

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen faktorial yang bertujuan untuk mencari kombinasi serta konsentrasi BAP dan kitosan yang paling optimum dalam menginduksi *Protocorm Like Bodies* (PLB) Anggrek *Dendrobium sonia*. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RAL faktorial), yang terdiri dari dua faktor, yakni Benzilaminopurin (BAP) dan kitosan yang terdiri atas 3 dan 6 taraf variasi penelitian (Tabel 3.1). Variabel-variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Variabel kontrol: Medium $\frac{1}{2}$ Murashige-Skoog (MS), lama penyinaran selama 12 jam, intensitas cahaya (*20-watt tubular lamp*), dan suhu kamar
2. Variable bebas: kombinasi dan konsentrasi zat pengatur tumbuh BAP dan kitosan:
 - a) BAP: 0.5, 1, dan 2 ppm
 - b) Kitosan: 0 (kontrol), 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm
3. Variabel terikat: Presentase PLB anggrek *Dendrobium sonia* yang berhasil terinduksi serta kecepatan PLB *Dendrobium sonia* yang terinduksi.

Tabel 3.1 Kombinasi Zat BAP dan Kitosan

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

Delapan belas perlakuan diterapkan pada penggunaan medium kultur dimana jumlah ulangan didasarkan pada perhitungan Rumus Federer (1963):

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

Rancangan acak lengkap dilakukan dengan jumlah perlakuan 18 buah kombinasi dan ulangan minimal tiga kali. Pengacakan terhadap 18 buah perlakuan dengan tiga kali ulangan dapat dilihat pada (Tabel 3.2).

Tabel 3.2 Hasil Pengacakan yang Dilakukan

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

3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan selama empat bulan, dimulai pada Februari 2021 hingga bulan Mei 2021. Pengambilan 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 Parongpong.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan Penelitian

3.5.1.1 Persiapan Eksplan

Persiapan diawali dengan melakukan observasi lokasi tanaman anggrek *Dendrobium sonia*. Tanaman anggrek yang digunakan berasal dari wilayah Parongpong, Kabupaten Bandung Barat. Eksplan yang digunakan selama penelitian adalah eksplan batang yang masih muda dan belum muncul tangkai bunga (Gambar 3.1). Anggrek *Dendrobium sonia* yang digunakan berumur satu tahun.



Gambar 3.1 Eksplan Batang yang digunakan dalam Penelitian

3.5.1.2 Pembuatan Stok Larutan

3.5.1.2.1 Larutan Stok Makronutrien 100 ml (10 kali konsentrasi)

Larutan stok makronutrien 10 kali konsentrasi dibuat dengan cara memasukkan 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 ke dalam gelas piala secara terpisah. Masing-masing zat kemudian dilarutkan dengan 100 ml akuades. Masing-masing

larutan kemudian diaduk dengan menggunakan *stirrer* hingga homogen. Masing-masing larutan kemudian dimasukkan ke dalam botol gelap berukuran 250 ml dan ditutup dengan rapat menggunakan *aluminium foil* dan plastik. Seluruh botol diberi label sesuai dengan nama bahan kemudian ditulis tanggal pembuatannya. Masing-masing bahan diambil sebanyak 5 ml untuk 1 L medium $\frac{1}{2}$ MS.

3.5.1.2.2 Larutan Stok Mikronutrien 100 ml (100 kali konsentrasi)

Larutan stok mikronutrien 100 kali konsentrasi dibuat dengan cara memasukkan 0,62 gram H_3BO_3 , 0.006 gram $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.006 gram $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 2.23 gram $MnSO_4 \cdot 2H_2O$, 0.083 gram KI, 0.025 gram $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ dan 0.86 gram $ZnSO_4 \cdot 4H_2O$ ke dalam gelas piala secara terpisah. Masing-masing zat kemudian dilarutkan dengan 100 ml akuades. Masing-masing larutan kemudian diaduk dengan menggunakan *stirrer* hingga homogen. Masing-masing larutan kemudian dimasukkan ke dalam botol gelap berukuran 250 ml dan ditutup dengan rapat menggunakan *aluminium foil* dan plastik. Seluruh botol diberi label sesuai dengan nama bahan kemudian ditulis tanggal pembuatannya. Masing-masing bahan diambil sebanyak 1 ml untuk 1 L medium $\frac{1}{2}$ MS.

