

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimen. Pada penelitian ini dicari kombinasi dan konsentrasi auksin dan sitokinin yang paling optimum dalam menginduksi *Protocorm Like Body* (PLB) Anggrek *Dendrobium Sonia* (Tabel 3.1). Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap dengan melakukan *plotting* secara acak botol kultur yang digunakan dalam penelitian (Tabel 3.2). Rancangan ini terdiri dari tiga variabel penelitian. Variabel-variabel yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Variabel kontrol: Medium Murashige-Skoog (MS), suhu kamar, intensitas cahaya (20 watt *tubular lamp*), dan lama penyinaran periode 12 jam.
2. Variabel bebas: Komposisi konsentrasi zat pengatur tumbuh yang berbeda.
 - a) Auksin : 2,4-D (0.5, 1, 1.5 atau 2 ppm) dan NAA (0.5 atau 1 ppm)
 - b) Sitokinin : BAP (1, 5 atau 10 ppm)
3. Variabel terikat: Jumlah PLB Anggrek *Dendrobium Sonia* yang berhasil terinduksi.

Tabel 3.1 Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh

	Konsentrasi (ppm)	BAP		
		1	5	10
2,4-D	0.5	A	B	C
	1	D	E	F
	1.5	G	H	I
	2	J	K	L
NAA	0.5	M	N	O
	1	P	Q	R

Untuk perlakuan penggunaan medium kultur dilakukan dengan 18 perlakuan dengan kode kombinasi A sampai R dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.

Adapun jumlah pengulangan didasarkan pada perhitungan Rumus Federer (1977):

$$\begin{array}{ll} (t-1)(n-1) & \geq 15 \\ (18-1)(n-1) & \geq 15 \\ (17)(n-1) & \geq 15 \\ 17n & \geq 15+17 \\ 17n & \geq 32 \\ n & \geq 1.88 \end{array}$$

Keterangan :
t = Jumlah Perlakuan
n = Jumlah pengulangan

Tabel 3.2 Rancangan *Plotting* Botol Kultur

O ₁	F ₂	F ₁	E ₃	H ₁	P ₂	P ₃	Q ₃	M ₂
N ₂	R ₂	I ₂	K ₁	C ₂	L ₁	E ₂	I ₃	K ₃
M ₁	N ₃	C ₁	Q ₂	H ₃	D ₁	G ₂	D ₂	B ₃
Q ₁	J ₃	E ₁	A ₃	F ₃	B ₂	H ₂	R ₁	L ₂
G ₃	R ₃	I ₂	I ₁	C ₃	M ₃	O ₃	N ₁	L ₃
A ₂	P ₁	J ₂	D ₃	J ₁	A ₁	O ₂	B ₁	K ₂

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama sembilan bulan, dimulai pada bulan November 2019 sampai Juli 2020. Pengambilan dan penyusunan data primer dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Botani, FPMIPA, Universitas Pendidikan Indonesia.

3.3 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1. Komposisi medium MS yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.4 Populasi dan Sampel

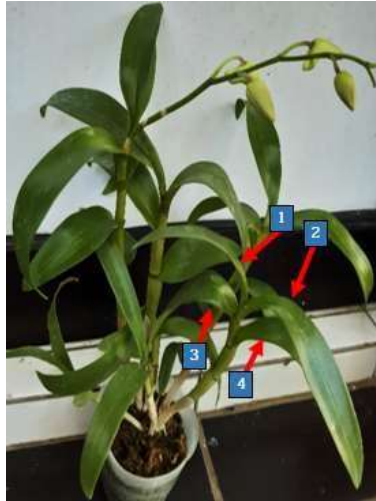
Populasi dalam penelitian ini adalah Anggrek *Dendrobium* Sonia di Kota Bandung. Sampel yang digunakan adalah Anggrek *Dendrobium* Sonia di wilayah Cihideung.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan Pelaksanaan

3.5.1.1 Persiapan Eksplan

Tahap persiapan diawali dengan studi lapangan, diantaranya adalah observasi lokasi tanaman anggrek *Dendrobium* Sonia. Tanaman anggrek *Dendrobium* Sonia didapatkan dari wilayah Cihideung, Kabupaten Bandung Barat. Eksplan yang digunakan dalam penelitian adalah daun ke-1 sampai ke-4 dari apeks pucuk tanaman anggrek *Dendrobium* Sonia yang telah berumur satu tahun (Gambar 3.1).



