

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen faktorial. Pada penelitian ini dicari pengaruh dan kombinasi dan / atau konsentrasi zat pengatur tumbuh berupa BAP dan kitosan yang paling optimum dalam menginduksi *protocorm like body* Anggrek *Dendrobium sonia*. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap faktorial (RAL faktorial), yang terdiri dari dua faktor, yaitu kitosan dan zat pengatur tumbuh BAP dengan masing-masing terdiri atas 6 taraf dan 3 taraf variasi penelitian. Berikut variabel-variabel penelitian yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Variabel kontrol: Medium Murashige-Skoog (MS), suhu kamar, lama penyinaran selama 12 jam dan intensitas cahaya (20 watt tubular lamp).
2. Variable bebas: kombinasi dan konsentrasi zat pengatur tumbuh BAP dan kitosan
 - a. Kitosan: 0, 5, 10, 15, 20 dan 25 ppm.
 - b. ZPT berupa BAP : 0,5, 1 dan 2 ppm.
3. Variabel terikat: Persentase PLB anggrek *Dendrobium sonia* yang berhasil terinduksi serta kecepatan pembentukan PLB *Dendrobium sonia* yang terinduksi.

Tabel 3. 1 Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh

	Konsentrasi (ppm)	BAP		
		0.5	1	2
Kitosan	0	A	B	C
	5	D	E	F
	10	G	H	I
	15	J	K	L
	20	M	N	O
	25	P	Q	R

Untuk kombinasi perlakuan (sebanyak 18 perlakuan) dikodekan dengan huruf A sampai R dengan pengulangan sebanyak tiga kali. Adapun jumlah pengulangan didasarkan pada perhitungan Rumus Federer (1977):

(t-1) (n-1)	≥ 15	Keterangan : t = Jumlah Perlakuan n = Jumlah pengulangan
(18-1) (n-1)	≥ 15	
(17) (n-1)	≥ 15	
17n	$\geq 15+17$	
17n	≥ 32	
n	≥ 1.88	

Tabel 3. 2 Rancangan *Plotting* Botol Kultur

N1	O1	M1	M3	R3	L1	L3	O3	A3	N3	D3	E1	O2	G1	J1	J3	F2	A2
K3	O3	Q2	L2	I2	M2	K2	P3	C2	H3	G3	P1	C3	R1	R2	E2	H1	C1
I1	N2	B1	B2	K1	H2	D2	A1	G2	E3	J2	P2	D1	F1	F3	I3	B3	O1

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama lima bulan, dimulai pada bulan Januari 2021 sampai Juni 2021. 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 dalam penelitian ini adalah tanaman *Dendrobium sonia* di Kota Bandung. Sampel yang digunakan adalah tanaman *Dendrobium sonia* di wilayah Cihideung.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan Pelaksanaan

3.5.1.1 Persiapan Eksplan

Tahap persiapan diawali dengan survei lapangan yang meliputi observasi lokasi *Dendrobium sonia*. digunakan dalam penelitian ini adalah daun ke-1 sampai ke-4 dari *Dendrobium sonia* yang 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 100 ml larutan stok makronutrien untuk 10 kali lipat konsentrasi memerlukan sebanyak 16,5 g NH_4NO_3 , 4,4 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3,7g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 19 g KNO_3 dan 1,7 g KH_2PO_4 . Masing-masing zat dimasukkan kedalam gelas ukur dan larutkan dalam 100 ml aquadest. Kemudian Larutan yang telah jadi dipindahkan ke dalam gelas kimia dan diaduk dengan pengaduk. Setelah larut, masing-masing larutan dipindahkan ke dalam botol piala 250 ml dan ditutup dengan aluminium foil. Botol tersebut diberi nama dan tanggal sesuai pembuatan masing-masing bahan. Pembuatan 1 L medium diperlukan sebanyak 5 ml masing masing bahan tersebut.