3.5.1.2.3 Larutan Stok Zat Besi 100 ml (100 kali konsentrasi)

Larutan stok zat besi 100 kali konsentrasi dibuat dengan cara memasukkan 0.373 gram Na_2EDTA dan 0.278 gram $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ke dalam gelas piala secara terpisah. Masing-masing zat kemudian dilarutkan dengan 100 ml akuades. Masing-masing larutan kemudian diaduk dengan menggunakan *stirrer* hingga homogen. Masing-masing larutan kemudian dimasukkan ke dalam botol gelap berukuran 250 ml dan ditutup dengan rapat menggunakan *aluminium foil* dan plastik. Seluruh botol diberi label sesuai dengan nama bahan kemudian ditulis tanggal pembuatannya. Masing-masing bahan diambil sebanyak 10 ml untuk 1 L medium $\frac{1}{2}$ MS.

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

Larutan stok myo-inositol 10 kali konsentrasi dibuat dengan cara memasukkan 1 gram myo-inositol ke dalam gelas piala. Myo-inositol kemudian

dilarutkan dengan 100 ml akuades. Larutan kemudian diaduk dengan menggunakan *stirrer* hingga homogen. Larutan kemudian dimasukkan ke dalam botol gelap ukuran 250 ml dan ditutup dengan rapat menggunakan *aluminium foil* dan plastik. Botol diberi label myo-inositol dan ditulis tanggal pembuatannya. Myo-inositol diambil sebanyak 1 ml untuk 1 L medium $\frac{1}{2}$ MS.

3.5.1.2.5 Larutan Stok Glisin 100 ml (100 kali konsentrasi)

Larutan stok glisin 10 kali konsentrasi dibuat dengan cara memasukkan 0.2 gram glisin ke dalam gelas piala. Glisin kemudian dimasukkan dilarutkan dengan 100 ml akuades. Larutan kemudian diaduk dengan menggunakan *stirrer* hingga homogen. Larutan kemudian dimasukkan ke dalam botol gelap ukuran 250 ml dan ditutup dengan rapat menggunakan *aluminium foil* dan plastik. Botol diberi label glisin dan ditulis tanggal pembuatannya. Glisin diambil sebanyak 1 ml untuk 1 L medium $\frac{1}{2}$ MS.

3.5.1.2.6 Larutan Stok Niacin 100 ml (100 kali konsentrasi)

Larutan stok niacin 10 kali konsentrasi dibuat dengan cara memasukkan 0.05 gram niacin ke dalam gelas piala. Niacin kemudian dilarutkan dengan 100 ml akuades. Larutan kemudian diaduk dengan menggunakan *stirrer* hingga homogen. Larutan kemudian dimasukkan ke dalam botol gelap ukuran 250 ml dan ditutup dengan rapat menggunakan *aluminium foil* dan plastik. Botol diberi label niacin dan ditulis tanggal pembuatannya. Niacin diambil sebanyak 1 ml untuk 1 L medium $\frac{1}{2}$ MS.

3.5.1.2.7 Larutan Stok Thiamin 100 ml (100 kali konsentrasi)

Larutan stok thiamin 10 kali konsentrasi dibuat dengan cara memasukan 0.01 gram thiamin ke dalam gelas piala. Thiamin kemudian dilarutkan dengan 100 ml akuades. Larutan kemudian diaduk dengan menggunakan *stirrer* hingga homogen. Larutan kemudian dimasukkan ke dalam botol gelap ukuran 250 ml dan ditutup dengan rapat menggunakan *aluminium foil* dan plastik. Botol diberi label thiamin dan ditulis tanggal pembuatannya. Thiamin diambil sebanyak 1 ml untuk 1 L medium $\frac{1}{2}$ MS.

3.5.1.2.8 Larutan Stok Pyridoxin 100 ml (100 kali konsentrasi)

Larutan stok pyridoxin 10 kali konsentrasi dibuat dengan memasukan 0.05 gram pyridoxin ke dalam gelas piala. Pyridoxin kemudian dilarutkan dengan 100 ml akuades. Larutan kemudian diaduk dengan menggunakan *stirrer* hingga homogen. Larutan kemudian dimasukkan ke dalam botol gelap ukuran 250 ml dan ditutup dengan rapat menggunakan *aluminium foil* dan plastik. Botol diberi label pyridoxin dan ditulis tanggal pembuatannya. Pyridoxin diambil sebanyak 1 ml untuk 1 L medium $\frac{1}{2}$ MS.

