BAB III
METODE PENELTIAN

3.1. Tempat dan waktu percobaan

Percobaan dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Tasikmalaya pada bulan April sampai Agustus 2023.

3.2. Alat dan bahan percobaan

Alat yang digunakan adalah *Laminar air-flow* (LAF), *Autoclave*, *magnetic hotplate stirrer,* rak, *shaker,* botol-botol kultur, erlenmeyer, timbangan analitik, gelas ukur, *beaker glass, thermohygrometer*, mikropipet, mikropipet tip, *scalpel,* gunting bedah, pinset, *puncher* pelubang kertas berdiameter 0,6 cm, spatula, pipet tetes, pipet ukur, lampu bunsen, kompor, tabung gas, plastik wrap, label, tisu, dan alat tulis.

Eksplan yang digunakan berasal dari daun cengkeh dari bibit umur enam bulan. Bahan kimia yang digunakan adalah larutan Murashige dan Skoog (MS), 2,4-*Dichlorophenoxyacetic Acid* (2,4-D), Air kelapa, Myo-inositol, vitamin (Nicotine acid, Pyridoxine HCl, Thiamine HCl, Glycine), akuades, sukrosa, unsur makronutrient dan makronutrient, alkohol 70%, alkohol 96%, natrium hipoklorit (NaOCl) 10% dan 30%, detergen, bakterisida 2 g/L, fungisida 2 g/L, natrium hidroksida (NaOH), hidrogen klorida (HCl), Spirtus, *phytagel,* dan pH indikator universal.

3.3. Metode peneltian

Percobaan ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan mengkombinasikan dua faktor perlakuan, faktor pertama adalah 2,4-D (K) dengan 4 taraf konsentrasi yaitu:

k1 = 0,5 ppm

k2 = 1 ppm

k3= 1,5 ppm

k4 = 2 ppm

3) Setelah semua bahan terlarut sempurna, dilakukan peneraan volume vitamin menjadi 100 ml menggunakan labu ukur.
4) Larutan stok vitamin yang sudah jadi kemudian dimasukkan ke dalam botol gelas berwarna coklat.
5) Botol gelas berwarna coklat diberi label dan disimpan di dalam lemari pendingin untuk menjaga kualitas.

c. Pembuatan larutan stok Myo-inositol, dilakukan dengan 100 kali konsentrasi yang disesuaikan dengan komposisi media MS dalam 100 ml akuades
d. Pembuatan larutan stok 2,4-D 100 ppm

Pembuatan larutan stok 2,4-D 100 ppm dalam 100 ml aquades dibuat dengan perhitungan yang disajikan pada Lampiran 3, dari perhitungan tersebut ditetapkan bahwa untuk membuat larutan stok 2,4-D 100 ppm dalam 100 ml aquades dibutuhkan 2,4-D 10 mg. Tahapan pembuatannya sebagai berikut:

1) Hormon 2,4-D ditimbang sebanyak 10 mg.
2) 2,4-D yang telah ditimbang dilarutkan dengan menambahkan akuades steril hingga volume 100 ml.
3) Larutan stok 2,4-D yang sudah larut dalam 100 ml aquades dimasukkan ke dalam botol cokelat dan disimpan di lemari pendingin.

3.4.8. Penyiapan larutan stok air kelapa

Kelapa yang digunakan adalah kelapa muda yang seragam pada pohon dan tandan yang sama. Air kelapa yang digunakan adalah buah kelapa yang daging buahnya tidak terlalu lunak, tetapi juga belum terlalu keras (umur 210–240 hari) (Tuhuteru, Hehanussa, dan Raharjo, 2012). Air kelapa yang ditambahkan dalam media, difilter dengan kertas saring *milipore* sebanyak tiga kali, lalu dimasukkan ke dalam botol yang steril setelah itu ditutup dan dimasukkan ke dalam lemari pendingin (Saepudin, Yulianto, dan Aeni, 2020). Air kelapa yang ditambahkan dalam media dibuat sesuai dengan konsentrasi pada perlakuan dalam persentase dengan perbandingan persentase air kelapa dan aquades dalam volume 100 ml seperti yang disajikan pada Lampiran 4. perhitungan konsentrasi air kelapa.

