dan pembentukan kalus dihitung persentasinya dari setiap kombinasi zat pengatur tumbuh.

#### 3.4.2.1 Presentase eksplan yang mengalami pembesaran jaringan

Eksplan yang mengalami pembesaran jaringan ditandai dengan warna eksplan yang masih hijau segar, terjadinya perbedaan ukuran eksplan dari awal mengkultur, dan tidak terkontaminasi. Respons pembesaran jaringan, dihitung berdasarkan Azizi dkk. (2017):

$$\% \text{ eksplan yang membesar} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang membesar}}{\text{Jumlah eksplan yang ditanam}} \times 100\%$$

### 3.4.2.2 Presentase eksplan yang membentuk kalus

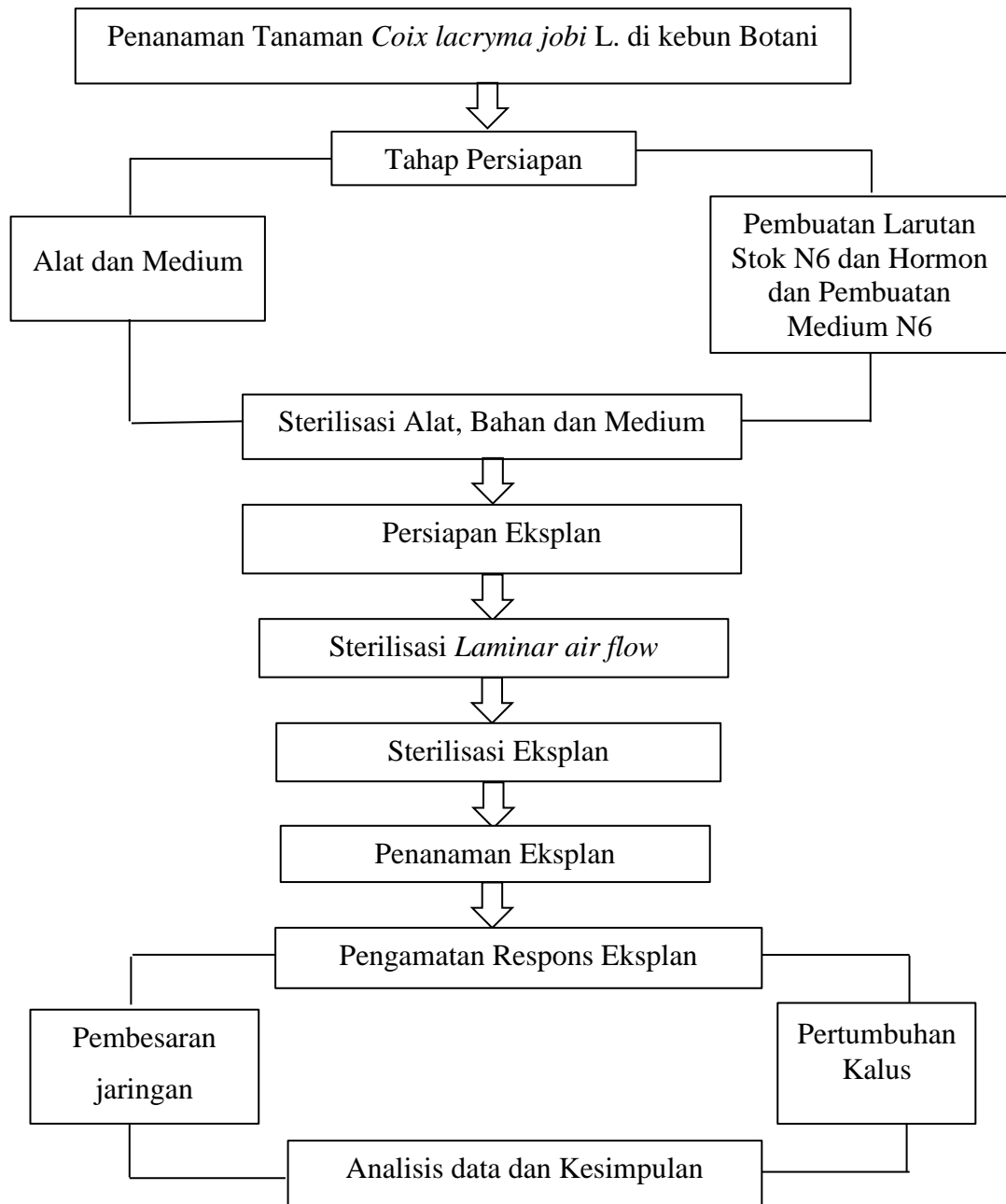
Kalus merupakan sekumpulan sel yang belum terdiferensiasi, bewarna putih atau putih kekuningan yang terbentuk pada salah satu atau seluruh permukaan. Pembentukan kalus, dihitung berdasarkan Azizi dkk. (2017):

$$\% \text{ eksplan yang hidup} = \frac{\text{Jumlah eksplan berkalus}}{\text{Jumlah eksplan yang ditanam}} \times 100\%$$

