

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Tasikmalaya, dimulai pada bulan September 2022 sampai Februari 2023.

3.2 Bahan dan alat penelitian

3.2.1 Bahan-bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: eksplan berupa biji manggis varietas Puspahiang yang diambil langsung dari buahnya (diambil dari BPP Kecamatan Puspahiang Kabupaten Tasikmalaya), Myo-inositol, vitamin berupa *Nicotinic acid*, *Pyridoxine-HCl*, *Thiamine-HCl*, dan *Glycine*, unsur makronutrien dan mikronutrien untuk komposisi media tumbuh Murashige & Skoog (MS), agar-agar sebagai bahan pematat, sukrosa, madu dari lebah liar (*Apis dorsata*) (diperoleh dari Peternak Lebah di Cisarua, Kabupaten Bandung Barat), zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BAP, alkohol 70%, alkohol 96%, larutan natrium hipoklorit 30%, larutan detergen 20%, larutan fungisida 2%, akuades, asam klorida (HCl), natrium hidroksida (NaOH), api bunsen, dan spirtus.

3.2.2 Alat-alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi 4 bagian yaitu alat sterilisasi, pembuatan media, preparasi eksplan, dan alat penanaman eksplan. Alat sterilisasi yang digunakan adalah autoklaf dan pembakar spirtus. Alat yang digunakan untuk pembuatan media diantaranya timbangan analitik, *beaker glass*, erlenmeyer, botol kultur dan tutup, batang pengaduk, pipet, mikropipet, spatula, *hot plate and magnetic stirrer*. Alat yang digunakan untuk pembelahan dan pembersihan eksplan adalah *beaker glass*, botol aquades, cawan petri, pinset, batang pengaduk, dan pisau. Terakhir, alat yang digunakan untuk penanaman eksplan pada media adalah Laminar Air Flow (LAF), pinset, scalpel, petridish, rak

kultur, spidol, dan alat penunjang lainnya, seperti kamera, masker, tissue, dan alat tulis.

3.3 Metode penelitian

Penelitian ini menggunakan metode ekperimental yang disusun dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 6 perlakuan dan 4 ulangan. Sebagai perlakuan kombinasi penambahan sumber karbohidrat yang dikombinasikan zat pengatur tumbuh auksin dan stikonin adalah sebagai berikut:

A: Madu 3 % + 2,4-D 3 mg/L + BAP 1 mg/L

B: Madu 6 % + 2,4-D 2 mg/L + BAP 2 mg/L

C: Madu 9 % + 2,4-D 1 mg/L + BAP 3 mg/L

D: Sukrosa 3 % + 2,4-D 3 mg/L + BAP 1 mg/L

E: Sukrosa 4 % + 2,4-D 2 mg/L + BAP 2 mg/L

F: Sukrosa 5 % + 2,4-D 1 mg/L + BAP 3 mg/L

Dari 6 perlakuan dan 4 pengulangan maka didapatkan 24 unit percobaan. Dalam setiap unit percobaan terdiri dari 7 botol kultur sebagai cadangan sehingga terdapat 168 unit percobaan, setiap botol kultur ditanami 4 potongan melintang biji manggis.

Menurut Gomez dan Gomez (2010) model linier dari Rancangan Acak Lengkap yang digunakan untuk analisis statistika adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_{ij} + \epsilon_{ij}$$

$i = 1, 2, 3, 4, 5, \text{ dan } 6$

$j = 1, 2, 3 \text{ dan } 4$

Keterangan:

Y_{ij} : Hasil pengamatan dari perlakuan kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh

ke-i dan dengan ulangan ke-j

μ : Rata-rata pengamatan

τ_{ij} : Pengaruh perlakuan kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh ke-i dan ulangan ke-j

ϵ_{ij} : Kesalahan eksperimen

Data hasil pengamatan diolah dengan menggunakan analisis statistik, kemudian dimasukkan ke dalam tabel sidik ragam untuk mengetahui taraf nyata dari uji F yang tersaji pada Tabel 2.