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

Pembuatan 100 ml larutan stok zat besi untuk 100 kali konsentrasi dilakukan penimbangan 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 kedalam gelas ukur dan dilarutkan dengan 100 ml akuades. Larutan stok dipindahkan kedalam botol gelap berukuran 250 ml yang telah diberi label 'Stok Zat Besi' beserta tanggal pembuatannya selanjutnya botol di tutup menggunakan aluminium foil. Penggunaan bahan untuk membuat 1 L medium sebanyak 10 ml.

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

100 ml larutan stok mikronutrien dibuat untuk 1000 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang sebanyak 6.2 gram H_3BO_3 , 0.025 gram $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.025 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 22,3 gram $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,83 gram KI , 0.25 gram $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan sebanyak 8.6 gram $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Zat tersebut dimasukkan kedalam gelas ukur dan dilarutkan dengan 100 ml akuades. Larutan tersebut dipindahkan kedalam gelas piala dan diaduk menggunakan *stirrer*.

Setelah larut, larutan dipindahkan kedalam botol gelap dengan ukuran 250 ml yang telah di beri label ‘Stok Mikronutrien’ beserta tanggal pembuatannya dan di tutup rapat menggunakan alumunium foil. Penggunaan bahan untuk membuat 1 L medium adalah sebanyak 1 ml.

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

Pembuatan 100 ml larutan stok glisin dengan 100 kali konsentrasi dilakukan penimbangan sebanyak 0.2 gram glisin. Zat tersebut dimasukan dalam ke gelas ukur dan dilarutkan dengan alkohol 95 % sebanyak 100 ml. larutan dipindahkan kedalam gelas piala dan dihomogenkan menggunakan batang pengaduk. Setelah semua tercampurrata dan larut, kemudian larutan glisin dipindahkan ke dalam botol gelap berukuran 250 ml dan ditutup rapat denga menggunakan alumunium foil. Botol gelap diberi labe ‘ 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 100 ml larutan stok myo-inositol dengan 10 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang sebanyak 1 gram dan zat tersebut di masukan kedalam gelas ukur dan dilarutkan dengan 100 ml akuades. Kemudian, larutan di[indahkan kedalam botol gelap berukuran 250 ml dan ditutup rapat dengan menggunakan alumunium foil. Botol tersebut di beri label ‘Stok Myo- inositol’ beserta tanggal pembuatannya Penggunaan bahan untuk membuat 1 L medium adalah sebanyak 10 ml.

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

Pembuatan 100 ml larutan stok Asam Nikotin dengan 100 kali. konsentrasi dilakukan penimbangan sebanyak 0.05 gram asam nikotin. Zat tersebut dimasukan edalam gelas ukur dan dilarutkan kedalam 100 ml aquadest. Lalu dipinahkan ke dalam gelas piala dan dihomogenkan dengan menggunakan *stirrer*. Setelah homogen larutan dipindahkan kedalam botol gelap berukuran 250 ml dan di tutup rapat dengan alumunium dan 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 100 ml larutan stok *Pyridoxin* dengan 100 kali konsentrasi dilakukan penimbangan sebanyak 0.05 gram *Pyridoxin*. Zat tersebut di larutkan kedalam 100 ml akuades an dipindahkan dalam gelas piala dan diaduk dengan

batang pengaduk. Setelah semua bahan larut dan homogen kemudian, larutan tersebut di pindahkan kedalam botol gelap berukuran 250 ml dan di tutup rapat dengan menggunakan aluminiu foil. Botol diberi label ‘ stok Pyridoxin’ beserta tanggal pembuatannya. Penggunaan bahan untuk membuat 1 L medium sebanyak 1ml.

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

Pembuatan 100 ml larutan stok thiamin dengan 100 kali konsentrasi dilakukan penimbangan sebanyak 0.01 gram. Zat tersebut dimasukan ke dalam gelas ukur dan dilarutkan dengan 100 ml akuades. Larutan dipindahkan ke dalam gelas piala dan dihomogenkan menggunakan *stirrer*. Setelah larut, larutan dipindahkan kedaam botol gelap ukuran 250 ml dan di tutup rapat dengan menggunakan alumunium foil. Botol tersebut di beri label ‘ Stok Thiamin’ beserta tanggal pembuatannya. Penggunaan bahan untuk membuat 1 L medium sebanyak 1 ml.