### 3.5 Alur

#### 3.5.1 Alur Kerja

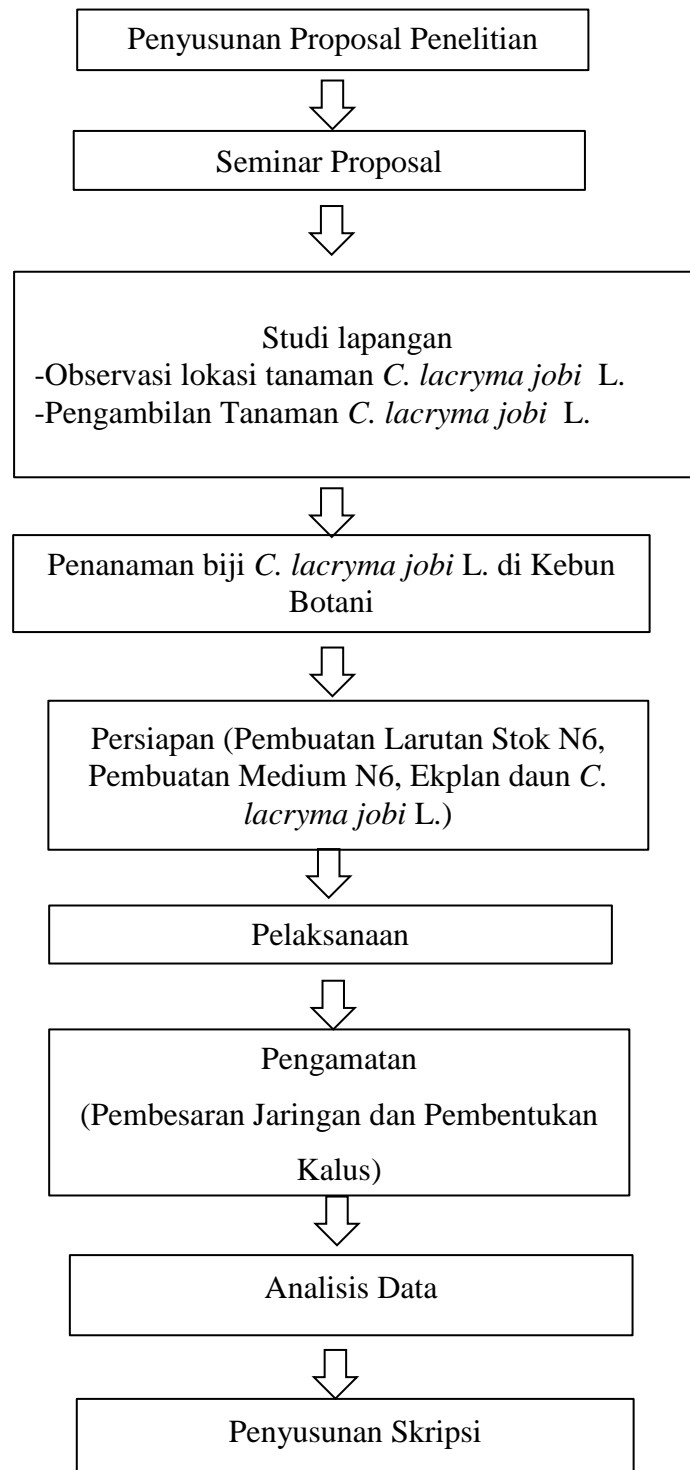
Alur kerja dari penelitian respons *in vitro* eksplan daun hanjeli (*Coix lacryma jobi* L.) yang dikultur pada medium N6 dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D dapat dilihat pada Gambar 3.8.



Gambar 3. 8 Alur Kerja

### 3.5.2 Alur Penelitian

Alur penelitian dari penelitian respons *in vitro* eksplan daun hanjeli (*Coix lacryma jobi* L.) yang dikultur pada medium N6 dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D dapat dilihat pada Gambar 3.9.



Gambar 3. 9 Alur Penelitian