Tabel 2. Sidik ragam

Sumber Keragaman	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F Hitung	F Tabel 5%
Perlakuan	5	$\frac{\sum T^2}{r} - FK$	$\frac{JKp}{p-1}$	$\frac{KTp}{KTg}$	2,77
Galat	18	$JKt - JKp$	$\frac{JKg}{(n-1) - (p-1)}$		
Total	23	$\sum x^2 - FK$			

Sumber: Gomez dan Gomez (2010)

Tabel 3. Kaidah pengambilan kesimpulan

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

Sumber: Gomez dan Gomez (2010)

Setelah dilakukan analisis dengan uji F, apabila berbeda nyata dilanjutkan dengan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) pada α 5% dengan persamaan sebagai berikut:

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

$$SSR = (\alpha \cdot dbg \cdot p)$$

$$LSR = SSR \cdot S_x$$

Keterangan:

S_x : Galat baku rata-rata (*standard error*)

KTg : Kuadrat tengah galat

r : Jumlah ulangan pada tiap nilai tengah perlakuan yang dibandingkan

SSR : *Significant Studentized Range*

α : Taraf nyata

dbg : Derajat bebas galat

p : *Range* (perlakuan)

LSR : *Least Significant Range*

3.4 Pelaksanaan penelitian

3.4.1 Sterilisasi alat

Alat-alat yang akan digunakan sebelumnya dicuci bersih menggunakan sabun lalu bilas dengan air bersih dan akuades kemudian dilakukan sterilisasi. Alat-alat yang perlu di sterilisasi adalah alat yang digunakan untuk melakukan percobaan, terdiri dari alat pembuatan medium, preparasi eksplan, dan alat penanaman eksplan. Sterilisasi alat dilakukan dengan cara alat yang akan digunakan dibungkus dengan koran atau plastik tahan panas kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf selama 1 jam pada suhu 120°C dan tekanan 15 psi. Untuk alat berbahan logam sterilisasi dilakukan dengan mencelupkannya ke dalam alkohol 96% kemudian dibakar dengan api bunsen.

3.4.2 Sterilisasi akuades

Dalam pembuatan larutan stok dan sterilisasi eksplan, akuades harus disterilisasi terlebih dahulu agar memiliki tingkat kemurnian yang tinggi dan tidak menimbulkan kontaminan. Pada proses sterilisasi, akuades dimasukkan ke dalam botol kultur sebanyak 3/4 volume botol, kemudian ditutup menggunakan plastik tahan panas dan diikat agar tidak menguap menggunakan karet gelang. Sterilisasi dilakukan selama 1 jam dalam autoklaf dengan suhu 121°C. Setelah selesai, akuades steril disimpan di ruang inkubasi.

3.4.3 Pembuatan media tanam

Pada penelitian ini, media tanam untuk proses induksi embrio somatik menggunakan media Murashige & Skoog (MS) dengan komposisi terlampir (Lampiran 2), dan tahapan pembuatannya adalah sebagai berikut:

1. Pembuatan larutan stok

Pembuatan larutan stok dilakukan dengan pembesaran 10 sampai 100 kali konsentrasi agar memudahkan penimbangan bahan larutan stok yang dibutuhkan dan mengurangi *human error* (Chimdessa, 2020).

- a. Pembuatan larutan stok hara makro dan mikronutrien

Larutan stok hara makronutrien dan mikronutrien terdiri dari larutan stok A (NH_4NO_3), stok B (KNO_3), stok C (KH_2PO_4 , H_3BO_3 , KI , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,

CoSO₄.6H₂O), stok D (CaCl₂. H₂O), stok E (MgSO₄. 7 H₂O, MnSO₄, ZnSO₄, CuSO₄. H₂O), dan larutan stok F (FeSO₄.7H₂O, Na₂ EDTA). Setiap larutan stok dibuat untuk masing-masing media, stok A dan B dibuat 50 kali pembesaran konsentrasi, stok C, D, E dibuat 200 kali pembesaran konsentrasi dan stok F dibuat 100 kali pembesaran konsentrasi dengan komposisi media menyesuaikan yang dibutuhkan dalam pembuatan media MS. Tahapan pembuatan larutan stok adalah sebagai berikut:

- 1) Bahan kimia yang akan digunakan adalah unsur hara makro dan mikro, ditimbang menggunakan neraca analitik sesuai dengan jumlah dengan pembesaran yang telah ditentukan.
- 2) Bahan yang sudah ditimbang dilarutkan satu persatu ke dalam erlenmeyer yang berisi akuades secara terpisah sesuai dengan komposisi dari masing-masing larutan stok. Pembuatan larutan stok dimulai dengan melarutkan senyawa hara makro dan mikro nutrien yang dibutuhkan seperti yang ada pada Tabel 4.
- 3) Semua bahan untuk berbagai kode larutan stok yang telah dilarutkan kemudian diaduk secara merata menggunakan *hot plate magnetic stirrer* satu per satu. Setelah unsur hara larut, maka larutan ditambahkan akuades hingga volume mencapai 1 liter menggunakan gelas ukur.
- 4) Larutan stok A, B, C, D, E, dan F yang sudah jadi sebanyak 1 liter dimasukkan ke dalam botol gelas berwarna coklat dan disimpan dalam lemari pendingin. Untuk botol larutan F dibungkus menggunakan aluminium foil agar tidak ada cahaya yang masuk untuk meminimalisir pengaruh reaksi dalam larutan stok karena didalamnya terdapat unsur besi-EDTA. Setiap botol larutan stok diberi label dan ditulis tanggal pembuatannya.
- 5) Larutan stok hara makro dan mikronutrien ini dapat digunakan untuk 50 kali larutan stok A dan B, 200 kali untuk larutan stok C,D, E dan 100 kali untuk larutan stok F pada pembuatan media masing-masing dengan volume 1 liter.

b. Pembuatan larutan stok vitamin dan myo-inositol

Pembuatan larutan stok vitamin dilakukan dengan menimbang komponen yang dibutuhkan yaitu Thiamine-HCl, Pyridoxine-HCl, Nicotic acid, dan Glycine menggunakan neraca analitik. Kemudian masukkan bahan-bahan tersebut satu per

satu ke dalam erlenmeyer yang sudah diisi akuades 50 mL sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Setelah semua bahan benar-benar larut, kalibrasi volume vitamin sampai 100 mL menggunakan labu ukur. Larutan stok vitamin disimpan di dalam lemari es. Chimdessa (2020) mengatakan bahwa pada pembuatan vitamin juga dilakukan pembesaran konsentrasi sebesar 100 kali dan disimpan dalam *freezer* sebelum digunakan. Untuk pembuatan larutan stok myo-inositol dilakukan pembesaran konsentrasi 10 kali yang disesuaikan dengan komposisi media MS dalam 100 mL akuades.

c. Pembuatan larutan stok 2,4-D dan BAP

Pembuatan larutan stok zat pengatur tumbuh terdiri dari dua jenis yaitu auksin 2,4-D dan sitokinin BAP. Pembuatan larutan stok zat pengatur tumbuh dilakukan dengan membuat larutan stok ZPT dengan konsentrasi 100 ppm. Pada pembuatan larutan stok 2,4-D, bahan yang sudah ditimbang sebanyak 10 mg kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL lalu ditambahkan akuades steril hingga tanda batas dan dikocok sampai larut. Pada pembuatan larutan stok BAP, bahan yang sudah ditimbang sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dengan HCL 0,1 N beberapa tetes lalu ditambahkan akuades steril sampai 100 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur kocok hingga larut merata.

2. Pembuatan media Murashige and Skoog (MS)

Untuk membuat 1 liter media dasar, dibutuhkan larutan stok hara makronutrien, mikronutrien, dan vitamin lalu dimasukan kedalam beaker glass 2 liter. Selanjutnya dilakukan pengambilan larutan stok dan ZPT yang sudah dibuat sebelumnya sesuai dengan rumus berikut (Chimdessa, 2020):

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

Keterangan:

V_1 = Volume larutan stok yang akan diambil

V_2 = Volume media 1 liter (1000 mL)

M_1 = Pembesaran konsentrasi larutan stok

M_2 = Konsentrasi yang sesuai dengan kebutuhan media MS dalam 1 liter (1000 mL)

Komposisi senyawa larutan stok yang akan dipipet untuk pembuatan media MS dapat dilihat pada Tabel 4. Setelah pengambilan larutan stok dan ZPT yang

sesuai perlakuan, menambahkan madu pada perlakuan A,B,C (menimbang madu 30 gram, 60 gram, dan 90 gram untuk setiap 1 L media MS) dan sukrosa pada perlakuan D,E,F (menimbang sukrosa 30 gram, 40 gram, dan 50 gram untuk setiap 1 L media MS) sebagai sumber karbohidrat sesuai dengan perlakuan yang telah ditetapkan, lalu tambahkan akuades hingga volume mencapai 900 ml. Panaskan dan diaduk diatas *magnetic stirrer* hingga larut. Kemudian pH larutan diukur menggunakan pH meter dengan pH sekitar 5,6-5,8. Jika pH terlalu rendah tambahkan NaOH 0,1 N dan jika pH terlalu tinggi tambahkan HCl 0,1 N pada larutan media. Setelah itu, dimasukan agar-agar sebanyak 4 g/liter sebagai pematidat dan tambahkan akuades hingga volume 1 liter, panaskan sampai mendekati mendidih dan media siap digunakan.

