

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Siliwangi. Pelaksanaan penelitian dimulai pada bulan Mei 2025 sampai dengan bulan Agustus 2025.

3.2 Alat dan bahan penelitian

Alat-alat yang dipakai pada penelitian ini adalah *laminar air flow* (LAF), *autoclave*, timbangan analitik, pH meter, erlenmeyer, gelas ukur, gelas beker, petridish, pipet, spatula, pengaduk kaca, termometer, higrometer, pengaduk, pinset, scalpel, bunsen, hand sprayer, gunting, pisau, botol kultur, *magnetic stirrer*, lemari untuk menyimpan bahan kimia, tabung reaksi, labu ukur, kulkas, kamera, perlengkapan pencucian, alat tulis, penggaris, rak kultur, sarung tangan, masker.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah eksplan *in vitro* Gaharu dari ERSAM Agro *BIOTECH*, media MS, hidrolisat kasein, air kelapa muda yang daging buahnya masih berwarna putih dan bertekstur lunak, sukrosa, agar-agar, detergen, alkohol, spritus, plastik tahan panas, aluminium foil, aquades, kertas, kertas label, *plastic wrap*, karet dan tisu.

3.3 Metode penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu eksperimental dengan rancangan acak lengkap (RAL) non faktorial dengan 7 perlakuan dan 4 ulangan sehingga diperoleh 28 unit percobaan dan setiap unit percobaan terdiri dari 3 eksplan. Faktor perlakuan terdiri dari tujuh taraf perlakuan, yaitu:

A = Hidrolisat kasein 0 mg/L dan Air Kelapa 0 ml/L

B = Hidrolisat kasein 100 mg/L

C = Air Kelapa 50 ml/L

D = Hidrolisat kasein 100 mg/L + Air Kelapa 25 ml/L

E = Hidrolisat kasein 100 mg/L + Air Kelapa 50 ml/L

F = Hidrolisat kasein 50 mg/L + Air Kelapa 25 ml/L

G = Hidrolisat kasein 50 mg/L + Air Kelapa 50 ml/L

3.4 Analisis data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian kemudian dianalisis dengan sidik ragam dan pengambilan keputusan berdasarkan kaidah uji F untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap variabel pengamatan. Metode linear dari Rancangan Acak Lengkap (RAL) menurut (Gomez dan Gomez, 2010) sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan:

Y_{ij} = Respon atau nilai pengamatan perlakuan ke-I dan ulangan ke-j

μ = Nilai rata-rata umum

τ_i = Pengaruh perlakuan ke-i

ε_{ij} = Pengaruh acak pada perlakuan ke-I dan ulangan ke-j

Berdasarkan model linear tersebut disusun dalam daftar sidik ragam sebagaimana tabel berikut ini.

Tabel 1. Analisis sidik ragam

SK	db	JK	KT	Fhit	F tabel 5%
Perlakuan	6	$(\sum t^2)/r$ - FK	JKP/dbp	KTP/KTG	2,57
Galat	21	JKT-JKP	JKG/dbg		
Total	27	$\sum X_i^2$ - FK			

(Sumber: Gomez dan Gomez, 2010)

Kaidah pengambilan Keputusan berdasarkan pada nilai F hitung dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Kaidah pengambilan keputusan

Hasil Analisis	Kesimpulan Analisa	Keterangan
$F_{hit} \leq F_{0,05}$	Tidak berbeda nyata	Tidak ada perbedaan pengaruh antar perlakuan
$F_{hit} > F_{0,05}$	Berbeda nyata	Ada perbedaan pengaruh antar perlakuan

Apabila hasil uji F terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan maka dilakukan uji lanjutan dengan menggunakan Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf 5% dengan rumus sebagai berikut :

$$LSR = SSR (\alpha, \text{dbg}, \rho) \cdot S_x$$

Keterangan :

LSR = Least Significant Range

SSR = Student Significant Range

α = taraf nyata

dbg = derajat bebas galat p

ρ = range (perlakuan)

S_x = Simpangan baku rata - rata

Untuk mencari S_x menggunakan rumus

$$S_x = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r}}$$

Keterangan :

S_x = Galat baku rata-rata (*Standard Error*)

KTG = Kuadrat Tengah Galat

r = Ulangan

3.5 Prosedur penelitian

3.5.1 Sterilisasi alat

Alat yang digunakan meliputi gelas ukur, gelas beker, cawan petri, botol kultur, skalpel, pinset, spatula dan gunting eksplan dicuci bersih menggunakan detergen, kemudian dibilas dan dikeringkan. Alat-alat dari logam yang disterilkan dengan autoklaf dibungkus dengan aluminium foil, cawan petri dibungkus dengan kertas tebal, kemudian semua alat dimasukkan dalam plastik transparan yang tahan panas dan diikat dengan karet. Semua peralatan tersebut kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 17,5 Psi selama 20 menit (Aini, 2015).

