

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian dan Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk melihat respons eksplan daun dan pucuk yang ditanam dalam medium MS yang dilengkapi dengan kombinasi zat pengatur tumbuh (ZPT) *furfuryl amino purine* (kinetin), *naphtalene acetic acid* (NAA), dan *2,4-dichlorophenoxy acetic acid* (2,4-D). Data yang diambil dalam penelitian ini berupa data kualitatif pada eksplan daun dan pucuk hanjeli yang dikultur secara *in vitro*.

Penelitian ini dilakukan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Yong, dkk. (2012) bahwa medium MS dengan penambahan kombinasi ZPT kinetin, NAA, dan 2,4-D dapat menginduksi kalus embriogenik pada eksplan akar. Penelitian Ainun (2019) bahwa medium MS dengan penambahan kombinasi ZPT Kinetin, NAA, dan 2,4-D dapat menginduksi tunas adventif pada eksplan batang hanjeli liar.

Desain penelitian menggunakan kombinasi ZPT sebanyak delapan kombinasi (Tabel 3.1). Untuk pengulangan pada setiap jenis tahapan mengacu kepada rumus Federer, yaitu $(t - 1) (r - 1) \geq 15$ dimana t adalah perlakuan dan r adalah replikasi atau jumlah sampel (Muntaha, dkk., 2015). Pengulangan untuk mendapatkan respons pada eksplan daun dan pucuk adalah sebagai berikut:

$$\begin{aligned} (t - 1) (r - 1) &\geq 15 \\ (8 - 1) (r - 1) &\geq 15 \\ 7 (r - 1) &\geq 15 \\ 7r - 7 &\geq 15 \\ 7r &\geq 22 \\ r &\geq 3,14 \approx 4 \end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan menggunakan rumus Federer maka pengulangan minimal yang dilakukan adalah 4 kali pada setiap kombinasi perlakuan.

Tabel 3.1
Kombinasi ZPT yang Digunakan

No	2,4-D	Kinetin	NAA	Kode Kombinasi ZPT
1	0,3 mg/L	1,5 mg/L	0,8 mg/L	A
2	0,3 mg/L	1,5 mg/L	1,0 mg/L	B
3	0,3 mg/L	2,0 mg/L	0,8 mg/L	C
4	0,3 mg/L	2,0 mg/L	1,0 mg/L	D
5	0,4 mg/L	1,5 mg/L	0,8 mg/L	E
6	0,4 mg/L	1,5 mg/L	1,0 mg/L	F
7	0,4 mg/L	2,0 mg/L	0,8 mg/L	G
8	0,4 mg/L	2,0 mg/L	1,0 mg/L	H

3.2 Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan adalah daun dan pucuk hanjeli yang berusia tiga minggu yang benihnya berasal dari Waluran Sukabumi kemudian ditanam dalam media tanah.

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari 2020 hingga Juni 2020, bertempat di Laboratorium Kultur Jaringan Botani, FPMIPA, Universitas Pendidikan Indonesia

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Tahap Persiapan

3.4.1.1 Persiapan Eksplan

Eksplan yang akan digunakan berasal dari biji hanjeli (Gambar 3.1) yang diambil dari Waluran Sukabumi yang berasal dari Bapak Asep pendiri Desa Wisata Hanjeli, kemudian biji hanjeli direndam selama 24 jam (Gambar 3.2) agar terjadi proses imbibisi, lalu ditanam sampai berusia 3 minggu (Gambar 3.3).