3.5.1.2.9 Larutan Stok Benzilaminopurin (BAP) = 100 ml

Pembuatan larutan stok benzilaminopurin (BAP) 200 ppm sebanyak 100 ml dilakukan penimbangan sebanyak 0.02 gram. BAP dimasukan kedalam beaker glass berukuran 100 ml. kemudian, ditetaskan sebanyak 5 sampai 15 tetes larutan KOH 1%. Diaduk hingga larut hingga BAP larut dan dilarutkan dengan akuades hingga volume mencapai 100 ml. Larutan dipindahkan kedalam botol gelap berukuran 250 ml dan di tutup rapat menggunakan alumunium foil. Kemudian botol diberi label Botol tersebut di beri label ‘ Stok BAP’ beserta tanggal pembuatannya. Penggunaan bahan untuk setiap kombinasi yaitu 0.5 (1,75 ml),BAP 1 (1,5 ml) dan BAP 2 (3 ml).

3.5.1.2.9 Larutan Stok Kitosan = 100 ml

Pembuatan larutan stok kitosa 2500 ppm sebanyak 100 ml dilakukan penimbangan sebanyak 0.25 gram Kitosan. Kitosan dimasukan kedalam botol beaker glass berukuran 100 ml dan di tetesin 15-20 tetes asam asetat 1 %. Diaduk hingga larut . kemudian, larutan diberi akuadest hingga volume mencapai 100 ml. Larutan yang telah homogen dan larut dipindahkan kedalam botol gelap berukuran 250 ml dan di tutup rapat menggunakan alumunium foil. Kemudian botol diberi label Botol tersebut di beri label ‘Stok Kitosan’ beserta tanggal pembuatannya. Penggunaan bahan untuk setiap kombinasi berbda bergantung pada konsentrasinya.

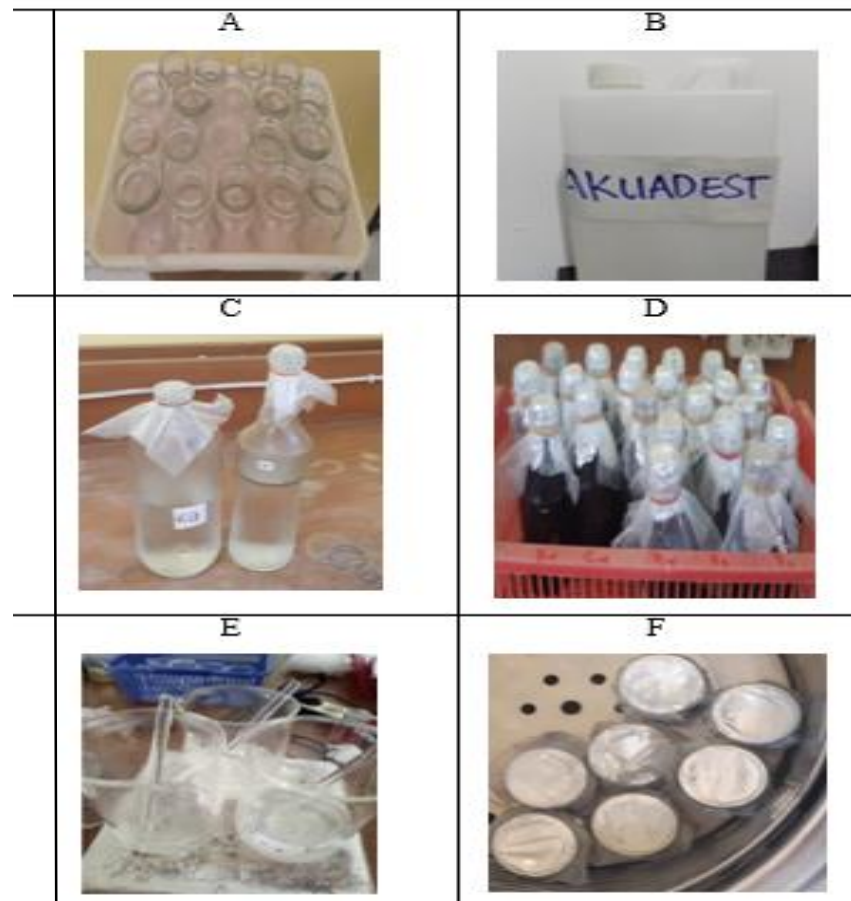
3.5.1.3 Pembuatan Medium Kultur

Sri puji Nugrohowati, 2021

PENGARUH KOMBINASI BAP DAN KITOSAN TERHADAP INDUKSI PROTOCORM LIKE BODY DARI EKSPLAN DAUN *Dendrobium sonia* PADA MEDIUM MS