3.5.1.2.9 Larutan Stok ZPT BAP (100ml)

Pembuatan larutan stok BAP dilakukan dengan memasukan BAP sebanyak 0.02 gram ke dalam gelas piala. BAP kemudian diberi larutan KOH 1% sebanyak 5-15 tetes. BAP kemudian dilarutkan dengan 100 ml akuades. Larutan kemudian diaduk dengan menggunakan *stirrer* hingga homogen. Larutan kemudian dimasukkan ke dalam botol gelap ukuran 250 ml dan ditutup dengan rapat menggunakan *aluminium foil* dan plastik. Botol diberi label BAP dan ditulis tanggal pembuatannya. BAP diambil sebanyak 0.75 ml untuk 0.5 ppm, 1.5 ml untuk 1 ppm, dan 3 ml untuk 2 ppm per 300 ml medium $\frac{1}{2}$ MS.

3.5.1.2.10 Larutan Stok ZPT Kitosan (100ml)

Pembuatan larutan stok kitosan dilakukan dengan memasukan kitosan sebanyak 0.25 gram ke dalam gelas piala. Kitosan kemudian diberi larutan asam asetat sebanyak 10-20 tetes. Kitosan kemudian dilarutkan dengan 100 ml akuades. Larutan kemudian diaduk dengan menggunakan *stirrer* hingga homogen. Larutan kemudian dimasukkan ke dalam botol gelap ukuran 250 ml dan ditutup dengan rapat menggunakan *aluminium foil* dan plastik. Botol diberi label kitosan dan ditulis tanggal pembuatannya. Kitosan diambil sebanyak 0.1 ml untuk 5 ppm, 0.2 ml untuk 10 ppm, 0.3 ml untuk 15 ppm, 0.4 ml untuk 20 ppm, dan 0.5 ml untuk 25 ppm per 50 ml medium $\frac{1}{2}$ MS.

