

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimen faktorial karena metode dalam penelitian ini menguji kombinasi perlakuan medium dengan penambahan BAP, NAA, dan air kelapa pada eksplan nodus anggrek terhadap respons pertumbuhan tunas aksilar *Dendrobium sonia*. Rancangan penelitian ini berupa rancangan acak lengkap faktorial (RAL Faktorial) karena faktor lingkungan dan kondisi setiap perlakuan relatif homogen sehingga memungkinkan kombinasi perlakuan diperlakukan secara acak. Penelitian ini terdiri dari 3 faktor yaitu faktor penambahan air kelapa, BAP, dan NAA. Pada penelitian ini terdapat variabel kontrol, variabel bebas, dan variabel terikat yang ditentukan. Variabel kontrol berupa eksplan nodus *Dendrobium sonia*, medium $\frac{1}{2}$ Murashige-Skoog (MS), intensitas cahaya 18 watt, dan suhu ruangan 23°C. Variabel bebas meliputi konsentrasi air kelapa (5%, 10%, dan 15%), konsentrasi BAP (2 ppm dan 3 ppm), serta konsentrasi NAA (0,5 ppm, 1 ppm, dan 1,5 ppm). Variabel terikat pada penelitian ini adalah persentase eksplan bertahan hijau dan persentase tunas aksilar yang terinduksi.

Total keseluruhan perlakuan yaitu 24 perlakuan dengan jumlah pengulangan minimal sebanyak 2 ulangan. Dalam penelitian ini dilakukan sebanyak 3 ulangan. Jumlah minimal ulangan diperoleh berdasarkan rumus Federer (1977) sebagai berikut:

$$\begin{aligned} (t-1)(n-1) &\geq 15 && \text{Keterangan:} \\ (24-1)(n-1) &\geq 15 && t = \text{jumlah perlakuan} \\ 23(n-1) &\geq 15 + 24 && n = \text{jumlah pengulangan} \\ 23n &\geq 39 \\ n &\geq \frac{39}{23} = 1,6 \end{aligned}$$

Kombinasi variasi konsentrasi penambahan BAP, NAA, dan air kelapa disajikan pada Tabel 3.1. Sebanyak 24 kombinasi dengan variasi penambahan BAP, NAA, dan air kelapa diberi kode dengan huruf B mewakili BAP, N mewakili NAA, dan

AK mewakili air kelapa dengan kode angka merupakan masing-masing konsentrasi yang digunakan. Contohnya, B₂N_{0,5}AK₁₀ adalah perlakuan dengan kombinasi 2 ppm BAP, 0,5 ppm NAA, dan 10% air kelapa. Variasi kombinasi medium tanpa penambahan air kelapa (0%) merupakan kelompok kontrol sedangkan medium dengan penambahan air kelapa (5%, 10%, dan 15%) merupakan kelompok perlakuan.

Tabel 3. 1 Kombinasi medium

BAP (ppm)	NAA (ppm)	Air Kelapa (%)			
		0	5	10	15
2	0,5	B ₂ N _{0,5}	B ₂ N _{0,5} AK ₅	B ₂ N _{0,5} AK ₁₀	B ₁ N _{0,5} AK ₁₅
	1	B ₂ N ₁	B ₂ N ₁ AK ₅	B ₂ N ₁ AK ₁₀	B ₂ N ₁ AK ₁₅
	1,5	B ₂ N _{1,5}	B ₂ N _{1,5} AK ₅	B ₂ N _{1,5} AK ₁₀	B ₂ N _{1,5} AK ₁₅
3	0,5	B ₃ N _{0,5}	B ₃ N _{0,5} AK ₅	B ₃ N _{0,5} AK ₁₀	B ₃ N _{0,5} AK ₁₅
	1	B ₃ N ₁	B ₃ N ₁ AK ₅	B ₃ N ₁ AK ₁₀	B ₃ N ₁ AK ₁₅
	1,5	B ₃ N _{1,5}	B ₃ N _{1,5} AK ₅	B ₃ N _{1,5} AK ₁	B ₃ N _{1,5} AK ₁₅