Gambar 3.1 Eksplan Daun yang digunakan dalam Penelitian

3.5.1.2 Pembuatan Stok Larutan

3.5.1.2.1 Larutan Stok Makronutrien = 100 ml (10 kali konsentrasi)

Pembuatan larutan stok makronutrien 100 ml untuk 10 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang NH_4NO_3 sebanyak 16.5 gram, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 4.4 gram, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 3.7 gram, KNO_3 19 gram, dan KH_2PO_4 sebanyak 1.7 gram. Masing-masing zat dimasukkan ke dalam gelas ukur dan masing-masing dilarutkan dengan 100 ml akuades. Larutan dipindahkan ke dalam gelas piala dan diaduk menggunakan *stirrer*. Setelah larut, masing-masing larutan dipindahkan ke dalam botol gelap ukuran 250ml dan ditutup rapat menggunakan alumunium foil. Botol diberi label sesuai dengan nama bahan masing-masing dengan tanggal pembuatannya. Penggunaan masing-masing bahan untuk membuat 1 L medium $\frac{1}{2}$ MS sebanyak 5 ml.

3.5.1.2.2 Larutan Stok Zat Besi = 100 ml (100 kali konsentrasi)

Pembuatan larutan stok zat besi 100 ml untuk 100 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang Na_2EDTA sebanyak 0.373 gram dan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0.278 gram. Kedua bahan tersebut dimasukkan ke dalam gelas ukur dan dilarutkan dengan 100 ml akuades. Larutan dipindahkan ke dalam gelas piala dan diaduk menggunakan *stirrer*. Setelah larut, larutan dipindahkan ke dalam botol gelap ukuran 250ml, dan ditutup rapat menggunakan alumunium foil dan diberi label 'Stok Zat Besi' beserta tanggal pembuatannya. Penggunaan bahan untuk membuat 1 L medium sebanyak 10 ml.

3.5.1.2.3 Larutan Stok Mikronutrien = 100 ml (1000 kali konsentrasi)

Pembuatan larutan stok mikronutrien 100 ml untuk 1000 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang H_3BO_3 sebanyak 6.2 gram, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ sebanyak 0.025 gram, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ sebanyak 0.025 gram, $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ sebanyak 22.3 gram, KI sebanyak 0.83 gram, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ sebanyak 0.25 gram dan $ZnSO_4 \cdot 4H_2O$ sebanyak 8.6 gram. Seluruh zat dimasukkan ke dalam gelas ukur dan dilarutkan dengan 100 ml akuades. Larutan dipindahkan ke dalam gelas piala dan diaduk menggunakan *stirrer*. Setelah larut, larutan dipindahkan ke dalam botol gelap ukuran 250 ml dan ditutup rapat menggunakan aluminium foil. Botol diberi label 'Stok Mikronutrien' beserta tanggal pembuatannya. Penggunaan bahan untuk membuat 1 L medium $\frac{1}{2}$ MS sebanyak 0,05 ml.

3.5.1.2.4 Larutan Stok Glisin = 100 ml (100 kali konsentrasi)

Pembuatan larutan stok glisin 100 ml untuk 100 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang glisin sebanyak 0.2 gram. Bahan tersebut dimasukan ke dalam gelas ukur dan dilarutkan dengan alkohol 95% sebanyak 100 ml. Larutan dipindahkan ke dalam gelas piala dan diaduk menggunakan *stirrer*. Setelah larut, larutan dipindahkan ke dalam botol gelap ukuran 250 ml dan ditutup rapat menggunakan aluminium foil. Botol diberi label 'Stok Glisin' beserta tanggal pembuatannya. Penggunaan bahan untuk membuat 1 L medium adalah sebanyak 1 ml.