Gambar 3.1 Biji Hanjeli yang Berasal dari Waluran



Gambar 3.2 Perendaman Biji Hanjeli



Gambar 3.3. Hanjeli Berusia 3 Minggu

3.4.1.2 Pembuatan Medium

34121 Pembuatan Larutan Stok

Medium yang digunakan untuk kultur jaringan tanaman hanjeli adalah medium *Murashige dan Skoog* (MS) (Yong, dkk., 2012). Pembuatan medium diawali dengan pembuatan larutan stok. Larutan stok yang dibuat terdiri dari makronutrien, mikronutrien, zat besi, vitamin, dan myo-inositol. Larutan stok dibuat bertujuan untuk mempermudah dalam penimbangan karena biasanya zat yang digunakan berjumlah sedikit sehingga sulit untuk ditimbang. Kemudahan lain yang didapatkan ketika membuat larutan stok adalah tidak dibutuhkan banyak tempat karena zat yang akan digunakan dipekatkan menjadi volume yang lebih kecil, contohnya saat membuat larutan stok myo-inositol dibutuhkan 0,1 g/L. Myo-inositol jika dibuat dalam 10 kali konsentrasi, maka dibutuhkan 1 g/ 10 L. Sepuluh liter air akan membutuhkan banyak sekali ruangan, sehingga larutan dibuat stok dan dipekatkan menjadi 100 ml. Penggunaan larutan stok myo-inositol dari pemekatan tersebut adalah 10 ml untuk 1 L medium MS.

Larutan stok yang sudah dibuat selanjutnya disimpan dalam wadah gelap, lalu ditutup rapat menggunakan plastik, karet dan *aluminium foil* dan disimpan di dalam lemari es (Gambar 3. 4). Larutan stok makronutrien terdiri dari NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dan KH_2PO_4 . Masing-masing makronutrien dibuat pada botol stok yang berbeda. Larutan stok mikronutrien terdiri dari KI, H_3BO_3 ,

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, dan $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Semua larutan mikronutrien disatukan dalam satu botol. Larutan stok zat besi terdiri dari Na_2EDTA dan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ yang dibuat dalam satu botol stok. Stok selanjutnya berisi vitamin yang terdiri dari Tiamina HCl, Asam Nikotinat, Piridoksina HCl, dan Glisin. Untuk myo-inositol dibuat dalam satu botol stok. Adapun takaran pembuatan larutan stok medium terdapat pada Tabel 3.2



Gambar 3.4 Botol Gelap yang Berisi Larutan Stok yang Disimpan Dalam Lemari es

34122 Pembuatan Stok Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

Stok ZPT yang dibuat sesuai dengan yang dibutuhkan, yaitu kinetin, NAA, dan 2,4-D. Larutan stok ZPT dibuat secara terpisah kemudian dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml, lalu ditutup rapat menggunakan *aluminium foil*, plastik, serta karet. Botol diberi label pada masing-masing botol stok ZPT. Adapun takaran pembuatan larutan stok ZPT terdapat pada Tabel 3.3

34123 Pembuatan Medium untuk Eksplan Daun dan Pucuk Hanjeli

Pembuatan satu liter medium untuk 8 kombinasi dilakukan dengan masing-masing larutan stok (Makronutrien, mikronutrien, zat besi, vitamin, myo-inositol) diambil sesuai dengan takaran yang telah ditentukan dan dicampurkan ke dalam gelas kimia serta diaduk menggunakan *magnetic stirrer* (Gambar 3.5). Setelah larutan tercampur secara homogen, ditambahkan 30 g/L sukrosa dan ditambah akuades sampai volume akhir mencapai 400 mL. Medium MS ini dibagi ke dalam 8 gelas kimia dengan volume masing-masing sebanyak 50 mL. Setiap gelas kimia

Tabel 3.2
Takaran Pembuatan Larutan Stok Medium

Komponen Kimia	Pemakaian					
	Dosis (mg/L)	Stok untuk	Dosis menjadi (mg)	Dipekatkan dalam	Nama stok	Kebutuhan
Makronutrien						
NH ₄ NO ₃	1.650	10 L	16.500	100 mL	I	10 mL/ L
KNO ₃	1.900	10 L	19.000	100 mL	II	10 mL/ L
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440	10 L	4.400	100 mL	III	10 mL/ L
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370	10 L	3.700	100 mL	IV	10 mL/ L
KH ₂ PO ₄	170	10 L	1.700	100 mL	V	10 mL/ L
Mikronutrien						
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3	1000 L	22.300	100 mL	VI	0,1 mL/ L
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,6		8.600			
H ₃ BO ₃	6,2		6.200			
KI	0,83		830			
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0,25		250			
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025		25			
Co ₂ Cl . 6H ₂ O	0,025		25			
Zat Besi						
Na ₂ EDTA	37	10 L	370	100 mL	VII	10 mL/ L
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27		270			
Vitamin						
<i>Glycine</i>	2	100 L	200	100 mL	Vitamin	1 mL/ L
<i>Nicotine Acid</i>	0,5		50			
<i>Pyrodoxine HCl</i>	0,5		50			
<i>Thyamine HCl</i>	0,1		10			
Myo-inositol	100	10 L	1.000	100 mL	Myo-inositol	10 mL/ L
Sukrosa	30.000	-	-	-	-	-
Agar	7.000	-	-	-	-	-