3.2 Waktu dan lokasi penelitian

Uji determinasi anggrek *Dendrobium sonia* dilakukan pada hari Senin, 6 Januari 2025 di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati (SITH) ITB Kampus Jatinangor pada Lampiran 1. Penelitian dilakukan selama 7 bulan pada bulan Januari hingga Juli 2025. Penelitian dilakukan di Laboratorium Riset Kultur Jaringan FPMIPA B Universitas Pendidikan Indonesia. Tahapan penelitian mulai dari persiapan penelitian, pelaksanaan penelitian, pengumpulan dan interpretasi data, hingga penyusunan skripsi.

3.3 Alat dan bahan penelitian

Alat dan Bahan yang digunakan dalam penelitian terdapat pada Tabel Lampiran 2.

3.4 Persiapan penelitian

3.4.1 Persiapan anggrek

Eksplan nodus didapatkan dari tanaman anggrek *Dendrobium sonia* (Gambar 3.1) yang ditanam dalam pot dengan medium arang. Anggrek *Dendrobium sonia* berasal dari Kebun Grosir Anggrek Lembang Bandung.



Gambar 3. 1 Tanaman anggrek *Dendrobium sonia*

3.4.2 Sterilisasi alat dan akuades

Sterilisasi alat dan akuades bertujuan untuk menghindari terjadinya kontaminasi jamur dan bakteri. Alat yang perlu disterilisasi adalah botol kultur, pinset, *petri dish*, gunting, dan *scalpel*. Botol kultur ditempatkan dengan posisi terbalik dan alat lainnya dibungkus menggunakan kertas (Gambar 3.2). Akuades yang disterilisasi disimpan dalam botol 500 ml dengan penutup plastik tahan panas yang diikat menggunakan karet. Akuades disterilisasi selama 20 menit dan untuk alat serta botol disterilisasi selama 30 menit menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C, tekanan 1,5 atm.



Gambar 3. 2 Sterilisasi alat dan botol kultur

3.4.3 Pembuatan stok larutan

Stok larutan yang dibuat meliputi stok larutan Murashige-skoog (MS), zat pengatur tumbuh (ZPT), dan stok larutan NaOH serta HCl. Penyimpanan stok larutan disimpan di lemari pendingin. Stok larutan digunakan ketika pembuatan medium kultur.

3.4.3.1 Pembuatan stok larutan Murashige-skoog (MS)

3.4.3.1.1 Pembuatan stok larutan makronutrien (100 kali konsentrasi)

Stok larutan makronutrien dibuat dengan menimbang 16,5 gram NH_4NO_3 , 4,4 gram $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3,7 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 19 gram KNO_3 , dan 1,7 gram KH_2PO_4 . Setiap bahan dimasukkan ke dalam masing-masing gelas kimia dan dilarutkan dengan akuades 100 ml hingga homogen menggunakan *stirrer*. Stok larutan dimasukkan ke dalam masing-masing botol steril 250 ml dan diberi label keterangan bahan serta tanggal pembuatan.

3.4.3.1.2 Pembuatan stok larutan mikronutrien (100 kali konsentrasi)

Stok larutan mikronutrien dibuat dengan menimbang 0,62 gram H_3BO_3 , 0,006 gram $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,006 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2,23 gram $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,083 gram KI, 0,025 gram $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, dan 0,86 gram $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Setiap bahan dimasukkan ke dalam masing-masing gelas kimia dan dilarutkan dengan akuades 100 ml hingga homogen menggunakan *stirrer*. Stok larutan dimasukkan ke dalam masing-masing botol steril 250 ml dan diberi label keterangan bahan serta tanggal pembuatan.

3.4.3.1.3 Pembuatan stok larutan zat besi (100 kali konsentrasi)

Stok larutan zat besi dibuat dengan menimbang zat besi 0,373 gram $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan 0,278 gram $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Setiap bahan dimasukkan ke dalam masing-masing gelas kimia dan dilarutkan dengan akuades 100 ml hingga homogen menggunakan *stirrer*. Stok larutan dimasukkan ke dalam masing-masing botol steril 250 ml dan diberi label keterangan bahan serta tanggal pembuatan.