3.4.9. Pembuatan media MS (Murashige and Skoog)

Volume larutan stok yang diambil untuk 1 liter media didapatkan dengan rumus sebagai berikut (Dwiyani, 2015) : $V_1N_1 = V_2N_2$

Keterangan :

V_1 = volume larutan stok yang akan diambil

V_2 = 1000 ml atau 1 L

N_1 = berat (g)/(mg) senyawa yang disesuaikan dengan kebutuhan komposisi media dalam 1000 mL atau 1 L.

N_2 = berat (mg) senyawa yang disesuaikan dengan kebutuhan komposisi media dalam 1000 mL atau 1 L.

Langkah-langkah pembuatan media MS (Dwiyani, 2015) :

a. Komposisi senyawa tiap media dapat dilihat dalam Tabel 5.
b. Setelah pengambilan tiap larutan stok A, B, C, D E, F, vitamin, Myo-inositol, larutan 2,4-D dan air kelapa sesuai perlakuan, larutan dimasukkan ke dalam erlenmeyer ukuran 1 L.
c. Selanjutnya sukrosa 30 g/L dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan akuades sampai volume 900 ml.
d. Kemudian pH larutan diukur dengan pH meter dan diusahakan pH antara 5,5 sampai 5,8. Jika pH terlalu rendah dinaikkan dengan menambahkan NaOH 0,1 N dan jika pH terlalu tinggi diturunkan dengan menambahkan HCl 0,1 N.
e. *Phytagel* 8 g/L dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian tambahkan akuades sampai 1 L.
f. Sambil diaduk medium yang berisi larutan media dipanaskan hingga suhu 80°C kemudian masukan kurang lebih 25 ml (sesuai dengan volume botol) ke dalam botol kultur dan tutup rapat dengan penutup botol.
g. Label yang bertuliskan jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan, diberikan pada setiap botol.
h. Sterilisasi media kemudian dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 psi selama kurang lebih 20 menit.

i. Botol kultur yang sudah disterilisasi dengan autoklaf, selanjutnya dikeluarkan dari autoklaf dan disimpan di ruang penyimpanan.

3.4.10. Sterilisasi media kultur

a. Media kultur yang sudah dibuat dituangkan ke dalam botol kultur.
b. Media kultur yang sudah sudah dimasukkan ke dalam botol kultur selanjutnya dimasukkan ke dalam autoklaf untuk disterilisasi dengan suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama kurang lebih 20 menit.
c. Media kultur kemudian didinginkan lalu disimpan di tempat yang steril.

3.4.11. Penanaman eksplan

Penanaman eksplan dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) secara aseptik. Penanaman dilakukan dengan cara menurut Rasud *et al.*, (2019), yaitu eksplan yang sudah disterilisasi diletakkan dalam cawan petri steril. Eksplan tersebut kemudian dipotong-potong dengan bentuk lingkaran menggunakan *puncher* pelubang kertas berdiameter 0,6 cm, kemudian ditanam pada media induksi kalus. Eksplan dimasukkan ke dalam botol media menggunakan pinset steril. Botol ditutup rapat dengan tutup botol yang telah steril, kemudian dilapisi dengan *cling wrap* untuk menghindari masuknya kontaminan ke dalam botol media, kemudian dilakukan pelabelan dan tanggal saat penanaman. Botol-botol kultur yang telah ditanami diinkubasi selama pengamatan pada rak-rak kultur di dalam ruang inkubasi yang memiliki suhu 20°C sampai 22°C dengan intensitas penyinaran sebesar 1000 lux selama 24 jam dalam sehari.

