

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Tasikmalaya dimulai pada bulan Juli sampai dengan Oktober 2024.

3.2. Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, *laminar air flow* (LAF), timbangan analitik, alat *shaker*, gelas ukur, *beaker glass*, botol kultur, pH meter, labu erlenmeyer, cawan petri, *scalpel*, gunting bedah, pinset, pipet tetes, pipet ukur, *magnetic hot plate stirrer*, *stapler*, plastik, *tissue* kertas, lampu bunsen, kompor, tabung gas, masker, mistar, alat tulis, dan kamera.

Bahan yang digunakan adalah eksplan tunas stevia, zat pengatur tumbuh auksin (IAA dan IBA), alkohol 70%, akuades, gula, unsur makronutrient dan mikronutrient untuk komposisi media DKW (Driver and Kuniyuki Walnut), alkohol 96%, agar *powder*, dan spiritus.

3.3. Metode penelitian

Penelitian menggunakan metode eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) non faktorial dengan delapan perlakuan dan tiga kali ulangan. Pada setiap unit percobaan terdiri dari tiga eksplan stevia. Setiap perlakuan ditambahkan Benzyl Amino Purin (BAP) 0,5 mg/l. Bahan eksplan yang digunakan merupakan tunas tanaman stevia yang diperoleh dari BPP Padakembang. Kombinasi perlakuan yang digunakan adalah sebagai berikut:

A = IBA 0,2 mg/L + $\frac{1}{2}$ DKW

B = IBA 0,5 mg/L + $\frac{1}{2}$ DKW

C = IBA 1,0 mg/L + 1 DKW

D = IBA 1,5 mg/L + 1 DKW

F = IAA 0,2 mg/L + $\frac{1}{2}$ DKW

G = IAA 0,5 mg/L + $\frac{1}{2}$ DKW

H = IAA 1,0 mg/L + 1 DKW

I = IAA 1,5 mg/L + 1 DKW

Keterangan: Media 1 DKW merupakan media dengan konsentrasi penuh (*full-strength*) sesuai komposisi media Driver dan Kuniyuki Walnut (Tabel 1). Media 1/2 DKW (*half-strength*) memiliki konsentrasi nutrisi setengah dari media 1 DKW.

3.4. Analisis data

Model linier dari Rancangan Acak Lengkap (RAL) non faktorial sebagai berikut:

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

Dengan:

$i = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$

$j = 1, 2, 3$

Keterangan:

Y_{ij} : Pengamatan pada perlakuan ke- i dan ulangan ke- j

μ : Rataan umum

τ_i : Pengaruh perlakuan ke- i

ε_{ij} : Pengaruh acak pada perlakuan ke- i ulangan ke- j

Berdasarkan metode linier tersebut disusun dalam daftar sidik ragam sebagai berikut ini (tabel 2).

Tabel 2. Daftar Sidik Ragam

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	$F_{0,05}$
Perlakuan	7	$\frac{\sum T^2}{r} - FK$	JK_P / Jb_P	KT_p / KT_G	2,66
Galat	16	$JK_T - JK_p$	JK_G / db_G		
Total	23	$\sum X^2 - FK$			

Sumber: Gomez dan Gomez (2007)

Tabel 3. Kaidah Pengambilan Keputusan

Hasil analisa	Kesimpulan analisa	Keterangan
$F_{hit} \leq F_{0.05}$	Tidak berbeda nyata	Tidak ada pengaruh antar perlakuan
$F_{hit} > F_{0.05}$	Berbeda tidak nyata	Ada perbedaan pengaruh antar perlakuan

Sumber: Gomez dan Gomez (2007)

Jika nilai F menunjukkan perbedaan nyata maka dilakukan uji lanjutan dengan Uji Jarak Berganda *Duncan* pada taraf nyata 5% dengan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

S_x : Galat baku rata-rata (*Standard Error*).

KTG : Kuadrat Tengah galat.

R : Jumlah ulangan pada tiap nilai tengah perlakuan yang dibandingkan.