3.4.3.1.4 Pembuatan stok larutan Tiamin (100 kali konsentrasi)

Pembuatan stok larutan Tiamin dimulai dari menimbang 0,01 gram bahan tiamin. Bahan dimasukkan ke dalam gelas kimia lalu dilarutkan dengan akuades 100 ml hingga homogen menggunakan *stirrer*. Larutan dimasukkan ke dalam botol steril gelap berukuran 250 ml, ditutup menggunakan *aluminium foil* dan plastik

serta diikat menggunakan karet. Larutan diberi label keterangan sesuai nama bahan dan tanggal pembuatan.

3.4.3.1.5 Pembuatan stok larutan Piridoksin (100 kali konsentrasi)

Pembuatan stok larutan Piridoksin dimulai dari menimbang 0,01 gram pyridoxin dari stok bahan. Bahan dimasukkan ke dalam gelas kimia lalu dilarutkan dengan akuades 100 ml hingga homogen menggunakan *stirrer*. Larutan dimasukkan ke dalam botol steril gelap berukuran 250 ml, ditutup menggunakan *alumunium foil* dan plastik serta diikat menggunakan karet. Larutan diberi label keterangan sesuai nama bahan dan tanggal pembuatan.

3.4.3.1.6 Pembuatan stok larutan Niasin (100 kali konsentrasi)

Pembuatan stok larutan Niasin dimulai dari menimbang 0,05 gram bahan stok niasin. Bahan dimasukkan ke dalam gelas kimia lalu dilarutkan dengan akuades 100 ml hingga homogen menggunakan *stirrer*. Larutan dimasukkan ke dalam botol steril gelap berukuran 250 ml, ditutup menggunakan *alumunium foil* dan plastik serta diikat dengan karet. Larutan diberi label keterangan sesuai nama bahan dan tanggal pembuatan.

3.4.3.1.7 Pembuatan stok larutan Mio-inositol (100 kali konsentrasi)

Pembuatan stok larutan Mio-inositol dimulai dari menimbang 1 gram Mio-inositol dari stok bahan. Bahan dimasukkan ke dalam gelas kimia lalu dilarutkan dengan akuades 100 ml hingga homogen menggunakan *stirrer*. Larutan dimasukkan ke dalam botol steril gelap berukuran 250 ml, ditutup menggunakan *alumunium foil* dan plastik serta diikat dengan karet. Larutan diberi label keterangan sesuai nama bahan dan tanggal pembuatan.

3.4.3.1.8 Pembuatan stok larutan Glisin (100 kali konsentrasi)

Pembuatan stok larutan Glisin dimulai dari menimbang 0,2 gram glisin dari stok bahan. Bahan dimasukkan ke dalam gelas kimia lalu dilarutkan dengan akuades 100 ml hingga homogen menggunakan *stirrer*. Larutan dimasukkan ke dalam botol steril gelap berukuran 250 ml, ditutup menggunakan *alumunium foil* dan plastik serta diikat menggunakan karet. Larutan diberi label keterangan nama bahan dan tanggal pembuatan.

3.4.3.2 Pembuatan stok larutan zat pengatur tumbuh (ZPT)

3.4.3.2.1 Pembuatan stok larutan BAP (200 ppm)

Pembuatan stok larutan BAP dimulai dari menimbang 0,02 gram BAP dari stok bahan. Bahan dimasukkan ke dalam gelas kimia lalu dilarutkan dengan akuades 100 ml hingga homogen menggunakan *stirrer*. Larutan dimasukkan ke dalam botol steril gelap berukuran 250 ml, ditutup menggunakan *aluminium foil* dan plastik serta diikat dengan karet. Larutan diberi label keterangan sesuai nama bahan dan tanggal pembuatan.