3.5.1.2.5 Larutan Stok Myo-inositol = 100 ml (10 kali konsentrasi)

Pembuatan larutan stok myo-inositol 100 ml untuk 10 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang myo-inositol sebanyak 1 gram. Bahan tersebut dimasukan ke dalam gelas ukur dan dilarutkan dengan alkohol 95% sebanyak 100 ml. Larutan dipindahkan ke dalam gelas piala dan diaduk menggunakan *stirrer*. Setelah larut, larutan dipindahkan ke dalam botol gelap ukuran 250 ml dan ditutup rapat menggunakan aluminium foil. Botol diberi label 'Stok Myo-inositol' beserta tanggal pembuatannya. Penggunaan bahan untuk membuat 1 L medium sebanyak 10 ml.

3.5.1.2.6 Larutan Stok Asam Nikotin = 100 ml (100 kali konsentrasi)

Pembuatan larutan stok asam nikotin 100 ml untuk 100 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang asam nikotin sebanyak 0.05 gram. Bahan tersebut dimasukan ke dalam gelas ukur dan dilarutkan dengan alkohol 95% sebanyak 100 ml. Larutan dipindahkan ke dalam gelas piala dan diaduk menggunakan *stirrer*. Setelah larut, larutan dipindahkan ke dalam botol gelap ukuran 250 ml dan ditutup rapat menggunakan alumunium foil. Botol diberi label ‘Stok Asam Nikotin’ beserta tanggal pembuatannya. Penggunaan bahan untuk membuat 1 L medium sebanyak 1 ml.

3.5.1.2.7 Larutan Stok Pyridoxin = 100 ml (100 kali konsentrasi)

Pembuatan larutan stok pyridoxin 100 ml untuk 100 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang pyridoxin sebanyak 0.05 gram. Bahan tersebut dimasukan ke dalam gelas ukur dan dilarutkan dengan alkohol 95% sebanyak 100 ml. Larutan dipindahkan ke dalam gelas piala dan diaduk menggunakan *stirrer*. Setelah larut, larutan dipindahkan ke dalam botol gelap ukuran 250 ml dan ditutup rapat menggunakan alumunium foil. Botol diberi label ‘Stok Pyridoxin’ beserta tanggal pembuatannya. Penggunaan bahan untuk membuat 1 L medium sebanyak 1 ml.

3.5.1.2.8 Larutan Stok Thiamin = 100 ml (100 kali konsentrasi)

Pembuatan larutan stok thiamin 100 ml untuk 100 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang thiamin sebanyak 0.01 gram. Bahan tersebut dimasukan ke dalam gelas ukur dan dilarutkan dengan alkohol 95% sebanyak 100 ml. Larutan dipindahkan ke dalam gelas piala dan diaduk menggunakan *stirrer*. Setelah larut, larutan dipindahkan ke dalam botol gelap ukuran 250 ml dan ditutup rapat menggunakan alumunium foil. Botol diberi label ‘Stok Thiamin’ beserta tanggal pembuatannya. Penggunaan bahan untuk membuat 1 L medium sebanyak 1 ml.

3.5.1.3 Pembuatan Medium Kultur

Pembuatan medium kultur dilakukan setelah pembuatan larutan stok untuk makronutrien, mikronutrien, zat besi, vitamin, asam amino, polyol dan larutan stok untuk masing-masing zat pengatur tumbuh (Gambar 3.2 B). Menurut Arditti dan Ernst (1992), komponen untuk menginduksi *Protocorm Like Body* (PLB) dari

eksplan daun Anggrek *Dendrobium* sp. yaitu menggunakan Medium Murashige-Skoog (MS) (Lampiran 2). Medium yang digunakan pada penelitian merupakan medium dengan konsentrasi $\frac{1}{2}$ makronutrien dan $\frac{1}{2}$ mikronutrien. Medium tersebut ditambahkan kombinasi zat pengatur tumbuh auksin (NAA atau 2,4-D) dan sitokinin (BAP).