3.5. Prosedur percobaan

3.5.1. Sterilisasi alat

Alat-alat yang digunakan seperti pinset, *scalpel*, dan cawan petri yang telah dibersihkan, kemudian dibungkus dengan kertas dan disterilkan di dalam autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 1 atm selama kurang lebih 15 menit.

3.5.2. Sterilisasi aquades

Tujuan sterilisasi aquades untuk menghilangkan mikroorganisme di dalam aquades yang nantinya digunakan untuk pembuatan media dan sterilisasi eksplan.

Langkah-langkah sterilisasi aquades:

- Memasukkan aquades sebanyak 1000 ml ke dalam labu erlenmeyer kemudian ditutup dengan aluminium dan dilapisi menggunakan *cling wrap*.
- Labu Erlenmeyer berisi aquades dimasukan ke dalam autoklaf dengan suhu 121°C serta tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.5.3. Pembuatan larutan stok

Pembuatan larutan stok untuk menghindari penimbangan banyak komponen secara berulang. Serta dapat mempermudah penimbangan hara mikro yang dibutuhkan dalam jumlah sedikit (Dwiyani, 2015).

a. Pembuatan larutan stok hara makronutrien dan mikronutrien :

Larutan stok hara terdiri dari stok A (NH_4NO_3), stok B $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, stok C ($\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), stok D ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), stok E ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), stok F (KH_2PO_4 , H_3BO_3 , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), dan stok G (K_2SO_4). Stok A, B dibuat 50 kali pembesaran, sementara stok C, D, E, F, dan G dibuat 200 kali pembesaran (Tabel 1). Maka larutan stok A dan B dapat digunakan sebanyak 50 kali dan larutan stok C, D, E, F, dan G sebanyak 200 kali untuk pemakaian pembuatan media masing-masing 1 liter. Adapun tahapannya sebagai berikut:

1. Bahan kimia yang akan digunakan, terdiri atas unsur hara makro dan mikro, ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik sesuai jumlah yang telah ditentukan.
2. Bahan yang telah ditimbang kemudian dilarutkan secara terpisah ke dalam gelas kimia yang berisi 200 ml aquades sesuai dengan komposisi masing-masing larutan stok.
3. Pembuatan larutan dilakukan dengan urutan sebagai berikut, yaitu unsur NH_4NO_3 dilarutkan sebagai larutan stok A, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sebagai larutan stok B, $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebagai larutan stok C, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, dan $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebagai larutan stok D, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebagai larutan stok E, KH_2PO_4 , H_3BO_3 , dan $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebagai larutan stok F, serta K_2SO_4 sebagai larutan stok G.
4. Seluruh bahan yang telah dilarutkan diaduk menggunakan magnetic stirrer hingga homogen, kemudian larutan diterakan menggunakan gelas ukur hingga volumenya mencapai 1 liter setelah semua unsur hara larut sempurna.

5. Larutan stok hara makro yang telah selesai dibuat sebanyak 1 liter dimasukkan ke dalam botol gelas berwarna coklat, selanjutnya botol diberi label dan tanggal pembuatan, serta disimpan pada suhu lemari pendingin untuk menjaga kestabilan komponen larutan.
6. Botol larutan stok F dibungkus menggunakan aluminium foil agar terhindar dari paparan cahaya, karena cahaya dapat memengaruhi stabilitas dan reaksi kimia dalam larutan tersebut.

3.5.4. Pembuatan media DKW

Berikut langkah-langkah pembuatan media DKW:

- a. Komposisi senyawa pada setiap media dapat dilihat pada Tabel 1.
- b. Setelah larutan stok A, B, C, D, E, F, G, vitamin, Myo-inositol, serta ZPT auksin (IAA dan IBA) diambil sesuai perlakuan, larutan tersebut dimasukkan ke dalam gelas kimia berukuran 1 liter.
- c. Sukrosa sebanyak 30 g/L kemudian ditambahkan ke dalam gelas kimia, dan aquades ditambahkan hingga volume mencapai 900 ml.
- d. pH larutan diukur menggunakan pH meter dan diatur agar berada pada kisaran 5,5–5,8. Jika pH terlalu rendah, maka pH dinaikkan dengan penambahan NaOH 0,1 N, sedangkan jika pH terlalu tinggi, maka pH diturunkan dengan penambahan HCl 0,1 N.
- e. Phytigel sebanyak 4,5 g/L kemudian ditambahkan, dan aquades ditambahkan kembali hingga volume total mencapai 1 liter.
- f. Medium yang berisi larutan media diaduk dan dipanaskan secara merata menggunakan *hot plate magnetic stirrer* hingga suhu mencapai $\pm 80^{\circ}\text{C}$, kemudian sebanyak ± 25 ml larutan (sesuai volume botol) dimasukkan ke dalam botol kultur dan botol ditutup rapat menggunakan penutup botol.
- g. Label berisi jenis dan konsentrasi ZPT yang digunakan ditempelkan pada setiap botol kultur.
- h. Media dalam botol kultur kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama ± 20 menit.

- i. Botol kultur yang telah disterilisasi dikeluarkan dari autoklaf, kemudian diinkubasikan selama 3–4 hari pada suhu ruang ($\pm 21^{\circ}\text{C}$) untuk memastikan media bebas dari kontaminasi dan siap digunakan.

3.5.6. Penanaman

a. Tahapan isolasi eksplan

- 1) Eksplan diambil dari bagian tunas buku tanaman stevia sebagai bahan tanam untuk kultur jaringan.
- 2) Eksplan yang telah diambil dicuci dengan air bersih sebelum dilakukan pemotongan organ daun menggunakan *scalpel*. Selanjutnya, eksplan yang telah dipotong disiapkan untuk proses sterilisasi, yang meliputi sterilisasi luar LAF dan sterilisasi di dalam LAF.

b. Tahapan sterilisasi diluar LAF (*Laminar Air Flow*)

- 1) Eksplan dicuci di dalam botol berlubang menggunakan air mengalir yang telah ditambahkan sabun (Sunlight) secukupnya selama 30 menit.
- 2) Eksplan yang telah dicuci kemudian dibilas menggunakan aquades steril sebanyak empat kali.
- 3) Eksplan selanjutnya direndam dalam larutan yang mengandung bakterisida 2 g/L, fungisida 2 g/L, dan tween 20 sebanyak lima tetes selama 60 menit, serta digoyangkan menggunakan *shaker* agar larutan merata.
- 4) Setelah perendaman, eksplan kembali dibilas menggunakan aquades steril sebanyak empat kali untuk menghilangkan sisa bahan kimia pada permukaan jaringan.

c. Tahapan sterilisasi didalam LAF (*Laminar Air Flow*)

- 1) Alkohol disemprotkan pada botol yang berisi eksplan serta pada pintu sebelum peneliti memasuki ruangan kerja.
- 2) Lampu UV dimatikan, kemudian blower dan lampu LED dinyalakan, selanjutnya proses sterilisasi dalam laminar air flow dimulai dengan membilas eksplan menggunakan akuades steril sebanyak empat kali.
- 3) Akuades steril dipisahkan dari eksplan dengan menggunakan botol kultur yang berbeda, kemudian eksplan direndam dalam larutan bayclin 20%

selama 10 menit, dan botol digoyangkan agar proses sterilisasi merata.

- 4) Setelah perendaman, eksplan dibilas dengan akuades steril sebanyak empat kali untuk menghilangkan sisa larutan bayclin.
- 5) Selanjutnya, eksplan direndam dalam larutan bayclin 15% selama 10 menit untuk sterilisasi lanjutan.
- 6) Setelah itu, eksplan kembali dibilas menggunakan akuades steril sebanyak empat kali untuk memastikan tidak ada residu bahan kimia yang tertinggal.
- 7) Terakhir, eksplan direndam dalam alkohol 70% selama tiga menit sebagai tahapan akhir proses sterilisasi sebelum penanaman.