3.5.Variabel pengamatan

3.5.1. Pengamatan penunjang

a. Suhu dan kelembapan

Pengamatan dilakukan setiap hari dengan mencatat suhu dan kelembaban setiap pagi hari menggunakan *thermohigrometer* sejak eksplan ditanam.

b. Persentase kontaminasi

Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung jumlah eksplan yang terkontaminasi oleh jamur dan bakteri setiap satu minggu sekali. Dihitung dengan menggunakan rumus (Sudiyanti, Rusbana, dan Susiyanti, 2017) :

$$\% \text{ kontaminasi} = \sum \frac{eksplan\ terkontaminasi}{\sum total\ eksplan} \times 100\%$$

c. Kondisi umum eksplan daun cengkeh

Pengamatan dilakukan dengan melihat perubahan yang terjadi pada eksplan daun cengkeh, dengan membandingkan pada awal pengamatan (7 HST) dan akhir pengamatan (60 HST).

d. Saat muncul kalus

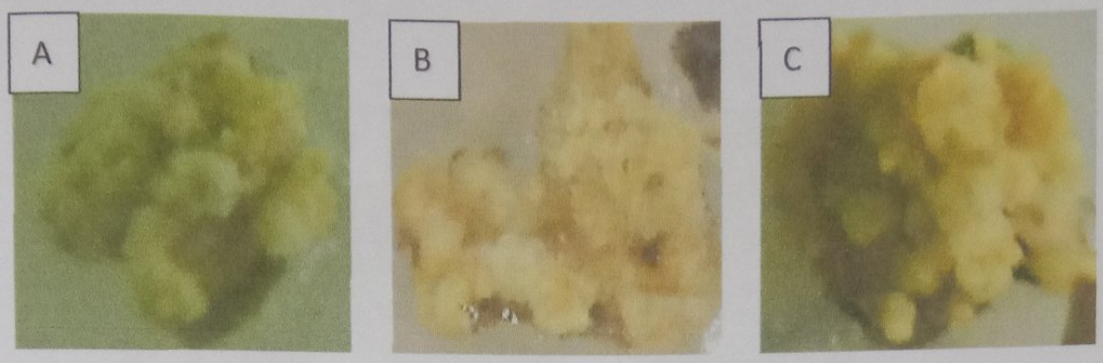
Pengamatan dilakukan setiap hari dengan menghitung hari saat munculnya kalus pertama kali kemudian dirata-ratakan berdasarkan setiap perlakuan dan dinyatakan dalam HST (Hari Setelah Tanam). Pembentukan kalus diawali dengan pembengkakan pada eksplan dan munculnya tonjoloan-tonjolan putih yang saling berjejal pada permukaan eksplan.

3.5.2. Pengamatan utama

a. Tekstur Kalus

Pengamatan tekstur kalus dilaksanakan pada akhir pengamatan dengan mengamati tekstur kalus yang terbentuk. Tekstur kalus merupakan salah satu penanda kualitas suatu kalus yang dikelompokkan menjadi *friable* (remah), intermediet, dan *nonfriable* (kompak) (Gambar 4). Pengamatan tekstur kalus dilakukan dengan menerapkan skoring dimana kalus yang terbentuk dibagi ke dalam 3 tingkatan :