Gambar 3.2 Pembuatan Medium Kultur

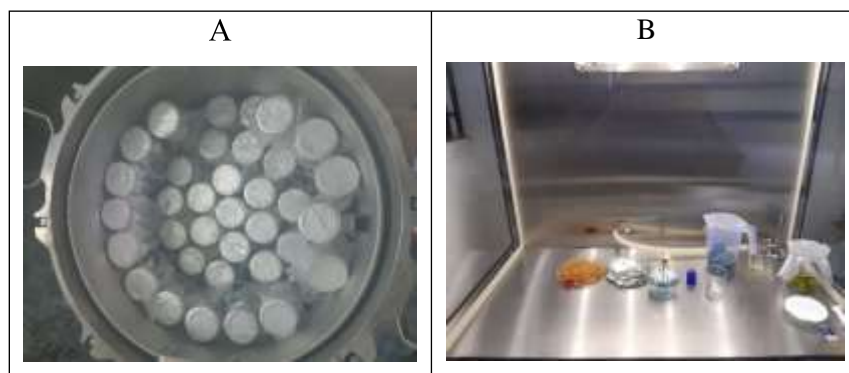
A. Botol medium kultur; B. Larutan stok makronutrien, mikronutrien, zat besi, vitamin, asam amino, polyol dan larutan stok untuk masing-masing zat pengatur tumbuh; C. Akuades; D. Larutan HCl dan NaOH untuk mengatur pH; E. Medium yang sedang dipanaskan; F. Botol kultur berisi medium yang siap disterilisasi dalam autoklaf

Untuk membuat 18 kombinasi, diperlukan sebanyak 2 liter medium $\frac{1}{2}$ MS. Seluruh larutan stok dicampur dalam dua *beaker glass* berukuran 1 liter, ditambahkan sukrosa masing-masing 30 g/l, diaduk hingga larut dan ditambahkan akuades hingga 200 ml. Medium dimasukkan ke dalam 18 *beaker glass* berukuran 50 ml masing-masing 20 ml, ditambahkan berbagai kombinasi zat pengatur

tumbuh, yaitu 2,4-D (0.5, 1, 1.5 atau 2 ppm), NAA (0,5 atau 1 ppm), dan BAP (1, 5 atau 10 ppm) (Tabel 3.1) dan diberi keterangan kombinasi pada label. Medium digunakan dengan menambahkan akuades hingga volume mencapai 100 ml untuk setiap kombinasi (Gambar 3.2 C) dan diukur pH dengan menggunakan pH meter sebesar 5.6-5.8. Medium ditambahkan 0,1 N NaOH dan atau 0,1 N HCl untuk mengatur pH (Gambar 3.2 D). Setelah pH yang diinginkan tercapai, dimasukkan agar-agar sebanyak 7 g/l ke setiap kombinasi medium. Medium dipanaskan menggunakan *hot plate* sampai seluruh agar larut (Gambar 3.2 E), medium dituangkan ke dalam masing-masing botol kultur sebanyak 10 ml (Gambar 3.2 A). Botol ditutup dengan *aluminium foil*, diikat dengan karet (Gambar 3.2 F) dan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Medium disimpan dalam ruang steril dengan kondisi gelap pada suhu kamar sampai digunakan.

3.5.1.4 Sterilisasi Alat

Alat yang digunakan pada penelitian adalah alat yang sudah disterilisasi untuk meminimalkan kontaminasi terhadap objek penelitian. Alat *dissecting set* (scalpel dan pinset), alat-alat gelas dan logam dicuci dan dibilas dengan air bersih beberapa kali, lalu dikeringkan. Semua alat dibungkus menggunakan kertas dan dimasukkan ke dalam plastik tahan panas, disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C pada tekanan 1 atm selama 15 menit (Gambar 3.3 A). Pada saat penanaman, alat-alat *dissecting set* disterilisasi kembali menggunakan alkohol 70% dan dibakar dengan nyala api spiritus setiap kali akan digunakan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) (Gambar 3.3 B).