Tabel 3.3
Takaran Larutan Stok Zat Pengatur Tumbuh

Komponen Kimia	Pemakaian					
	Dosis (mg/L)	Stok untuk	Dosis menjadi (mg)	Dipekatkan dalam	Nama stok	Kebutuhan
2,4-D (0,1 mg/L)	0,1	60 L	6	600 mL	2,4-D (0,1 mg/L)	10 mL = 0,1 mg/L,
NAA (0,2 mg/L)	0,2	30 L	6	300 mL	NAA (0,2 mg/L)	10 mL = 0,2 mg/L,
Kinetin (0,5 mg/L)	0,5	16 L	8	160 mL	Kinetin (0,5 mg/L)	10 mL = 0,5 mg/L,

yang berisi 50 mL larutan ditambahkan zat pengatur tumbuh sesuai dengan kombinasi yang telah ditentukan. Stok ZPT yang dibuat untuk 1 L medium, namun pada pembuatan medium ini untuk 125 mL, sehingga volume ZPT yang dimasukkan kedalam medium harus disesuaikan dengan sesuai perbandingan larutan yang diperlukan. Setelah semua ZPT dimasukkan ke dalam medium, dilanjutkan dengan pengukuran pH medium dan dibuat menjadi sekitar 5,7-5,9 dengan penambahan NaOH dan/atau HCl. Setiap medium ditambah dengan akuades hingga volume akhir mencapai 125 mL. Larutan medium dimasukkan agar-agar sebanyak 0,875 g/125 mL. Selanjutnya medium dipanaskan dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* (Gambar 3.5), sampai agar-agar larut dan homogen. Masing-masing kombinasi sebanyak 10 mL dituangkan ke dalam botol kultur. Botol kultur ditutup menggunakan *aluminium foil*, plastik, karet, serta diberi label (Gambar 3.6)



Gambar 3.5 Pencampuran Larutan Menggunakan Magnetic Stirrer



Gambar 3.6 Botol Kultur yang Berisi Medium Ditutup Menggunakan Aluminium Foil, Plastik, Karet, serta Diberi Label.

3.4.1.3 Sterilisasi

34131 Sterilisasi Ruangan Kultur

Sterilisasi ruang kultur dengan kain pel yang dibasahi dengan desinfektan kemudian setiap sudut ruangan disemprot formalin 4%. Sterilisasi ini mutlak dilakukan menjelang ruangan akan digunakan (Gambar 3.7).



Gambar 3.7 Sterilisasi Ruang Kultur

34132 Sterilisasi Alat

Alat yang digunakan dalam pembuatan medium seperti botol kultur, *tips mikropipet*, *aluminium foil*, gelas piala, pinset, cawan petri, kertas saring, *scalpel*, dan gelas kimia dibungkus menggunakan kertas dan plastik, disterilkan menggunakan autoklaf dengan tekanan 1,5 atm dalam suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, alat-alat yang sudah disterilisasi kemudian disimpan ditempat yang bersih untuk digunakan dalam pembuatan medium dan penanaman dalam *Laminar Air Flow*.

34133 Sterilisasi Air Destilasi (Akuades)

Akuades yang digunakan untuk sterilisasi eksplan dan keperluan lain dalam kultur jaringan disterilkan menggunakan autoklaf dengan tekanan 1,5 atm dalam suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, akuades yang sudah disterilisasi kemudian disimpan ditempat yang bersih (Gambar 3.8).



Gambar 3.8 Sterilisasi akuades dan Alat yang Digunakan dalam Kultur Jaringan
34134 Sterilisasi Medium

Botol kultur berisi medium yang telah diberi label disterilisasi menggunakan autoklaf dengan tekanan 1,5 atm dalam suhu 121°C selama 15 menit (Gambar 3.9). Medium kemudian disimpan ditempat yang bersih minimal 3 hari sampai digunakan .