1. : kompak
2. : intermediet
3. : remah



Gambar 4. Contoh Tekstur Kalus. A) Remah, B) Kompak, C) Intermediet

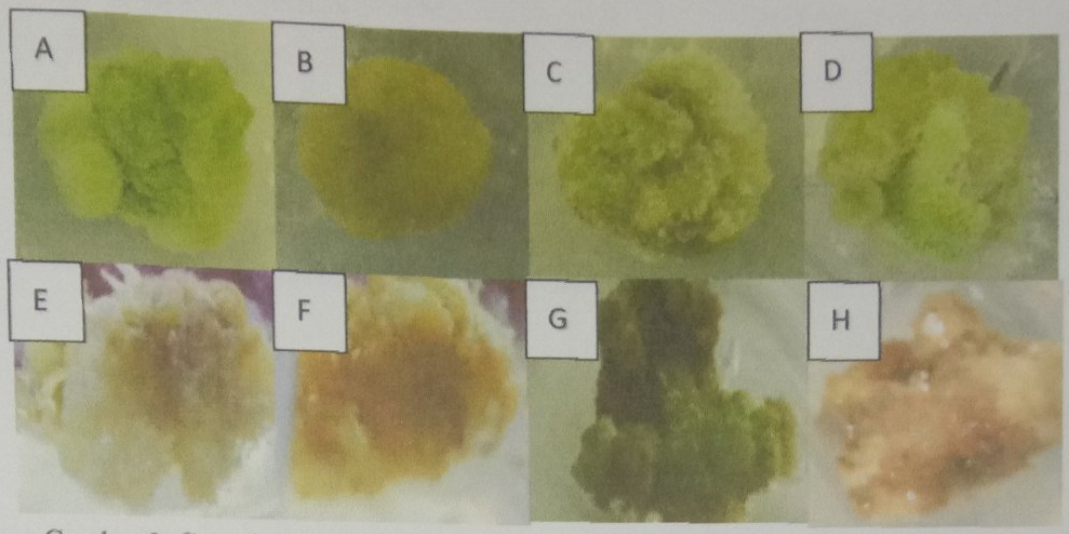
Sumber : Rasud *et al.*, (2019)

Menurut Rasud dan Bustaman (2016); dan Yelnititis (2012) kalus yang baik adalah kalus yang bertekstur remah karena mudah dalam memisahkannya menjadi sel-sel tunggal pada kultur suspensi dalam upaya perbanyakan massa sel. Selanjutnya Rasud dan Bustaman (2016) menyatakan bahwa kalus dengan tekstur kompak sulit untuk dilepaskan dan terlihat padat dan kalus intermediet adalah kalus yang sebagian teksturnya kompak dan lainnya remah. Menurut Indah dan Ermavitalini (2013) kalus yang kompak dianggap baik karena dapat mengakumulasi metabolit sekunder lebih banyak.

b. Warna kalus

Pengamatan warna kalus akan dilaksanakan pada akhir pengamatan dengan mengamati secara visual warna kalus seperti pada Gambar 3 dan menerapkan skoring untuk membantu dalam penentuan warna. Thomy (2012) menyatakan penentuan warna kalus berdasarkan skoring :

1. : coklat,
2. : kuning,
3. : putih kecoklatan,
4. : hijau kecoklatan,
5. : kuning kecoklatan,
6. : hijau kekuningan,
7. : hijau keputihan, dan
8. : hijau



Gambar 3. Contoh warna Kalus. A) Hijau, B) Kuning, C) Hijau Keputihan, D) Hijau Kekuningan, E) Putih Kecoklatan, F) Kuning Kecokletan, G) Hijau Kecokletan, H) Coklat

Sumber : Lizawati dan Desfira (2012), Siahaan, Damanik, dan Bangun (2017), Sinaulan, Lengkong, dan Tulung (2018), Rasud *et al.*, (2019)

Jaringan kalus yang dihasilkan suatu eksplan mampu menghasilkan warna yang berbeda-beda. Menurut Yelnitis (2012) kalus yang baik adalah kalus yang memiliki warna hijau, karena mengindikasikan kandungan klorofil yang banyak. Adapun menurut Mahadi *et al,* (2016), kalus dengan warna pigmen putih dan kekuningan yang merupakan kalus yang bersifat embriogenik, dan warna coklat yang menandakan kemunduran fisiologis akibat kekurangan unsur hara atau hormon dan juga disebabkan oleh metabolisme senyawa fenolik yang bersifat toksik.

c. Persentase eksplan berkalus

Pengamatan dilakukan dengan menghitung dan mempersentasekan jumlah eksplan yang berkalus dengan menggunakan rumus perhitungan (Sudiyanti *et al.*, 2017) :

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