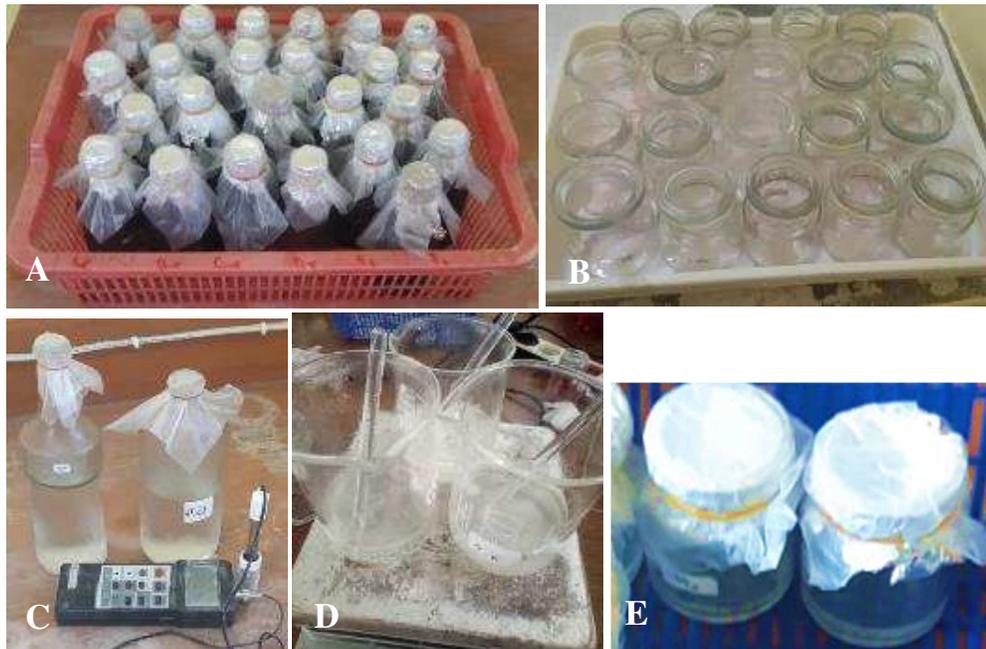
3.5.1.3 Pembuatan Medium

Dalam penelitian digunakan medium MS dikarenakan menurut Puchooa, (2004) medium MS merupakan medium yang lebih unggul dibandingkan medium lain pada semua kombinasi ZPT untuk penginduksian PLB pada anggrek *Dendrobium*. Dalam pembuatan satu liter medium $\frac{1}{2}$ MS, larutan stok yang telah disiapkan (Gambar 3.2 A) dimasukkan ke dalam gelas piala 1 L kemudian ditambahkan akuades sebanyak 500 ml lalu ditambahkan 30 g/l sukrosa dan akuades hingga mencapai satu liter kemudian diaduk hingga homogen. Larutan yang telah homogen dibagi ke dalam tiga buah gelas piala 500 ml masing-masing sebanyak 300 ml yang telah diberi label untuk ditambahkan BAP dengan konsentrasi 0,5, 1, dan 2 ppm. Larutan yang telah ditambahkan BAP kemudian dibagi kembali ke dalam enam buah gelas piala 100 ml masing-masing sebanyak 50 ml untuk ditambahkan kitosan dengan konsentrasi 0, 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm sehingga didapatkan 18 kombinasi medium $\frac{1}{2}$ MS.

Setelah didapatkan 18 kombinasi medium dilakukan pengukuran pH dengan pH meter (Gambar 3.2 C) di mana pH dibuat menjadi kisaran 5,6-5,8. Pengukuran pH dibantu dengan penambahan 0,1 N NaOH jika pH terlalu asam dan penambahan 0,1 N HCl jika pH terlalu basa. Jika pH yang sesuai telah didapat medium ditambahkan agar sebagai agen pematid dengan jumlah 0,35 g/ml. Setelah ditambahkan agar medium kemudian dipanaskan (Gambar 3.2 D) hingga larutan dan agar menjadi homogen kemudian media dimasukkan ke dalam botol kultur (Gambar 3.2 B) sebanyak 10 ml per botol kultur. Botol yang telah diisi kemudian ditutup dengan *aluminium foil* dan diikat dengan karet (Gambar 3.2 E) lalu disterilisasi (Gambar 3.3 A) dengan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Medium disimpan di ruang kultur dalam kondisi gelap pada suhu kamar sampai digunakan.

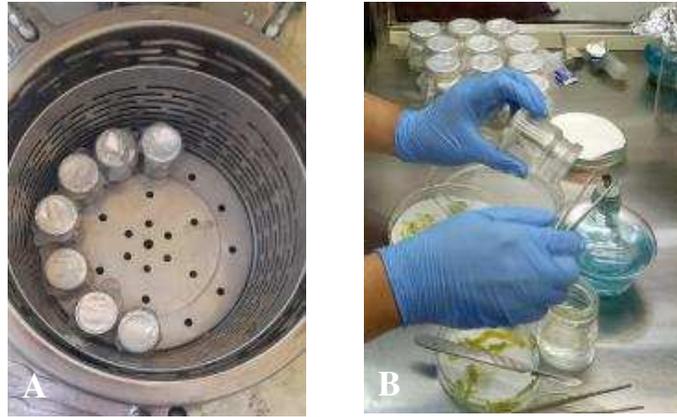
3.5.1.4 Sterilisasi Alat dan Akuades

Sterilisasi alat menggunakan autoklaf dilakukan untuk meminimalkan resiko kontaminasi pada eksplan yang ditanam pada media kultur. Alat-alat yang disterilisasi terbagi atas alat bedah (*scalpel* dan pinset) dan alat gelas. Alat-alat yang akan disterilisasi dicuci dan dibilas terlebih dahulu kemudian dikeringkan. Semua alat kemudian dibungkus dengan kertas dan dimasukkan ke dalam plastik tahan panas. Alat-alat disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C pada tekanan 1 atm. Pada saat penanaman di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) alat-alat disterilisasi kembali dengan alkohol 70%. Alat bedah dibakar LAF dilakukan dengan memasukan akuades kedalam botol berukuran 600 ml dan 800 ml dan disterilisasi dengan suhu 121 °C pada tekanan 1 atm selama 15 menit.