Gambar 3.9 Sterilisasi Medium

34135 Sterilisasi *Laminar Air Flow*

Laminar Air Flow disterilisasi terlebih dahulu sebelum penanaman dengan cara dibersihkan menggunakan alkohol 70%, disinari oleh *Ultra Violet* (UV) selama 1 jam, dan dialirkan udara selama 1 jam.

34136 Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan dibagi menjadi 2 tahap. Tahapan pertama dilakukan saat sterilisasi eksplan di luar laminar dan tahap kedua disterilisasi di dalam laminar. Pertama, eksplan daun dan pucuk diambil, kemudian eksplan daun dipotong

menjadi dua potong atau sampai tiga bagian menggunakan gunting (Gambar 3.10, 3.11). Eksplan daun dan pucuk dimasukkan kedalam wadah untuk dibersihkan menggunakan air mengalir selama 30 menit (Gambar 3.12). Eksplan dimasukkan ke dalam *beaker glass* ukuran 100 ml yang sudah berisi detergen 2% untuk direndam selama 10 menit (Gambar 3.13). Eksplan dibilas menggunakan air mengalir sampai busa hilang dan disterilisasi di dalam laminar. Eksplan daun dan pucuk hanjeli direndam dalam fungisida benstar 0,2 % selama 10 menit (Gambar 3.14) dan dibilas menggunakan akuades steril sampai eksplan bersih dari fungisida (Gambar 3.15). Eksplan kemudian direndam dalam bakterisida agrep (Gambar 3.16) selama 10 menit dan dibilas menggunakan akuades steril sampai bersih. Selanjutnya eksplan direndam dalam alkohol 70% (Gambar 3.17) selama tiga menit dan setelah itu dibilas menggunakan akuades steril sebanyak satu kali. Eksplan direndam dalam natrium Hipoklorit (Bayclin) 20% dan diberi *tween* sebanyak dua tetes lalu direndam selama tujuh sampai sepuluh menit (Gambar 3.18). Tahap akhir eksplan dibilas menggunakan akuades steril sampai eksplan bersih dari cairan natrium hipoklorit dan *tween* (Meidiana, 2019).



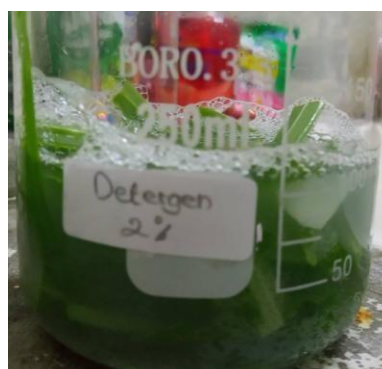
Gambar 3.10 Pengambilan Eksplan Daun



Gambar 3.11 Eksplan Pucuk



Gambar 3.12 Eksplan Dicuci dengan Air Mengalir



Gambar 3.13 Perendaman Eksplan dengan Detergen 2%



Gambar 3.14 Perendaman Eksplan dengan Fungisida Benstar 0,2%



Gambar 3.15 Pembilasan Eksplan dengan Akuades Steril



Gambar 3.16 Perendaman Eksplan dengan Bakterisida Agrep 0,2%



Gambar 3.17 Perendaman Eksplan dengan Alkohol 70%



Gambar 3.18 Perendaman Eksplan dengan Natrium Hipoklorit dan *Tween*

3.4.2 Tahap Penanaman

Eksplan daun dan pucuk dipotong menggunakan *steril blade* dengan ukuran 0,5 x 0,5 mm sampai 1 x 1 cm. Sebelum ditanam, eksplan dilukai terlebih dahulu dibagian abaksial (ibu tulang daun). Setelah itu, eksplan ditanam pada medium perlakuan. Setiap botol kultur masing-masing berisi tiga eksplan kemudian disimpan di ruang gelap (Gambar 3.19). Botol 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.