3.4.3.2.2 Pembuatan stok larutan NAA (200 ppm)

Pembuatan stok larutan BAP dimulai dari menimbang 0,02 gram BAP dari stok bahan. Bahan dimasukkan ke dalam gelas kimia dan ditambahkan alkohol 96% hingga larut. Akuades 100 ml ditambahkan ke *gelas kimia* dan dihomogenkan menggunakan *stirrer*. Larutan dimasukkan ke dalam botol steril gelap berukuran 250 ml, ditutup menggunakan *aluminium foil* dan plastik serta diikat dengan karet. Larutan diberi label keterangan sesuai nama bahan dan tanggal pembuatan.

3.4.3.3 Pembuatan stok larutan NaOH

Pembuatan stok larutan NaOH dimulai dari menimbang 0,04 gram NaOH dari stok bahan. Bahan dimasukkan ke dalam gelas kimia lalu dilarutkan dengan akuades 100 ml hingga homogen menggunakan *stirrer*. Larutan dimasukkan ke dalam botol steril gelap berukuran 250 ml, ditutup menggunakan *aluminium foil* dan plastik serta diikat dengan karet. Larutan diberi label keterangan sesuai nama bahan dan tanggal pembuatan.

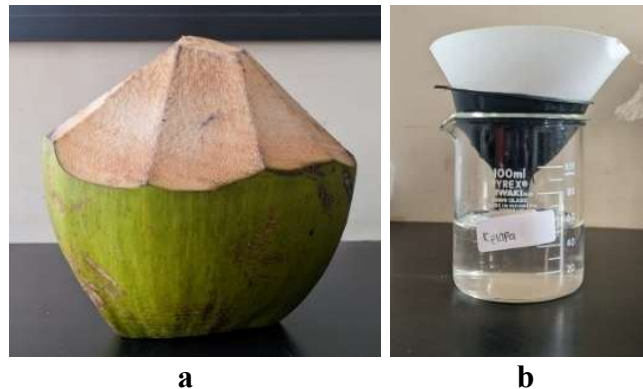
3.4.3.4 Pembuatan stok larutan HCl

Pembuatan stok larutan HCl dimulai dari menimbang 0,83 ml dari HCl pekat. Bahan dimasukkan ke dalam gelas kimia lalu dilarutkan dengan akuades 100 ml hingga homogen menggunakan *stirrer*. Larutan dimasukkan ke dalam botol steril gelap berukuran 250 ml, ditutup menggunakan *aluminium foil* dan plastik serta diikat dengan karet. Larutan diberi label keterangan sesuai nama bahan dan tanggal pembuatan.

3.4.4 Pembuatan medium kultur

3.4.4.1 Persiapan air kelapa

Kelapa yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelapa muda (*Cocos nucifera* L.). Kelapa dipotong dan air kelapa dimasukkan ke dalam gelas kimia 500 ml. Air kelapa dan disaring menggunakan kertas saring Whatmann no.1 (Gambar 3.4b).



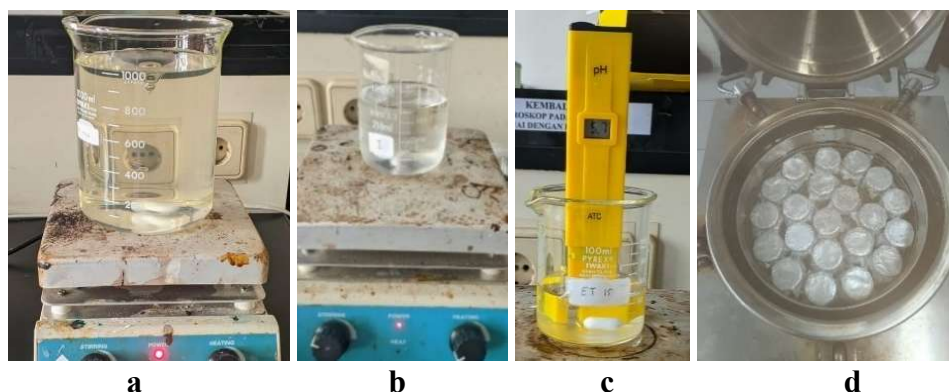
Gambar 3. 3 Persiapan air kelapa (a) kelapa yang digunakan dan (b) penyaringan air kelapa.