Universitas pendidikan Indonesia | respository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Setelah pembuatan larutan stok untuk makronutrien, mikronutrien, zat besi, vitamin, asam amino, polyol untuk masing-masing zat pengatur tumbuh dan kitosan (Gambar 3.2 D). Induksi PLB dari eksplan daun *Dendrobium sp* menggunakan medium $\frac{1}{2}$ MS tanaman *Dendrobium sp* hanya membutuhkan kadar mineral yang sedikit sehingga penggunaan medium $\frac{1}{2}$ MS sudah cukup (Aini *et al.*, 2015; Arditti dan Ernst 1992; Hardjo *et al.*, 2016). Medium $\frac{1}{2}$ MS hanya memerlukan $\frac{1}{2}$ konsentrasi makronutrien dan mikronutrien. Menurut Syahid dan Bermawie (2000 dalam Setiawati, 2018) kandungan ion pada medium terlebih garam-garam makro dapat mengurangi pembentukan sitokinin endogen yang membuat ratio auksin dan sitokinin dalam tanaman menjadi optimal. Sehingga baik untuk pertumbuhan tanaman Islam *et al.* (2003, dalam Setiawati, 2018). Medium $\frac{1}{2}$ MS tersebut diberi kombinasi zat pengatur tumbuh benzilaminopurin (BAP) dan Kitosan.



Gambar 3.2 Pembuatan Medium Kultur A. Botol Medium Kultur; B Akuades; C . Larutan NaOH dan HCL untuk penyeimbang sekaligus pengatur PH; D Larutan Stok; E. Medium yang dipanaskan; F. Medium yang siap disterilisasi.

Pembuatan medium untuk 18 kombinasi membutuhkan sebanyak 1 Liter medium $\frac{1}{2}$ MS. Seluruh stok larutan dituangkan kedalam *beaker glass* berukuran 1 L kemudian ditambah dengan akuadest sebanyak 500 ml, ditambahkan sukrosa 30 gram diaduk hingga merata menggunakan *stirrer* lalu ditambahkan akuadest hingga 1 L. Kemudian dibagi kedalam 3 *beaker glass* berukuran 500 ml masing-masing medium sebanyak 300 ml. Ditambahkan kombinasi benzilaminopurin (BAP) (0.5, 1, 2 ppm). Selanjutnya dibagikan kedalam lima *beaker glass* berukuran 100 ml dengan masing-masing 50 ml lalu ditambahkan kombinasi Kitosan (0,5, 10, 15, 20, 25 ppm) dan digenapkan dengan menambahkan akuades hingga volume mencapai 100 ml untuk setiap kombinasi kitosan. Dan dilakukan pengukuran PH dengan PH meter sebesar 5.6 sampai 5.8. Penambahan larutan 0,1 N NaOH dan atau 0,1 N HCl (Gambar 3.2 C) ke dalam medium hingga pH yang diinginkan tercapai setelah itu, agar-agar sebanyak 0.7g/100 ml dimasukkan. Medium dipanaskan menggunakan *Hot plate* hingga seluruh agar larut (Gambar 3.2 E). Medium dituangkan kedalam masing-masing botol kultur sebanyak 10 ml dan dilakukan sterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C dengan tekanan 1,5 atm (Gambar 3.2 F). Medium disimpan pada ruangan steril dalam suhu ruangan dan kondisi yang gelap hingga digunakan.