Gambar 3.19 Rak Kultur di Ruang Kultur

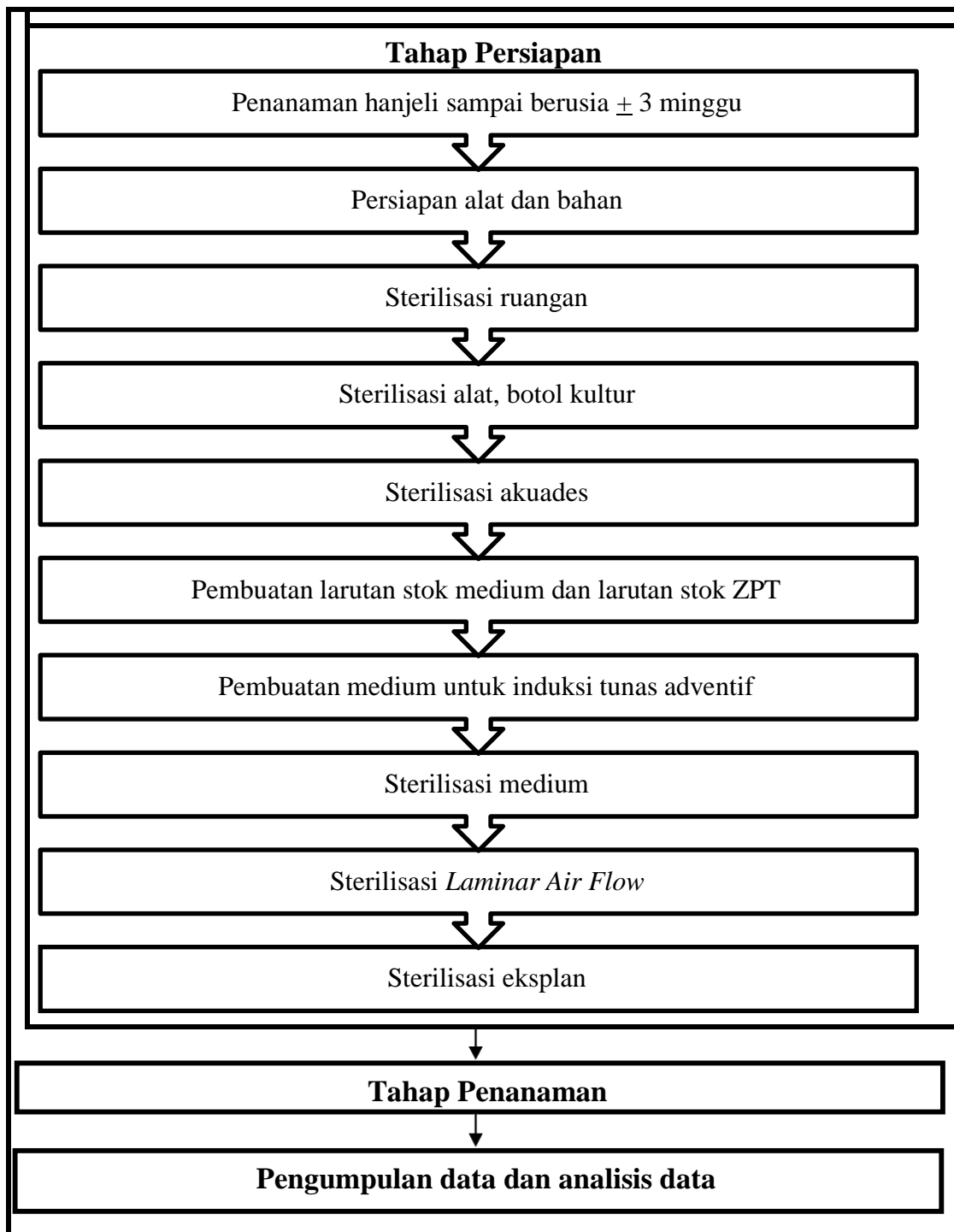
3.5 Teknik Pengumpulan Data dan Analisis Data

Setiap respons pada masing-masing kombinasi dicatat dan didokumentasikan serta dihitung persentasenya dari setiap kombinasi zat pengatur tumbuh dan tiap pengulangan. Respons eksplan dihitung berdasarkan perhitungan persentase pada penelitian Azizi, dkk. (2017).