Gambar 3.2 Pembuatan Medium $\frac{1}{2}$ MS

A. Larutan stok makronutrien, mikronutrien, zat besi, myo-inositol, glisin, vitamin, dan ZPT; B. Botol kultur; C. Larutan HCL, Larutan NaOH, dan pH meter; D. Medium $\frac{1}{2}$ MS yang sedang dipanaskan; E. Medium $\frac{1}{2}$ MS yang siap di sterilisasi



Gambar 3.3 Sterilisasi Alat dan Medium Kultur

- A. Sterilisasi di dalam autoklaf; B. Sterilisasi di dalam LAF menggunakan alkohol 70% dan dibakar pada api spiritus

3.5.2 Pelaksanaan Penelitian

3.5.2.1 Sterilisasi dan Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan dilakukan di dalam alat LAF dalam kondisi aseptik dan steril. Pemilihan eksplan batang dilakukan dengan melihat kondisi batang. Batang yang digunakan sebagai eksplan adalah batang yang masih muda yang belum muncul tangkai bunga. Eksplan yang telah dipilih (Gambar 3.4 A) kemudian dipisahkan dan dipotong sesuai kebutuhan untuk dilakukan sterilisasi. Batang yang telah dipotong dicuci terlebih dahulu dengan sabun dan disikat dengan sikat gigi berbulu halus kemudian dibilas dengan air mengalir hingga tidak ada sabun yang tersisa. Batang kemudian dimasukkan ke dalam gelas piala. Proses sterilisasi dilakukan sebanyak tiga tahap, tahap pertama yakni dengan air mengalir selama 3x15 menit (Gambar 3.4 B). Tahap kedua dilakukan dengan penambahan detergen 0,1% selama 10 menit (Gambar 3.4 C) yang kemudian dibilas air mengalir sebanyak 3x atau hingga tidak bersisa detergen. Tahap terakhir yakni pencucian dengan akuades sebanyak 3x. Eksplan yang telah disterilisasi kemudian dimasukkan ke dalam LAF untuk disterilisasi lebih lanjut.

Sterilisasi didalam LAF (Gambar 3.4 D) dimulai dengan pemindahan eksplan batang ke dalam gelas piala 2 L yang steril. Sterilisasi didalam LAF dilakukan sebanyak empat tahap. Tahap pertama dilakukan dengan Agrep 0,1% selama 20

menit dan dibilas akuades steril sebanyak 3x. Tahap kedua dilakukan dengan Benstar 0,1% selama 20 menit dan dibilas akuades sebanyak 3x. Tahap ketiga dilakukan dengan penambahan *tween* sebanyak 2-4 tetes yang dihomogenkan dengan akuades steril sebanyak 1 L tahapan ini dilakukan selama 10 menit lalu dilakukan pembilasan dengan akuades steril sebanyak 3x. Tahap terakhir dilakukan sterilisasi dengan HgCl 0.1% selama 15 menit lalu, dibilas dengan akuades steril sebanyak 3x. Penanaman eksplan yang telah steril dimulai dengan membuang kulit batang dan bagian batang yang berwarna kekuningan akibat sterilisasi. Batang dipotong secara vertikal mengikuti bentuk batang dengan ukuran 0,5 cm. Eksplan kemudian dipotong menjadi ukuran 1 cm. Permukaan eksplan diberi sayatan dan ditanam pada 18 kombinasi medium kultur MS dengan berbagai kombinasi zat pengatur tumbuh BAP dan kitosan (Gambar 3.4 E). Kultur yang telah siap diinduksi (Gambar 3.4 F) disterilisasi dengan penyemprotan alkohol 70% untuk kemudian dipindahkan ke dalam wadah.

