

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan 3 ulangan. Faktor pertama, konsentrasi 2,4-D dan faktor kedua yaitu air kelapa. Pada penelitian ini terdapat 12 unit perlakuan sehingga secara keseluruhan terdapat 36 unit percobaan.

- 1). Faktor 1: konsentrasi 2,4-D
 - a. A0: 0 mg/L 2,4-D
 - b. A1: 1 mg/L 2,4-D
 - c. A2: 2 mg/L 2,4-D
 - d. A3: 3 mg/L 2,4-D
- 2). Faktor 2: konsentrasi air kelapa
 - a. V1: 10% air kelapa (AK)
 - b. V2: 15% air kelapa (AK)
 - c. V3: 20% air kelapa (AK)

Tabel 3.1 Kombinasi perlakuan antara konsentrasi 2,4-D dan air kelapa

Konsentrasi 2,4-D (mg/L)	Konsentrasi Air kelapa (%)		
	10	15	20
0	A0V1	A0V2	A0V3
1	A1V1	A1V2	A1V3
2	A2V1	A2V2	A2V3
3	A3V1	A3V2	A3V3

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus-September 2013, bertempat di laboratorium *Plant Physiology and Culture* Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain; beaker glass, gelas ukur, cawan petri, botol kultur, alat-alat diseksi (scapel, *blade*, pinset), LAF (*Laminar Air Flow Cabinet*), oven, timbangan analitik, pipet tetes, autoklaf, penyemprot alkohol (*hand sprayer*), korek api, lampu bunsen, PH meter, lampu *flouresence* lemari pendingin, *disposable syringe*, rak kultur, kertas label, *wrap plastik*, plastik tahan panas, karet, *hot plate and magnetic stirrer*, kertas label, tissue, aluminium foil, *wrap plastic*, baskom, dan spuit.

3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah bagian daun muda stevia yang diperoleh dari Matera Medica kota Batu-Malang, media MS jadi (Murashige dan Skoog) sebagai media dasar, gula, agar, NAOH, HCL, ZPT 2,4-D dan air kelapa. Bahan untuk sterilisasi diantaranya deterjen, fungisida, spirtus, alkohol 70%, dan 90%, disinfektan, betadine, aquades steril dan teepol sebagai bahan untuk mencuci alat.

3.4 Metode Penelitian

3.4.1 Sterilisasi Alat

Adapun tahapan dalam proses sterilisasi alat adalah, sebagai berikut:

1. Alat-alat *dissecting* (scalpel, pinset, gunting), alat-alat dari gelas dan logam direndam terlebih dahulu selama $\pm 1 \times 24$ jam dengan teepol.
2. Dicuci dengan detergent dan dibilas dengan air bersih beberapa kali kemudian dikering-anginkan.
3. Alat-alat logam kemudian dibungkus dengan aluminium foil dan dimasukkan dalam oven untuk sterilisasi pada suhu 125°C , selama ± 2 jam.
4. Alat-alat gelas (cawan petri) dibungkus dengan aluminium foil dan dimasukkan dalam plastik, kemudian di sterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 30 menit.

5. Alat-alat logam *dissecting set* (pinset, gunting, scapel) di sterilisasi dengan alkohol 90%, selanjutnya dimasukkan dalam LAF (untuk di UV) dan dibakar dengan nyala api spiritus setiap kali akan digunakan di LAF.
6. Alat-alat dari gelas dimasukkan dalam LAF untuk di UV sebelum digunakan pada proses penanaman.

3.4.2 Pembuatan Media

Tahapan pembuatan media kultur pada penelitian ini, diantaranya:

1. Disiapkan air kelapa yang masih muda dan segar, disaring dengan saringan untuk kemudian ditambahkan kedalam media MS dengan konsentrasi yang ditentukan pada tiap perlakuan.
2. Ditimbang agar sebanyak 8 gram, media MS 4,43 gram, gula 30 gram, 2,4-D mulai dari 0 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l, 3mg/l dan air kelapa sebanyak 10%, 15% dan 20%. Kemudian, dilarutkan gula, media MS, air kelapa dan 2,4-D yang digunakan dengan aquades hingga mencapai volume 1 liter dalam beaker glass.
3. Diatur keasaman media menjadi 5,8 menggunakan pH meter, apabila pH kurang 5,8 maka ditambahkan dengan NaOH 0,1N dan apabila pH lebih dari 5,8 maka media ditambahkan larutan HCL 0,1N.
4. Ditambahkan agar, kemudian di panaskan di atas hot plate hingga mendidih dan di homogenkan dengan menggunakan stirrer.
5. Larutan yang telah mendidih dituang ke dalam botol kultur sebanyak 20 ml kemudian ditutup dengan plastik.

3.4.3 Sterilisasi Media

Media yang telah diisikan dalam setiap botol kultur disterilisasikan dengan autoklaf pada suhu 121⁰C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Media yang sudah steril selanjutnya diinkubasi dalam ruang inkubator selama minimal 3 hari.

3.4.4 Sterilisasi Ruang Tanam

Penanaman eksplan kultur kalus dilakukan di dalam LAF (*Laminar Air Flow Cabinet*). Dan sebelum digunakan, LAF disterilkan dengan tahapan sebagai berikut:

1. Laminar Air Flow disemprot dengan alkohol 70% sebelum digunakan.
2. Bahan dan alat yang digunakan untuk sterilisasi eksplan dimasukkan ke dalam LAF, kemudian UV dihidupkan ±selama 1 jam.
3. Blower dan lampu kerja dinyalakan terlebih dahulu kemudian UV akan mati secara otomatis (keadaan blower harus ON, untuk membantu menghindari kontaminasi pada saat menanam eksplan).
4. Bahan dan alat yang akan digunakan harus disemprot alkohol terlebih dahulu (setelah UV mati).
5. Penggunaan bunsen juga membantu menghindari kontaminasi, akan tetapi harus tetap menjaga suhu dalam ruang.