3.4.4.2 Pembuatan medium

Sukrosa ditimbang sebanyak 30 gram untuk pembuatan 1 liter medium $\frac{1}{2}$ MS. Sukrosa dilarutkan dalam akuades 200 ml menggunakan *magnetic stirrer*. setiap larutan komposisi MS dari stok yang telah dibuat, mencakup makronutrien, mikronutrien, Zat besi, Vitamin, dan Glisin. Akuades ditambahkan hingga 1 liter dan dihomogenkan (Gambar 3.4a).

Larutan medium $\frac{1}{2}$ MS dibagi ke dalam 2 gelas kimia masing-masing sebanyak 500 ml. Masing-masing ditambahkan 2 ppm BAP (5 ml) dan 3 ppm BAP (7,5 ml) dan dihomogenkan. Larutan $\frac{1}{2}$ MS yang sudah ditambahkan BAP dibagi ke dalam 3 gelas kimia sebanyak 150 ml untuk ditambahkan NAA. Masing-masing ditambahkan 0,5 ppm NAA (0,4 ml), 1 ppm NAA (0,8 ml), dan 1,5 ppm NAA (1,2 ml) lalu larutan dihomogenkan (Gambar 3.4b). Larutan yang sudah homogen ditambahkan air kelapa dengan 3 taraf konsentrasi: 5% (2,5 ml); 10% (5 ml); 15% (7,5 ml). Air kelapa ditambahkan dengan larutan medium yang sudah dihomogenkan dengan BAP dan NAA pada masing-masing perlakuan dan larutan digenapkan menjadi 50 ml.

Setiap variasi perlakuan medium dilakukan pengukuran pH menggunakan pH meter (Gambar 3.4c). Rentang pH yang optimal untuk medium kultur jaringan anggrek antara 5,6-5,8. Apabila pH larutan di bawah rentang optimal (terlalu asam) maka perlu ditambahkan NaOH 0,1N hingga mencapai pH optimal. Sebaliknya, jika pH larutan di atas rentang optimal (terlalu basa) maka diberikan larutan HCl 0,1N hingga pH optimal. Larutan dengan pH yang sudah optimal selanjutnya ditambahkan bahan pematat berupa agar sebanyak 0,35 g untuk setiap 50 ml larutan medium. Larutan medium diaduk dan dipanaskan menggunakan *hotplate* hingga homogen dan mendidih. Medium dimasukkan ke botol kultur steril masing-masing sebanyak 10 ml. Medium dalam botol ditutup dengan alumunium foil dan plastik tahan panas, diikat dengan karet gelang untuk kemudian proses sterilisasi. Autoklaf dipastikan telah diisi dengan akuades. Medium dimasukkan ke dalam autoklaf dan ditutup dengan rapat. Sterilisasi dilakukan pada suhu di 121°C, tekanan 1,5 atm selama 20 menit (Gambar 3.4d). Medium yang sudah disterilisasi disimpan di lemari kultur.

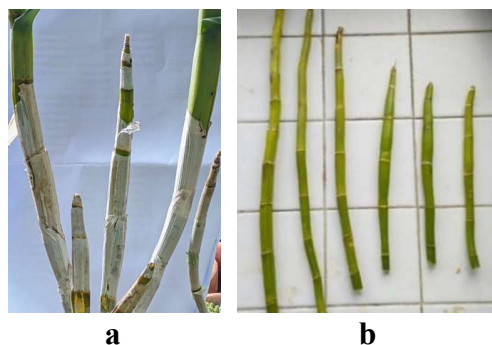


Gambar 3. 4 Pembuatan medium (a) homogenisasi larutan 1 liter, (b) homogenisasi larutan MS + BAP + NAA, (c) pengukuran pH larutan, dan (d) sterilisasi medium kultur