3.5.1.4 Sterilisasi Alat

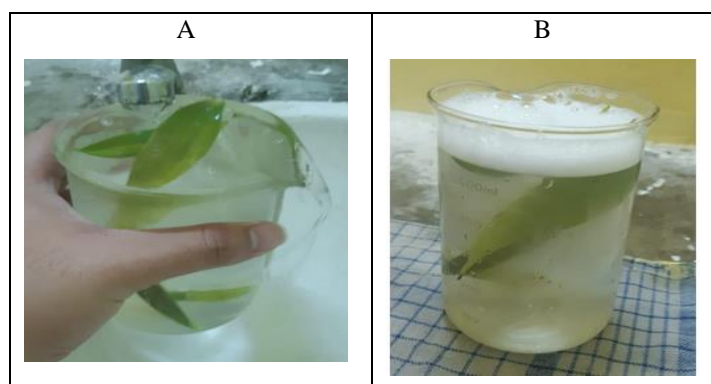
Penggunaan alat pada penelitian ini disterilisasi untuk meminimalisir terjadinya kontaminasi terhadap objek penelitian. Alat *dissecting set* (scalpel dan pinset), alat-alat gelas dan logam dicuci dengan menggunakan sabun dan dibilas dengan air bersih lalu dikeringkan. Alat yang telah bersih dibungkus dengan kertas dan dimasukkan kedalam plastik tahan panas, disterilkan dalam autoklaf selama 30 menit dengan suhu 121⁰C pada tekanan 1 atm (Gambar 3.3A) Pada saat penanaman semua alat yang akan digunakan disterilkan menggunakan alkohol 70% dan dibakar dengan nyala api spirtus. Hal tersebut dilakukan setiap akan digunakan didalam *Laminar Air Flow* (LAF) (Gambar 3.3B)

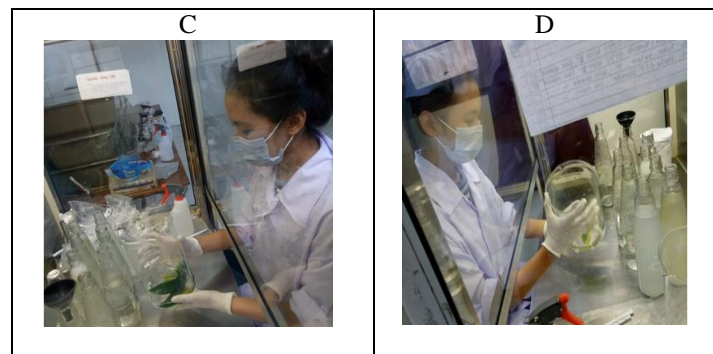


Gambar 3.3 Sterilisasi Alat. A. Alat yang digunakan untuk penanaman di dalam LAF B. Sterilisasi alat di dalam autoklaf dengan suhu 120°C dan tekanan 1,5 atm selama 30 menit.