Tabel 4. Komposisi larutan stok dalam media MS 1 liter

Kode larutan stok dan pembesaran konsentrasinya	Senyawa kimia	Konsentrasi (g/L)	Konsentrasi media MS (mg/L)	Volume larutan stok yang dipipet (mL)
A (50x)	NH ₄ NO ₃	82,5	1600	20
B (50x)	KNO ₃	95	1900	20
C (200x)	KH ₂ PO ₄	34	170	5
	H ₃ BO ₃	1,24	6,20	
	KI	0,166	0,830	
	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,05	0,250	
	CoSO ₄ .6H ₂ O	0,005	0,025	
	CaCl ₂ . H ₂ O	66,44	332,2	
D (200x)	MgSO ₄ . 7 H ₂ O	36,14	180,7	5
	MnSO ₄ . H ₂ O	3,38	16,90	
	ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	1,72	8,60	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,005	0,025	
E (200x)	FeSO ₄ .7H ₂ O	2,780	27,80	10
	Na ₂ EDTA	3,726	37,26	
	Na ₂ EDTA	3,726	37,26	
F (100x)	Thiamine-HCl	0,01	0,100	10
	Pyridoxine-HCl	0,05	0,500	
	Nicotinic acid	0,05	0,500	
	Glycine	0,2	2,00	
Myo-inositol (100x)	Myo-Inositol	10	100	10

Sumber: Murashige T and Skoog (1962) *dalam* Chimdessa (2020)

Media yang telah siap digunakan, dituangkan pada botol kultur masing-masing sebanyak 25 ml. Botol kultur yang berisi media kemudian ditutup dengan penutup botol serta diberi label untuk masing-masing perlakuan. Setelah itu media disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 120°C. Untuk memastikan media terhindar dari kontaminasi pada saat digunakan, dilakukan inkubasi terlebih dahulu selama 3-4 hari pada suhu ruang.

3.4.4 Persiapan ruang tanam

Persiapan ruang tanam dilakukan dengan cara menurut Alfiana dkk. (2020), yaitu melakukan sterilisasi ruang tanam terlebih dahulu dengan cara menyalakan lampu *Ultraviolet* (UV) pada *Laminar Air Flow* (LAF) selama 30 menit. Setelah lampu UV pada LAF dimatikan, kemudian lampu neon serta *blower* dinyalakan ketika akan melakukan percobaan di LAF. Semua bagian meja LAF disemprot terlebih dahulu dengan larutan alkohol 70% secuali filter hefa, kemudian di lap dan dibersihkan dengan tissue.

3.4.5 Persiapan dan penanaman eksplan

Eksplan yang digunakan adalah biji dari buah manggis varietas Puspahiang yang masak. Biji manggis dibersihkan dari daging buahnya, dipilih ukuran biji yang relatif seragam, kemudian di sterilisasi dengan merendamnya dalam detergen 20% selama 10 menit, dalam larutan fungisida 2% selama 30 menit, dan dalam larutan bayclean 30% selama 30 menit. Setelah direndam dalam setiap larutan, dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Setelah itu biji direndam dalam alkohol 70% selama 10 menit, dan dibilas dengan akuades 1 kali.

Penanaman eksplan dilakukan dalam *Laminar Air Flow Cabinet*. Eksplan yang sudah disterilisasi sebelumnya kemudian dipotong menjadi 4 bagian secara melintang pada cawan petri. Eksplan kemudian dimasukkan dan ditanam pada botol kultur yang berisi media tanam yang telah disiapkan sebelumnya menggunakan pinset. Setelah itu, eksplan kemudian disimpan dan dipelihara pada ruang inkubasi dengan suhu 18°C sampai 22°C dengan intensitas penyinaran sebesar 1000 lux selama 24 jam. Setelah dilakukan subkultur pada 42 hst, semua eksplan disimpan

dalam ruang gelap hingga 98 hss untuk kemudian dilakukan pengamatan hasil kultur.