3.5 Pelaksanaan penelitian

3.5.1 Pemilihan eksplan

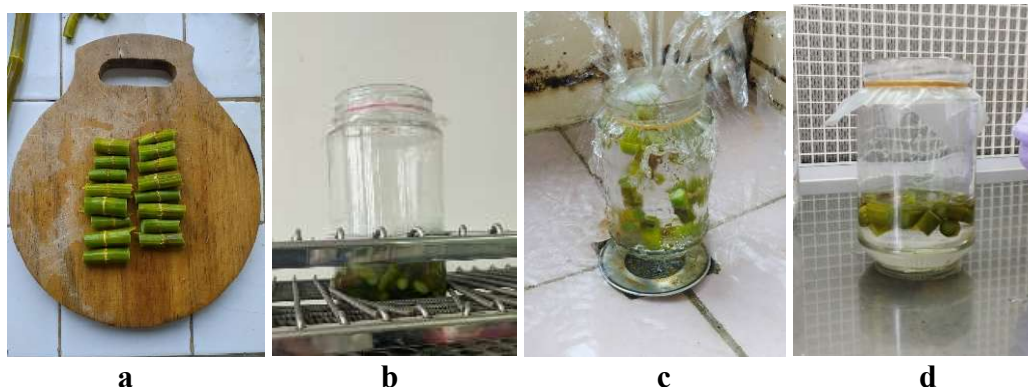
Kulit yang melapisi batang (Gambar 3.5a) dibuang dari batang. Eksplan yang digunakan dalam penelitian adalah nodus anggrek *Dendrobium sonia* yang berwarna hijau (Gambar 3.5b).



Gambar 3. 5 Pemilihan eksplan (a) kulit yang melapisi batang dan (b) eksplan yang digunakan.

3.5.2 Sterilisasi eksplan

Batang dicuci dengan deterjen cair dan digosok menggunakan sikat gigi bersih dan dibilas dengan air mengalir. Batang dipotong untuk mendapatkan bagian nodus (Gambar 3.6a). Nodus dimasukkan ke dalam botol steril dan direndam dengan larutan deterjen bubuk (0,2%) selama 5 menit pada *shaker* (Gambar 3.6b). Eksplan dicuci dengan air mengalir selama 20 menit (Gambar 3.6c). Eksplan dibilas menggunakan akuades steril sebanyak 3 kali. Sterilisasi dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Sebelum digunakan, LAF disterilkan dengan sinar Ultra Violet (UV) selama 30 menit. Saat penggunaan LAF, blower dinyalakan dengan kondisi lampu LAF menyala. Eksplan direndam pada larutan NaOCl 10% yang diberi tween-20 sebanyak 2-3 tetes digoyangkan selama 10 menit. Eksplan dibilas menggunakan akuades steril sebanyak 3 kali. Larutan HgCl₂ (0,3%) dibuat dengan melarutkan 0,03 gram HgCl₂ dalam 100 ml akuades. Eksplan direndam dalam HgCl₂ selama 20 menit dan botol digoyangkan. Dibilas kembali dengan akuades steril hingga bersih sebanyak 3 kali.



Gambar 3. 6 Tahap sterilisasi eksplan (a) eksplan yang sudah dipotong, (b) perendaman dengan deterjen (c) dialiri air mengalir, dan (d) perendaman larutan NaOCl 10%.

3.5.3 Penanaman eksplan

Penanaman eksplan dilakukan di dalam LAF dengan kondisi aseptik. Bunsen diletakkan di dalam LAF dan dinyalakan. Alat-alat yang digunakan untuk penanaman yaitu cawan petri, pinset, dan *scalpel* yang disemprot alkohol 96%. *Petri dish* yang sudah disemprot alkohol dipanaskan di atas api bunsen. Pinset dan *scalpel* disimpan di dalam botol steril yang berisi alkohol 96%. Setiap sebelum dan setelah penggunaan pinset dan scalpel terlebih dahulu dipanaskan diatas api bunsen agar tidak terjadi kontaminasi. Penanaman eksplan dimulai dengan mengeringkan eksplan dan memotong secara transversal sebagian batang yang menguning akibat sterilisasi pada bagian atas dan bawah nodus (Gambar 3.7). Hal yang serupa dilakukan pada masing-masing 24 kombinasi perlakuan. Botol kultur ditutup dan diikat kembali dengan rapat. Botol kultur disemprot dengan alkohol 96%, disimpan pada lemari di ruang kultur dengan kondisi aseptik yang terpapar sinar lampu dengan intensitas cahaya 18 watt pada suhu 23°C.