3.5.2 Pelaksanaan Eksperimen Penelitian

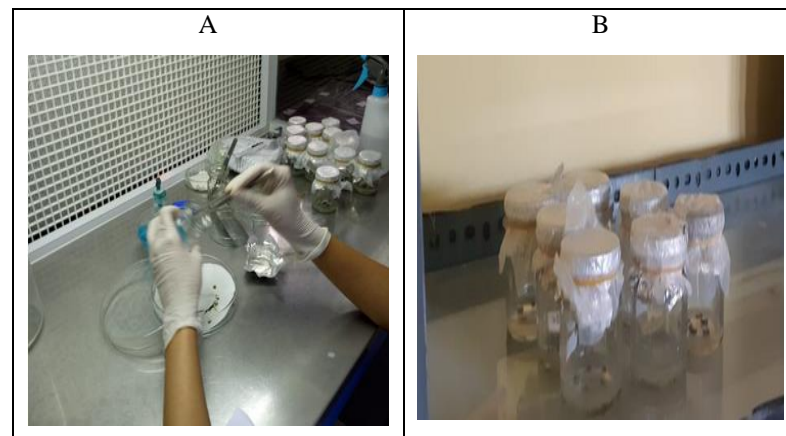
Daun ke -1 sampai daun ke -4 pada eksplan diambil dan dimasukkan kedalam *beaker glass* untuk kemudian dilakukan sterilisasi. Langkah pertama eksplan dibersihkan dengan menggunakan sabun lalu dibilas. Eksplan dialiri dengan air mengalir selama 3 kali 15 menit (Gambar 3.4 A). Eksplan di rendam dalam larutan detergen 2 % selama 10 menit (Gambar 3.4.B). Eksplan dibilas menggunakan air sebanyak 3 kali hingga bau dan busa detergen hilang. Sterilisasi dilakukan di *Laminar Air Flow* (LAF). Eksplan yang telah bersih dan disterilisasikan dengan detergen dan dimasukkan kedalam larutan agrep 0.1 % dikocok selama 20 menit dan dibilas dengan akuades sebanyak 3 kali. Eksplan dimasukkan kedalam larutan benstar (Fungisida) 0.1% dan dikocok selama 20 menit setelah itu dibilas kembali menggunakan akuades sebanyak 3 kali (Gambar 3.4.C). Eksplan ditetesi dengan dua tetes larutan tween dan dibilas dengan akuades . Terakhir, eksplan disterilisasikan dengan larutan merkuri klorida ($HgCl_2$) 0.1% selama 5 menit dan kocok selama perlahan lalu dibilas menggunakan akuades (Gambar 3.4.D)





Gambar 3.4 Sterilisasi Eksplan

Eksplan ditanam pada medium didalam LAF dengan kondisi steril dan aseptik (Gambar 3.5 A). Eksplan dipotong dengan ukuran 1x1 cm. Menggunakan *steril blade* . Kemudian eksplan ditanam kedalam berbagai kombinasi zat pengatur tumbuh. Setiap botol berisikan lima buah potongan eksplan daun. kemudian dikultivasi (Gambar 3.5 B).



Gambar 3.5A. Proses Penanaman eksplan B. Kultivasi .

3.5.2.1 Induksi *Protocorm Like Body* (PLB)

Setelah penanaman dilakukan kemudian kultur ditempatkan didalam ruang yang gelap selama 1 bulan dan dilakukan inkubasi dengan penyinaran *Tubular Lamp* 20 watt 12 jam selama satu bulan. Tempat penyimpanan kultur ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3.6 Penyimpanan Kultur Ekplan Induksi *Protocorm Like Body*

A. Kondisi gelap; B. Pencahayaan 12 jam sehari

3.5.2.3 Tahap Pengumpulan Data.

Pengamatan kultur *Protocorm Like Body* dilakukan tiga hari sekali selama tiga bulan. Respon yang muncul di setiap kombinasi didokumentasikan dan *Protocorm Like Body* yang memiliki respon yang baik atau berhasil diinduksi dari berbagai kombinasi zat kitosan dan pengulangan dihitung jumlahnya. Persentase induksi *Protocorm Like Body* yang terinduksi pada setiap kombinasi dihitung kemudian, data di rata-rata jumlah yang terhitung. Satu botol terdiri dari 5 ekplan yang menjadi satu kali ulangan. Dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Persentase Induksi PLB} = \frac{\text{Jumlah Eksplan membentuk PLB}}{\text{Jumlah eksplan dalam botol}} \times 100$$