3.5.2 Pembuatan media

Pembuatan larutan stok, yaitu dengan menimbang bahan-bahan kimia, hara makro, dan hara mikro sesuai komposisi media MS untuk dibuat larutan stok (Tabel 3).

Tabel 3. Pembesaran larutan stok dan komposisi media MS 1 L

Kode larutan stok dan pembesarannya	Bahan Unsur	Berat (g) untuk Volume 1 liter	Konsentrasi dalam Media MS (mg/L)	Volume larutan stok untuk 1 liter media (ml/L)
A (50x)	NH ₄ NO ₃	82,5	1650	20
B (50x)	KNO ₃	95,0	1900	20
C (200x)	KH ₂ PO ₄	39,0	195	5
	H ₃ BO ₃	1,24	6,2	
	KI	0,166	0,83	
	NA ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,05	0,25	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,005	0,025	
D (200x)	CaCl ₂ .H ₂ O	88	440	5
E (200x)	MgSO ₄ .7H ₂ O	74	370	5
	0	4,46	22,3	
	MnSO ₄	1,72	8,6	
	ZnSO ₄	0,005	0,025	
	CuSO ₄ .H ₂ O			
F (200x)	Na ₂ EDTA	3,73	37,3	10
	FeSO ₄ .7H ₂ O	2,78	27,8	
Vit (100x)	Thiamine-HCl	0,01	100	10
	HCl	0,05	0,1	
	Nicotinic acid	0,05	0,5	
	Pyridoxine-HCl	0,2	0,5	
	Glycine			
MyO (100x)	Myo-Inositol	10	2	10

Kemudian bahan-bahan tersebut dilarutkan dengan aquades dan diaduk sampai homogen dengan *magnetic stirrer*, kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang diberi label (sesuai dengan perlakuan) dan disimpan dalam lemari pendingin.

Hidrolisat kasein dan air kelapa disiapkan secara terpisah sebelum ditambahkan ke dalam media kultur. Hidrolisat kasein yang digunakan merupakan hidrolisat kasein komersial berbentuk serbuk. Serbuk hidrolisat kasein ditimbang sesuai dengan konsentrasi perlakuan yang telah ditentukan, kemudian dilarutkan dalam akuades steril. Larutan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga

hidrolisat kasein larut sempurna dan membentuk larutan homogen. Air kelapa yang digunakan berasal dari kelapa muda yang daging buahnya masih berwarna putih dan bertekstur lunak. Air kelapa disaring menggunakan kertas saring untuk menghilangkan kotoran dan partikel kasar. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media Murashige dan skoog (MS) yang ditambahkan larutan hidrolisat kasein dan air kelapa dengan konsentrasi yang telah disiapkan ditambahkan ke media kultur *in vitro*.

Tahapan pembuatan media adalah sebagai berikut:

- a. Campurkan larutan stok A, B, C, D, E, F, Vit, MyO, Hidrolisat kasein, Air Kelapa sesuai konsentrasi volume larutan yang akan dibuat ke dalam Erlenmeyer.
- b. Tambahkan Arang Aktif 200 mg/L (Pushpraj dan Patel, 2016) dan sukrosa 1,875 gram, tambahkan aquades sampai volume 150 ml.
- c. Ukur pH media menggunakan pH meter antara 5,5 – 5,8. Jika pH terlalu rendah tambahkan NaOH 1 N untuk menaikkan pH dan jika pH terlalu tinggi tambahkan HCl 0,1 N.
- d. Masukkan *stirrer bar* ke dalam Erlenmeyer dan letakkan pada *magnetic stirrer* untuk menghomogenkan larutan.
- e. Setelah pH sesuai dan larutan sudah homogen, tambahkan agar sebanyak 1,75 gram lalu tambahkan aquades sampai volume 250 ml ke dalam Erlenmeyer, masak sampai mendidih.
- f. Setelah mendidih, tuangkan larutan media ke dalam botol kultur dengan volume 25 ml per botol dan tutup lalu lapiisi dengan *plastic wrap*. Media ini disterilkan dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C (Saputra, 2019).
- g. Sebelum media disimpan diruangan persediaan dilakukan pemasangan label dengan tujuan agar dapat membedakan masing-masing setiap perlakuan yang telah diberikan.