3.4.5 Tahap Penanaman

Tahap penanaman ini terdiri dari empat langkah yang harus dilakukan, yaitu sebagai berikut:

1). Pemilihan Eksplan

Eksplan yang akan digunakan untuk kultur dipilih bagian daun yang masih muda karena, daun yang masih muda tersebut bersifat meristematik

2). Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan dilakukan melalui 2 tahap sterilisasi yaitu, sterilisasi tahap I yang dilakukan di ruang tanam dan sterilisasi tahap II yang dilakukan di LAF. Tahapan sterilisasi adalah sebagai berikut:

- a. Tahap pertama yaitu sterilisasi luar, eksplan yang telah dipilih dicuci terlebih dahulu di air yang mengalir
- b. Eksplan diletakkan di dalam botol yang telah diberi deterjen, kemudian dikocok perlahan agar bersih dari mikroorganisme.
- c. Eksplan yang telah dicuci dengan deterjen selanjutnya di bilas menggunakan air mengalir sampai bersih. Kemudian dibilas dengan aquades.
- d. Eksplan yang telah dicuci selanjutnya direndam dalam 300 mg/L fungisida selama 10 menit.
- e. Tahap kedua yaitu sterilisasi dalam LAF, eksplan disterilkan dengan cara direndam menggunakan disinfektan 30%, 20%, dan 10%, masing-masing selama 10 menit.
- f. Eksplan selanjutnya dibilas dengan menggunakan aquades steril sebanyak 3 kali masing-masing selama 3 menit.
- g. Eksplan yang telah dibilas dengan aquades selanjutnya dicelupkan dalam larutan betadine 1%.

h. Eksplan siap untuk ditanam.

3). Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan yang telah disterilkan dilakukan di dalam LAF dengan langkah-langkah sebagai berikut:

- a) Eksplan daun dipotong menggunakan scapel di cawan petri, namun bagian tulang daunnya dibuang.
- b) Diambil eksplan bagian helai daun kemudian dipotong.
- c) Daun dipotong dengan ukuran 5mm x 5mm.
- d) Botol media disiapkan, dibuka tutup plastik media dan media disterilkan dengan api bunsen.
- e) Eksplan diambil dengan pinset dan dimasukkan ke dalam botol kultur yang berisi media.
- f) Botol kultur disterilkan kembali di dekat api bunsen dan ditutup dengan plastik kemudian diikat dengan karet gelang.

4). Tahap Pemeliharaan Eksplan

Tahap pemeliharaan eksplan dilakukan setelah tahap penanaman eksplan. Eksplan dikeluarkan dari LAF selanjutnya diletakkan di rak-rak pemeliharaan eksplan di dalam ruangan pada cahaya selama ± 16 jam dengan suhu $\pm 20^{\circ}\text{C}$. Botol kultur yang telah berisi eksplan untuk pemeliharannya agar terhindar dari kontaminasi lingkungan maka, dilakukan penyemprotan dengan alkohol setiap hari.

5). Pengamatan

Pengamatan eksplan hasil penanaman kultur dilakukan dalam tiga taraf pengamatan yaitu:

- a. Pengamatan setiap hari dilakukan untuk melihat ada atau tidaknya perkembangan dan munculnya kalus pertama kali pada eksplan. Selain itu juga untuk melihat apabila ada kontaminasi pada eksplan, dan hasil pengamatan di dokumentasi
- b. Pengamatan kedua yaitu pengamatan interval 2 minggu sekali untuk mengetahui tekstur dan warna kalus.
- c. Pengamatan ketiga, merupakan pengamatan akhir yang dilakukan untuk mengamati persentase eksplan yang membentuk kalus serta berat kalus.

Parameter pengamatan:

- a). Pengamatan munculnya kalus pertama kali dinyatakan dalam HST (hari setelah tanam) yang ditandai dengan membengkaknya eksplan dan munculnya bintik-bintik putih.
- b). Pengamatan kontaminasi diamati secara langsung yang terjadi pada media dan eksplan yang dapat diakibatkan oleh mikroorganisme (jamur ataupun bakteri).
- c). Pengamatan warna kalus yang dilakukan setiap hari dengan diamati perubahan warna yang terjadi pada setiap kalusnya, misalnya warna kalus hijau muda keputihan (HP), kekuningan (K), kecoklatan (C), dan hijau (H).
- d). Tekstur kalus diamati secara visual pada penampakan kalus yaitu, melihat tekstur kalus remah (R), kalus kompak (K), dan kalus campuran (C).
- e). Parameter berat basah kalus adalah massa kalus basah yang diukur menggunakan timbangan analitik dengan satuan gram (g). Berat seluruh

kalus dan dicari berat rata-ratanya. Sedangkan pengamatan persentase kalus yang dilakukan dengan menghitung banyaknya eksplan yang membentuk kalus dalam satuan persen (%), dengan rumus hitung sebagai berikut:

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

3.5 Analisis Data

Data pengamatan pada penelitian ini berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif berupa pengamatan secara visual meliputi hari muncul kalus, morfologi kalus, dan persentase kalus, sedangkan data kuantitatif berupa berat kalus. Data kualitatif dianalisis secara deskriptif dan data kuantitatif dianalisis dengan menggunakan analisis variasi (ANOVA) untuk mengetahui adanya pengaruh konsentrasi kombinasi 2,4-D dan air kelapa yang tepat untuk menginduksi kalus stevia (*Stevia rebaudiana*) untuk masing-masing perlakuan dalam media MS. Apabila terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan dengan DMRT pada taraf 5%.