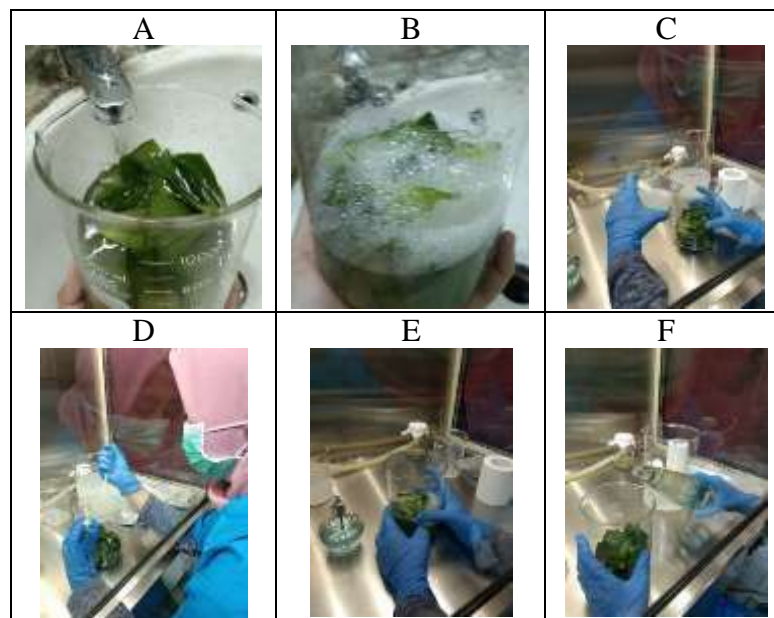
Gambar 3.3 Sterilisasi Alat

A. Sterilisasi alat di dalam autoklaf dengan suhu 120°C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit; B. Alat yang digunakan untuk penanaman di dalam LAF

3.5.2 Pelaksanaan Eksperimen Penelitian

3.5.2.1 Sterilisasi dan Penanaman Eksplan

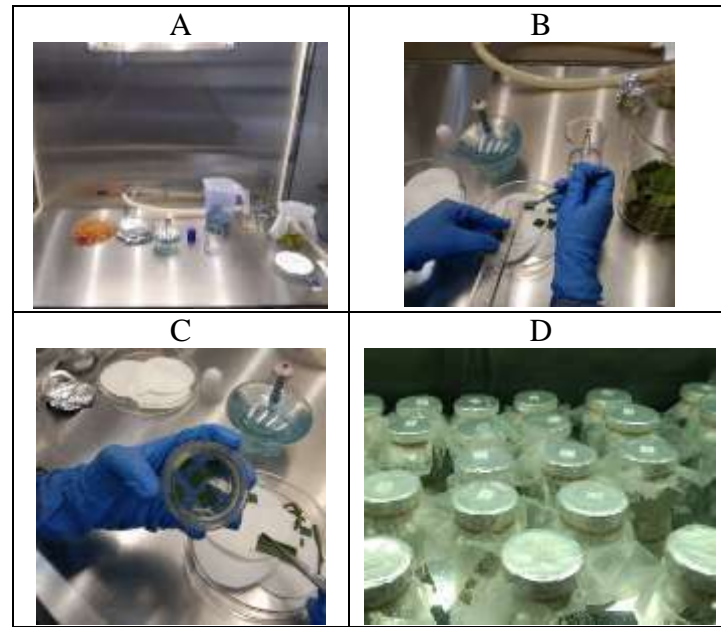
Eksplan daun ke-1 sampai daun ke-4 diambil dan dimasukkan ke dalam *beaker glass* untuk dilakukan proses sterilisasi. Eksplan dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir selama satu jam (Gambar 3.4 A) dan kemudian direndam menggunakan detergen 2% selama 10 menit (Gambar 3.4 B). Eksplan dibilas dengan air mengalir sebanyak 3 kali sampai bau detergen hilang. Sterilisasi selanjutnya dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* untuk meminimalkan tingkat kontaminasi pada eksplan. Eksplan yang sudah dicuci dan disterilisasi dengan detergen, dimasukkan ke dalam larutan agrep (bakterisida), dikocok selama 20 menit dan dibilas kembali dengan akuades. Eksplan dimasukkan ke dalam larutan benstar (fungisida), lalu dikocok 20 menit dan dibilas kembali dengan akuades (Gambar 3.4 C). Eksplan ditetesi tween sebanyak 2 tetes, dikocok selama 5 menit dan dibilas dengan akuades (Gambar 3.4 D). Eksplan disterilkan dengan merkuri klorida (HgCl_2) 0.1% selama 5 menit (Gambar 3.4 E), dikocok perlahan dan dibilas dengan akuades yang telah disterilkan (Gambar 3.4 F). Menurut Fauzan *et al.* (2017), HgCl_2 merupakan disinfektan yang sangat efektif untuk membunuh jamur dan bakteri pada sterilisasi permukaan, tetapi tidak mematikan eksplan.