Gambar 3. 7 Penanaman eksplan

3.6 Teknik pengumpulan data

Pengumpulan data dilakukan dengan pengamatan respons eksplan tunas aksilar dengan interval waktu pengamatan satu minggu. Hasil pengamatan didokumentasikan dan dicatat. Dihitung persentase respons eksplan yang bertahan hijau dan *browning*, merespons pertumbuhan induksi tunas aksilar, serta merespons induksi akar dengan rumus sebagai berikut:

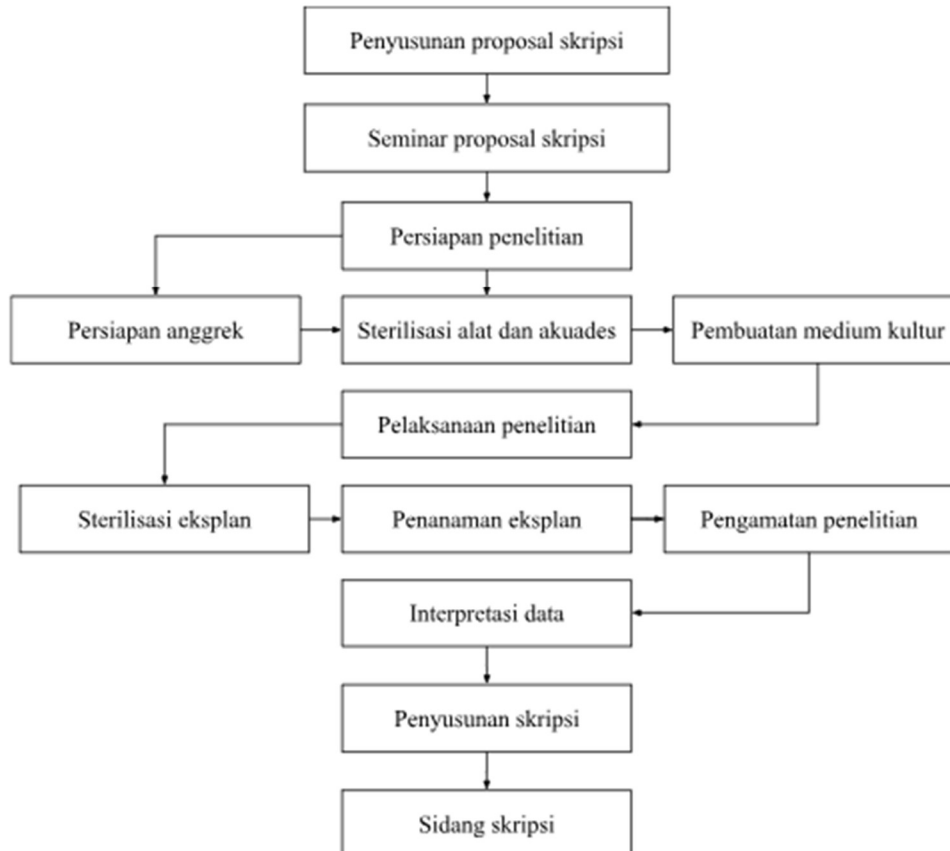
$$\% \text{ Bertahan hijau} = \frac{\text{Eksplan bertahan hijau}}{\text{Seluruh eksplan}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Browning} = \frac{\text{Eksplan browning}}{\text{Seluruh eksplan}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Induksi tunas} = \frac{\text{Eksplan menginduksi tunas}}{\text{Eksplan bertahan hijau}} \times 100\%$$

3.7 Alur penelitian

Alur penelitian yang dilakukan terdapat pada Gambar 3.8.



Gambar 3. 8 Alur penelitian skripsi