3.4.6 Pemeliharaan

Pemeliharaan dilakukan untuk memelihara dan mencegah eksplan yang disimpan pada ruang inkubasi agar tidak terkontaminasi. Jika terdapat media yang terkontaminasi tapi eksplan belum terkontaminasi maka eksplan tersebut langsung dipindahkan ke media yang baru. Selain media, jika terdapat eksplan yang terkontaminasi maka eksplan tersebut dibuang. Pemeliharaan lain yang dapat dilakukan adalah dengan melakukan sterilisasi ruangan dengan cara menyemprotkan alkohol 70% dan menjaga sterilisasi alat-alat yang masuk ke dalam ruang inkubasi.

3.4.7 Analisa histologi

Kalus embriogenik yang terbentuk selanjutnya dilakukan analisis histologi untuk mengetahui struktur PEM (*Pre-embryogenic mass*) kalus embriogenik dan pencapaian fase embrio somatik yang terbentuk dengan menggunakan metode paraffin (Meilvana, 2014). Analisis histologi dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan IPB University dengan prosedur analisa yang dapat dilihat pada Lampiran 10.

3.5 Parameter pengamatan

3.5.1 Persentase eksplan berkalus

Pengamatan dilakukan setiap 2 minggu, dimulai pada hari ke 28 setelah tanam (hst), 42 hst, 14 hari setelah sub kultur (hss), 28 hss, dan 42 hss untuk mengetahui berapa banyak eksplan yang membentuk jaringan kalus. Persentase eksplan membentuk kalus dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

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

3.5.2 Warna kalus dan struktur kalus

Pengamatan warna kalus dilakukan secara visual, sedangkan struktur kalus diamati berdasarkan dari bentuk kalus baik itu remah (*friable*), intermediet

(*intermediate*), dan kompak (*nonfriable*). Kalus intermediet sendiri terdiri dari sekelompok sel-sel yang bentuknya sebagian kompak dan sebagian remah. Kalus intermediet dapat berpotensi menjadi kalus embriogenik. Pengamatan warna dan struktur kalus dilakukan pada 28 hst dan 42 hst.

3.5.3 Persentase eksplan yang membentuk kalus embriogenik

Kalus embriogenik biasanya memiliki stuktur remah (*friable*), berwarna kuning, padat, nodular terdiri dari embrio berwarna putih susu sedangkan kalus non embriogenik memiliki struktur kompak (*nonfriable*), berwarna kuning kecoklatan, bergranular, dan halus (Meilvana, 2014). Kalus yang terbentuk kemudian diamati adanya struktur PEM (*Pre-embryogenic mass*) dari hasil analisa histologi setelah umur kultur 42 hss. Pengamatan kalus embriogenik secara visual dilakukan pada umur kultur 42 hst, 14 hss, 28 hss, 42 hss, 56 hss, 70 hss, 84 hss, dan 98 hss. Adapun rumus yang digunakan untuk menghitung persentase kalus embriogenik adalah sebagai berikut:

$$\% \text{ kalus membentuk embriogenik} = \frac{\text{Jumlah kalus yang embriogenik}}{\text{Jumlah eksplan berkalus}} \times 100\%$$

3.5.4 Jumlah embrio somatik fase globular per eksplan

Perhitungan jumlah embrio globular per eksplan dilakukan dengan menghitung embrio yang terbentuk dari setiap eksplan yang ada dalam botol kultur. Pengamatan ini dilengkapi juga dengan hasil analisis histologinya. Perhitungan jumlah embrio dilakukan pada umur kultur 14 hss, 28 hss, 42 hss, 56 hss, 70 hss, 84 hss, dan 98 hss.

3.5.5 Jumlah nodul pada eksplan

Eksplan diamati terbentuknya nodul baik yang terbentuk dari kalus maupun secara langsung. Perhitungan jumlah nodul dilakukan dengan menghitung jumlah nodul yang terbentuk baik secara langsung maupun yang terbentuk dari kalus pada setiap botol kultur pada umur kultur 42 hss, 56 hss, 70 hss, 84 hss, dan 98 hss.

3.5.6 Jumlah tunas nodular pada eksplan

Nodul yang sebelumnya terbentuk akan menjadi bakal atau calon tunas-tunas baru yang lebih banyak dari tunas asal yang terbentuk langsung dari potongan biji. Tunas yang terbentuk ditandai dengan adanya tonjolan runcing berwarna hijau pada permukaan nodul dengan panjang sekitar ± 2 mm. Perhitungan jumlah tunas nodular dilakukan pada umur kultur 42 hss, 56 hss, 70 hss, 84 hss, dan 98 hss.