Gambar 3.4 Proses Sterilisasi Eksplan

A. Air mengalir; B. Detergen; C. Agrep dan benstar secara bergantian; D. Tween;
E. HgCl_2 ; F. Pembilasan dengan akuades steril

Proses penanaman eksplan dilakukan dengan kondisi steril dan aseptik di dalam LAF (Gambar 3.5 A), eksplan dipotong sebesar 1x1 cm menggunakan *steril blade* (Gambar 3.5 B). Eksplan ditanam pada medium kultur MS dengan berbagai kombinasi zat pengatur tumbuh (Gambar 3.5 C). Setiap botol kultur diisi dengan lima buah potongan eksplan daun dan kemudian dikultivasi (Gambar 3.5 D).



Gambar 3.5 Proses Penanaman Eksplan

A. Sterilisasi alat; B. Pemotongan eksplan; C. Penanaman eksplan; D. Eksplan yang siap diinduksi

3.6.2.2 Induksi *Protocorm Like Body* (PLB)

Setelah dilakukan penanaman, kultur ditempatkan dalam rak dengan kondisi gelap selama satu bulan dan kemudian diinkubasi di bawah fotoperiode 12 jam selama satu bulan (Madke *et al.*, 2012; Meilasari dan Iriawati, 2016). Tempat penyimpanan kultur ditunjukkan pada Gambar 3.6.



Gambar 3.6 Penyimpanan Kultur Induksi *Protocorm Like Body*

A. Kondisi gelap; B. Pencahayaan 12 jam sehari

3.5.2.3 Tahap Pengamatan dan Pengumpulan Data

Kultur *protocorm like body* diamati setiap dua hari sekali selama dua bulan. Respons induksi pada setiap kombinasi didokumentasikan dan persentase eksplan yang memperlihatkan pembentukan *protocorm like body* dari berbagai kombinasi konsentrasi auksin-sitokinin dan setiap pengulangannya dihitung. Jumlah eksplan yang memperlihatkan pembentukan *protocorm like body* kemudian dihitung menjadi persentase respons *protocorm like body*. Berdasarkan penelitian sebelumnya pada induksi *protocorm like body* dengan menggunakan eksplan daun anggrek *Phalaenopsis* "Sogo Vivien" oleh Kasi dan Semiarti (2016), jumlah eksplan yang memperlihatkan pembentukan *protocorm like body* dalam botol dihitung sebagai 100%. Untuk menghitung persentase eksplan yang memperlihatkan pembentukan *protocorm like body*, maka perhitungannya adalah sebagai berikut:

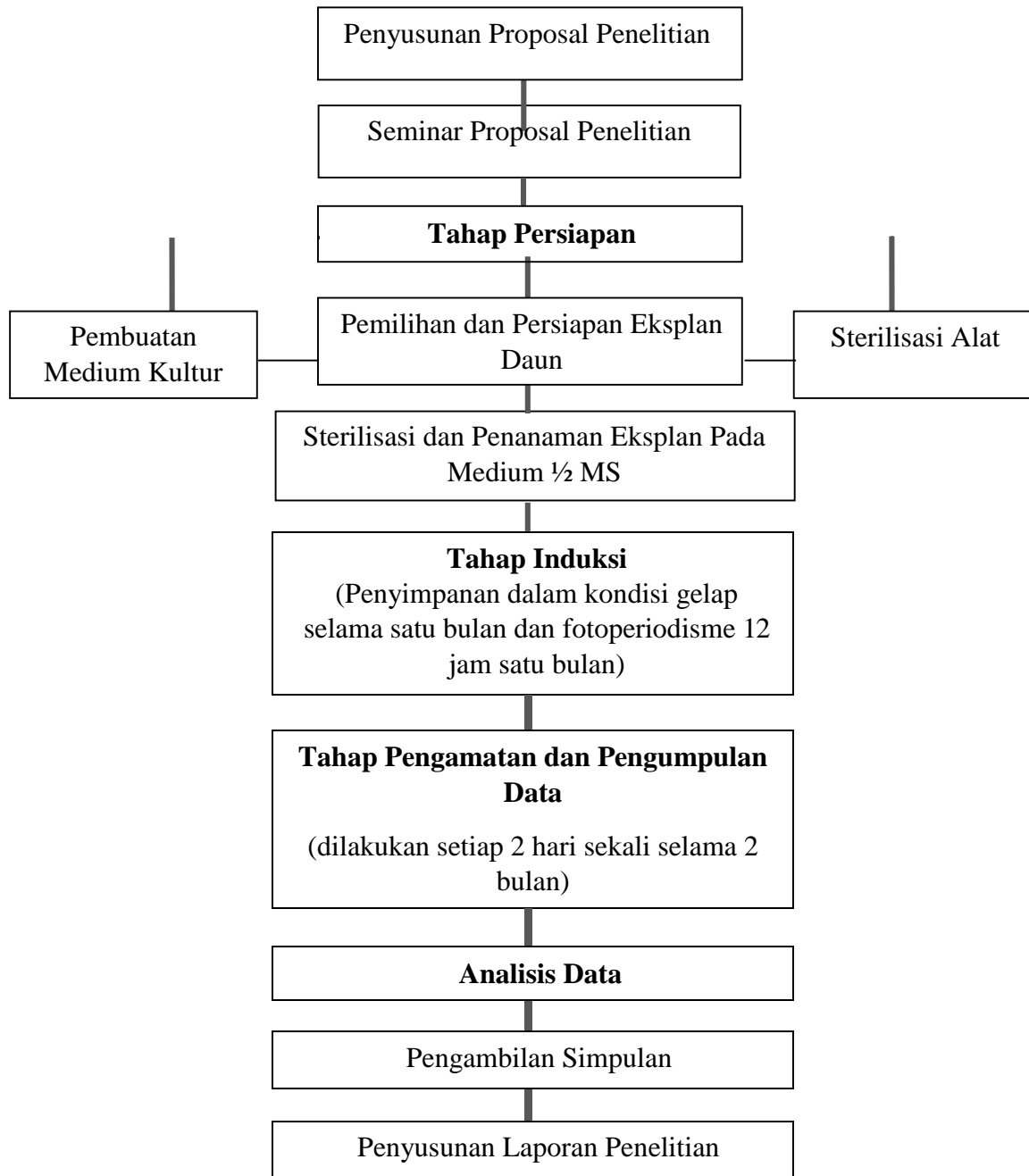
$$\text{Persentase respons induksi} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang terinduksi PLB dalam satu botol}}{\text{Jumlah eksplan keseluruhan yang ditanam di satu botol}} \times 100\%$$

3.5.2.4 Analisis Data

Data yang didapatkan dianalisis secara kualitatif dengan melihat persentase tertinggi.

3.6 Alur Penelitian

Berdasarkan deskripsi metode penelitian diatas, berikut adalah bagan alur yang akan dilakukan:



Gambar 3.7. Bagan Alur Penelitian