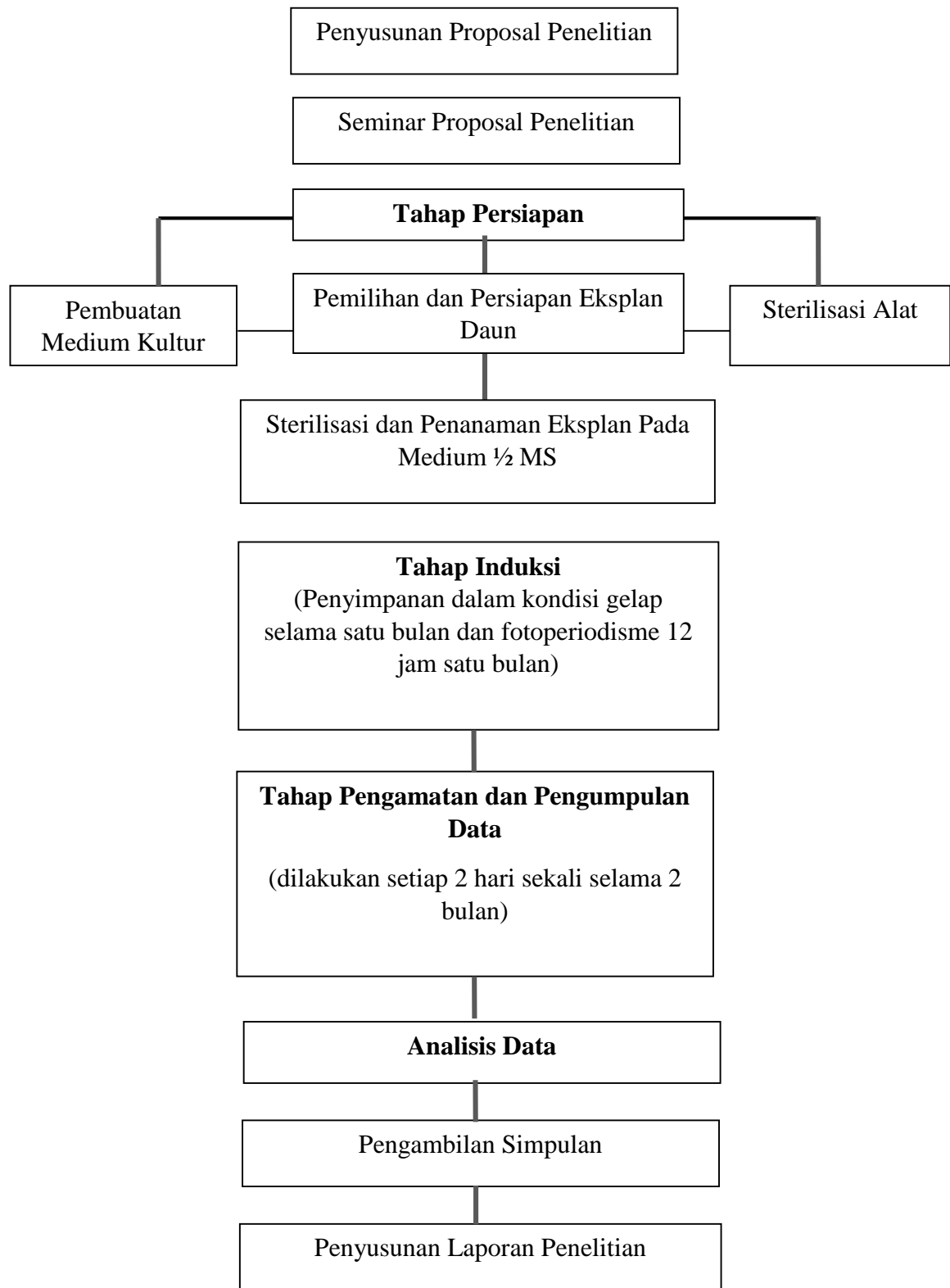
Perhitungan persentase respon *protocorm like body* di hitung dengan menggunakan rumus yang telah digunakan oleh penelitian induksi *protocorm like body* pada beberapa jenis anggrek (Kasi dan Semiarti,2016; Maryam,2019; Parthibhan *et al.*, 2015). Ulangan pada penelitian ini dilakukan sebanyak tiga kali dan menghasilkan % induksi *Protocorm Like Body* (Tabel 4.1).

3.5.2.4 Analisis Data

Data yang didapatkan dianalisis secara kualitatif dengan menggunakan *uji statistic anova RAL factorial (6x3)* untuk melihat interaksi dan ada tidaknya perbedaan pengaruh dari perlakuan yang diberikan. Untuk melihat perbedaan pengaruh diantara perlakuan dilakukan uji *Duncam Multiple Range Test (DMRT)*.

3.6 Alur penelitian

Berdasarkan penjelasan mengenai penelitian diatas, berikut adalah bagan alur yang akan dilakukan.



Gambar 3.7. Bagan Alur Penelitian.