3.5.3 Penanaman

Eksplan berupa potongan batang tanaman *in vitro* gaharu yang diperoleh dari ERSAM Agro *BIOTECH* (Gambar 3). Bahan eksplan yang dipakai berasal dari hasil pertumbuhan ke 4 dengan umur kultur 12 minggu. Kriteria pengambilan bahan

eksplan in vitro yaitu tinggi tunas 3 - 4 cm dan berjumlah 8 daun dihitung dari atas. Penanaman eksplan dilakukan dalam keadaan steril di dalam LAF (*Laminar Air Flow*). *Laminar air flow* dibersihkan dengan menyemprotkan alkohol 70% lalu dilap dengan tisu kemudian di sinar Ultra Violet (UV) selama 30 menit sampai dengan 60 menit. Blower dinyalakan, setelah itu semua alat-alat yang digunakan dalam proses pengkulturan disemprot dengan alkohol 70% dan masukkan kedalam *laminar air flow*. Sebelum melakukan penanaman, alat yang akan digunakan pada saat penanaman seperti pinset dan skalpel disterilisasikan kembali dengan teknik pembakaran diatas api Bunsen kemudian dicelupkan kedalam alkohol (Gu dkk., 2022).



Gambar 4. Planlet Gaharu dari ERSAM Agro *BIOTECH*
(Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2025)

Tahapannya planlet gaharu dikeluarkan dari botol kultur dan diletakkan pada petridish steril, kemudian dipotong bagian batang tanpa daun (*nodal explant*) dengan ukuran 1 cm yang akan dijadikan sebagai sumber eksplan menggunakan pisau scalpel steril dan pinset (Hapsari dkk., 2019). Kemudian ditanam satu persatu eksplan gaharu kedalam media perlakuan yang sudah dibuat, setiap botol berisi tiga eksplan. Sebelum ditutup, mulut botol dipanaskan kembali. Botol-botol kultur tersebut kemudian diletakkan pada rak kultur, pada suhu 20-25°C dan penyinaran dengan menggunakan lampu (Okudera, Y., dan Ito, M., 2009).

3.5.4 Pemeliharaan

Pemeliharaan dilakukan dengan cara menyemprotkan alkohol 96% pada botol kultur bagian luar dan melakukan monitoring setiap hari.

3.6 Parameter Pengamatan

3.6.1 Parameter Penunjang

a. Kondisi umum kultur

Pengamatan ini dilakukan dengan melihat kondisi ruang kultur penelitian dan dilakukan pengamatan untuk persentasi *browning* pada 4, 6, dan 8 MST dengan cara menghitung semua eksplan yang *browning* dan kontaminasi. Hasil pengamatan ini disajikan dalam bentuk tabel. Persentase *browning* dihitung dengan rumus sebagai berikut (Handayani dkk., 2022):

$$\% \text{ eksplan browning} = \frac{\sum \text{eksplan browning}}{\sum \text{eksplan dikulturkan}} \times 100\%$$

b. Waktu muncul tunas

Pengamatan terhadap waktu muncul tunas dilakukan dengan cara melihat eksplan dari luar botol kultur, pengamatan dilakukan setiap hari yaitu terhitung mulai dari eksplan ditanam sampai eksplan mengeluarkan tunas selama 12 MST. Ciri-ciri muncul tunas ditandai dengan tunas yang berwarna hijau muda.

3.6.2 Parameter Utama

a. Persen kemunculan tunas per eksplan

Pengamatan ini dilakukan pada 4 dan 6 MST dengan cara menghitung semua eksplan yang berhasil membentuk tunas. Data hasil pengamatan dianalisis secara statistik kemudian disajikan dalam bentuk tabel. Persen kemunculan tunas per eksplan dihitung dengan rumus sebagai berikut (Supriadi, 2022):

$$\% \text{ kemunculan tunas} = \frac{\sum \text{eksplan berhasil membentuk tunas}}{\sum \text{eksplan dikulturkan}} \times 100\%$$

b. Jumlah tunas per eksplan

Pengamatan jumlah tunas dilakukan pada 6 dan 12 MST dengan cara menghitung seluruh tunas yang tumbuh pada setiap eksplan. Data hasil pengamatan dianalisis secara statistik kemudian disajikan dalam bentuk tabel.

c. Tinggi tunas per eksplan

Parameter tinggi tunas per eksplan dihitung pada 6 dan 12 MST. Tinggi diukur dari pangkal tunas sampai ujung tunas pada setiap sampel eksplan dengan menempelkan penggaris pada dinding luar botol, kemudian mengambil gambar dari jarak dan sudut yang sama untuk kemudian diukur menggunakan aplikasi ImageJ dalam kondisi eksplan masih dalam botol (Resigia dkk., 2021). Data hasil pengamatan dianalisis secara statistik kemudian disajikan dalam bentuk tabel.

d. Jumlah daun per eksplan

Ditentukan pada 6 dan 12 MST dengan menghitung jumlah seluruh daun yang terbentuk pada tanaman. Penghitungan jumlah daun per tunas apabila daun yang membantu sempurna atau terbuka secara lebar serta permukaan daun terlihat dengan penampakan yang sempurna baik dari pangkal maupun ujung tunas. Data hasil pengamatan dianalisis secara statistik kemudian disajikan dalam bentuk tabel.