d. Tahapan penanaman Eksplan

- 1) Alat-alat yang digunakan, seperti cawan petri, pinset, dan *scalpel*, disiapkan sebelum proses penanaman dilakukan.
- 2) Cawan petri diputar di atas api bunsen hingga seluruh sisinya terkena api, kemudian cawan petri dan tangan disemprotkan dengan alkohol untuk mengurangi risiko kontaminasi.
- 3) Tisu disiapkan dan diletakkan di atas cawan petri. Pinset dilewatkan di atas api bunsen untuk mensterilkannya, kemudian eksplan yang telah disterilisasi diletakkan di atas tisu dalam cawan petri dan dikeringkan menggunakan tisu tersebut.
- 4) Eksplan dipotong menggunakan *scalpel* yang telah dilewatkan di atas api bunsen, dengan memotong tangkai daun yang masih tersisa serta bagian ujung eksplan yang telah terkena bahan sterilan.
- 5) Pemotongan dilanjutkan pada bagian tunas buku tanaman stevia yang akan digunakan sebagai bahan tanam.
- 6) Eksplan yang telah dipotong diletakkan di dalam cawan petri, dipisahkan dari potongan tangkai daun, kemudian cawan petri ditutup dengan tutup yang telah disterilkan di atas api bunsen.
- 7) Plastik *wrap* pada botol yang berisi media kombinasi DKW dan auksin dibuka, lalu botol dan tutupnya diputar di atas api bunsen sebelum dan sesudah dibuka untuk menjaga sterilitas media.
- 8) Eksplan kemudian ditanam pada media kultur, dengan memastikan

orientasi bagian atas dan bawah eksplan tidak tertukar. Setiap botol ditanami tiga eksplan, kemudian botol kultur ditutup dan dilapisi menggunakan *cling wrap*.

- 9) Eksplan yang telah selesai ditanam disimpan di dalam ruang inkubasi untuk proses pertumbuhan dan adaptasi awal.

3.5.7. Pemeliharaan

- a. Eksplan hasil kultur ditempatkan di dalam ruang penyimpanan (rak inkubasi) dengan suhu 18–20°C selama 24 jam untuk proses pemeliharaan.
- b. Kebersihan ruang penyimpanan dan rak inkubasi dijaga agar tetap berada dalam keadaan steril selama masa pemeliharaan eksplan, dengan menyemprotkan alkohol 70%.

3.6. Parameter pengamatan

3.6.1. Parameter penunjang

- a. Waktu muncul akar

Pengamatan dilakukan dengan mencatat waktu munculnya akar pada setiap eksplan dan diamati setiap hari setelah penanaman eksplan. Kriteria akar yang terbentuk adalah tonjolan berwarna putih.

- b. Waktu muncul tunas

Pengamatan waktu muncul tunas dilakukan dengan mencatat hari pertama munculnya tunas pada setiap eksplan, yang diamati secara rutin setiap hari sejak penanaman. Tunas dinyatakan mulai terbentuk apabila terlihat calon tunas berupa tonjolan kecil berwarna hijau pada permukaan eksplan.

- c. Persentase *browning*

Pengamatan persentase *browning* dilakukan setiap hari dengan menghitung dan mempresentasikan jumlah eksplan yang mengalami *browning* dengan menggunakan rumus perhitungan:

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

3.6.2. Parameter utama

a. Jumlah eksplan berkalus

Perhitungan jumlah dan persentase eksplan berkalus dilakukan dengan cara menghitung jumlah eksplan yang membentuk kalus pada masing-masing perlakuan. Pengamatan dilakukan setiap dua minggu sekali hingga umur 12 minggu setelah penanaman eksplan.

b. Jumlah eksplan bertunas

Perhitungan jumlah dan persentase eksplan bertunas dilakukan dengan cara menghitung jumlah tunas yang muncul dan diamati setiap dua minggu sekali sampai berumur 12 minggu setelah penanaman eksplan.

c. Panjang tunas per eksplan

Perhitungan panjang tunas dilakukan dengan cara mengukur tinggi tunas menggunakan penggaris dan diamati setiap dua minggu sekali sampai berumur 12 minggu setelah penanaman eksplan.

d. Jumlah eksplan berakar

Perhitungan jumlah dan persentase eksplan berakar dilakukan dengan cara menghitung akar yang tumbuh dan diamati setiap dua minggu sekali sampai berumur 12 minggu setelah penanaman eksplan.