3.5.2.2 Induksi *Protocorm Like Body* (PLB).

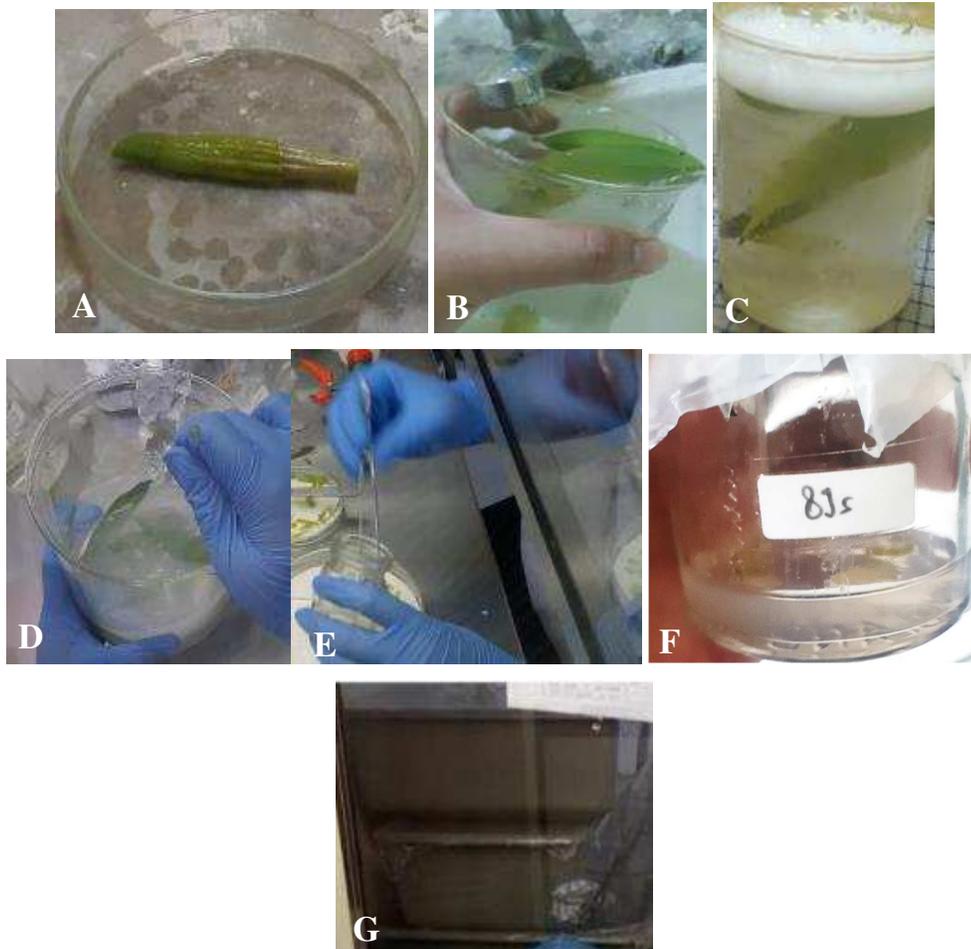
Setelah dilakukan penanaman, kultur diinduksi dalam dua tahap yaitu tahap pre kultivasi selama satu bulan pada kondisi gelap dan tahap inkubasi selama 12 jam di bawah fotoperiode hingga PLB dapat terlihat (Kalimuthu *et al.*, 2007; Rahman *et al.*, 2005). Selama masa induksi pada kondisi gelap kultur disimpan di dalam wadah yang ditutupi oleh *plastic wrap* untuk menghindari kontaminasi (Gambar 3.4 G). Induksi di bawah fotoperiode dilakukan di dalam rak kultur yang ditutupi oleh *trashbag* dan dilengkapi lampu yang diatur menyala selama 12 jam (gambar 3.5)

3.5.2.3 Tahap Pengumpulan Data

Pengamatan kultur PLB dilakukan tiga hari sekali selama tiga bulan. Pengamatan PLB dilihat per eksplan yang memunculkan induksi PLB pada botol. Respons yang muncul pada setiap kombinasi didokumentasikan dan dicatat. Botol kultur yang memiliki respons baik atau berhasil menginduksi PLB dari setiap kombinasi dan ulangan dihitung dan dicatat. Berdasarkan penelitian Kasi dan Semiarti (2016), jumlah eksplan yang memperlihatkan pembentukan PLB dalam

botol dihitung dalam persentase (%), yang selanjutnya ditetapkan sebagai persentase induksi PLB. Perhitungan persentase induksi PLB dilakukan dengan rumus berikut.