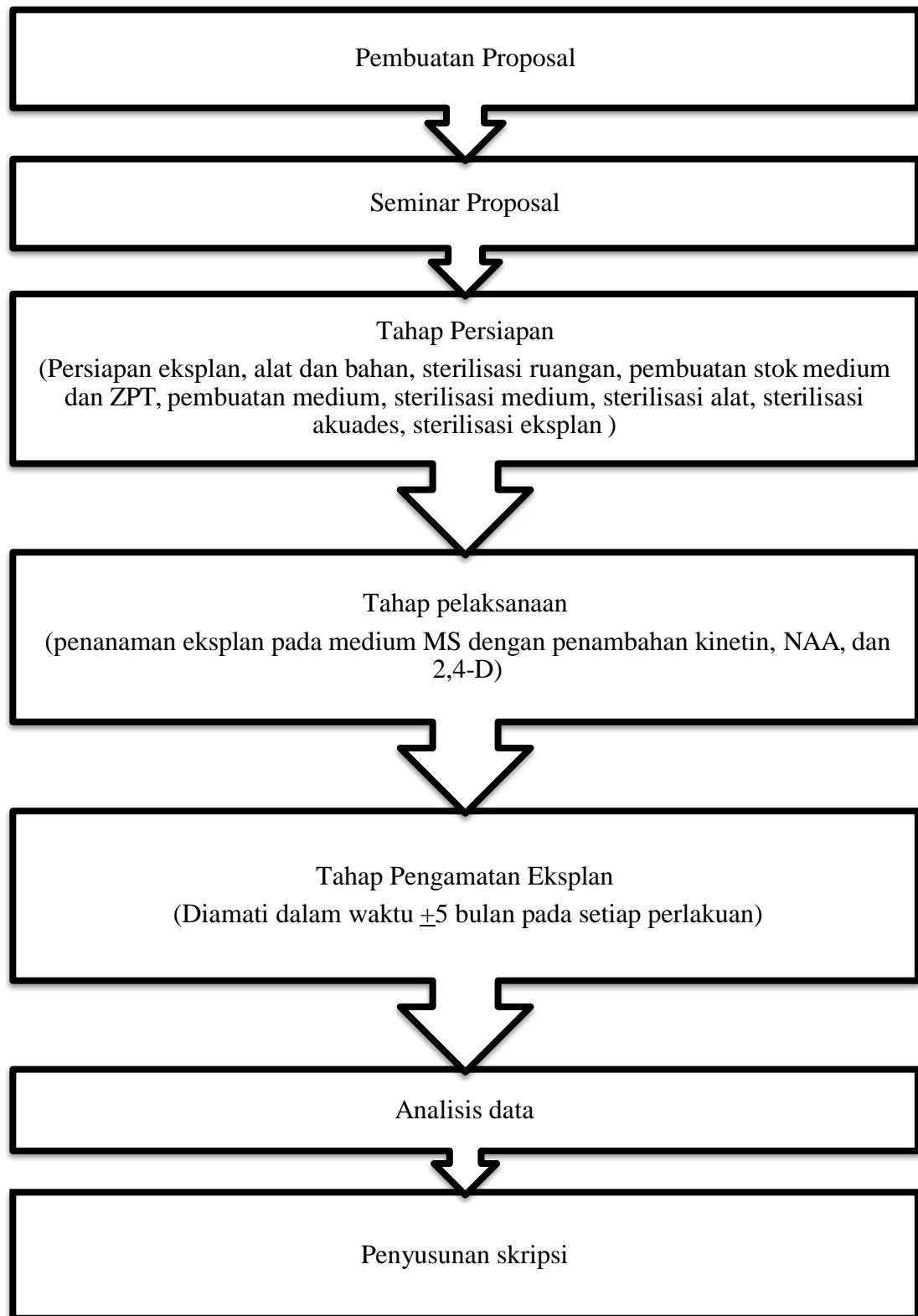
$$\text{Persentase} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang mengalami respons tertentu}}{\text{Jumlah eksplan dalam satu botol}} \times 100\%$$

3.6 Alur Penelitian

Alur kerja dari penelitian respons dari eksplan daun dan pucuk hanjeli (*Coix lacryma-jobi* L.) terdapat pada Gambar 3.20 dan Alur penelitian dari penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.21.



Gambar 3.20 Alur Kerja Respons Eksplan Daun dan Pucuk Hanjeli



Gambar 3.21. Alur Penelitian