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



Gambar 3.4 Proses Sterilisasi dan Penanaman Eksplan

A. Eksplan batang yang siap disterilisasi; B. Sterilisasi pada air mengalir; C. Sterilisasi dengan detergen; D. Sterilisasi eksplan di dalam LAF; E. Penanaman eksplan didalam LAF; F. Medium yang telah ditanami eksplan; G. Wadah kultur untuk proses pre kultivasi PLB



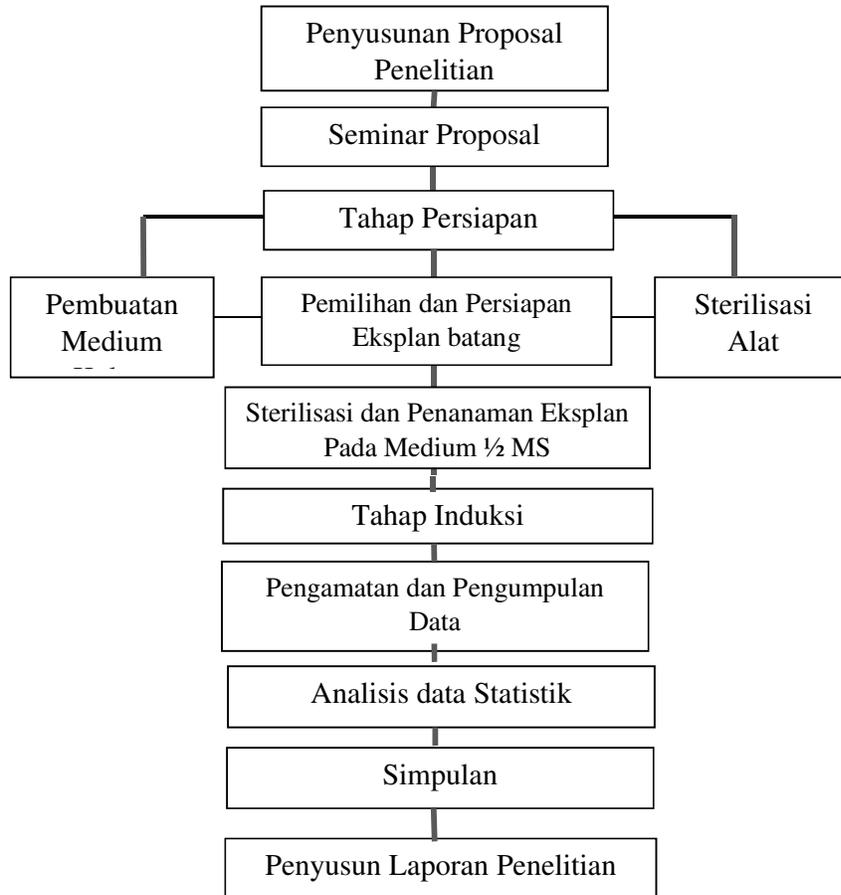
Gambar 3.5 Induksi *Protocorm Like Body* di rak kultur

3.5.2.4 Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini didapat dalam bentuk persentase (data binomial) sehingga diperlukan transformasi arcsin sebelum data diolah secara statistik melalui uji ANOVA dan uji DMRT. Data persentase tidak baik jika langsung digunakan untuk uji statistik dikarenakan data persentase memiliki variansi kesalahan yang merupakan fungsi dari *mean* dan tidak terdistribusi normal tetapi sebaliknya dijelaskan sebagai distribusi binomial (William *et al.*, 1990). Transformasi arcsin digunakan akibat kemampuannya untuk menstabilkan variansi data binomial, dalam arti bahwa data binomial menjadi hampir konstan setelah transformasi (Warton dan Hui, 2011). Data persentase induksi PLB yang sudah ditransformasi diuji homogenitasnya kemudian dianalisis menggunakan uji statistik ANOVA. Bila terjadi interaksi antara BAP dan kitosan dilihat perbedaan pengaruh setiap kombinasi perlakuan. Bila tidak terjadi interaksi dilakukan uji beda rata-rata pada setiap faktor secara terpisah untuk melihat efek BAP atau kitosan saja. Untuk melihat perbedaan rata-rata dilakukan dengan Uji Duncan Multiple Range Test (DMRT), sehingga mendapatkan perlakuan yang optimal.

3.6 Alur Penelitian

Berdasarkan penjelasan pada metode penelitian di atas, Gambar 3.6 mengilustrasikan bagan alur yang akan dilaksanakan secara sistematis.



Gambar 3.6 Bagan Alur Penelitian