

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen faktorial. Penelitian yang dapat diandalkan keilmiahannya atau paling valid adalah penelitian eksperimen, karena dilakukan dengan pengontrolan berdasarkan variabel-variabel yang telah dirumuskan serta terhindar dari variabel pengganggu diluar eksperimen (Borg & Gall, 1983). Pada penelitian ini dicari kombinasi atau konsentrasi zat pengatur tumbuh (ZPT) berupa Benzil Amino Purin (BAP) dan kitosan serta BAP dan air kelapa yang dapat mempertahankan warna hijau, yang dapat menunjukkan respons induksi berupa pembengkakan dan bulatan di tepi eksplan serta yang dapat mengatasi *browning* atau pencoklatan pada eksplan daun Anggrek *Dendrobium sonia* pada suhu tinggi (28-30°C) dan kelembaban yang rendah (45-50%). Pada penelitian ini menggunakan medium ½ Murashige and Skoog (MS). Pada penelitian ini menggunakan rancangan penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial yang terdiri dari tiga faktor, yaitu kitosan dengan 7 taraf variasi penelitian, air kelapa dengan 7 taraf variasi penelitian dan Benzil Amino Purin (BAP) dengan 6 variasi penelitian. RAL digunakan karena faktor yang akan diteliti terdiri lebih dari satu faktor. Persulesy *et al.* (2016) mengatakan bahwa RAL merupakan rancangan percobaan yang sederhana jika dibandingkan dengan rancangan lain.

Berikut merupakan variabel-variabel penelitian yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Variabel kontrol: Medium ½ Murashige-Skoog (MS), lama penyinaran selama 12 jam dan intensitas cahaya (20 watt tubular lamp atau 3600 lm), eksplan daun *Dendrobium sonia*.
2. Variabel bebas:
  - Konsentrasi kitosan, air kelapa dan BAP.
    - a. Kitosan : 0 ppm (sebagai kontrol), 5 ppm, 15 ppm, 25 ppm, 35 ppm, 45 ppm, 55 ppm.
    - b. Air Kelapa : 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%.
    - c. BAP : 0,5 ppm; 1 ppm; 1,5 ppm; 2 ppm; 2,5 ppm; 3 ppm.
  - Suhu ruang (28-30°C) dan kelembaban (45-50%).

3. Variabel terikat: Persentase eksplan daun anggrek *Dendrobium sonia* yang merespons (tetap hijau dan respons induksi berupa pembengkakan dan bulatan di tepi eksplan) serta yang mengalami *browning*.

Tabel 3.1 Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh BAP-Kitosan

	Konsentrasi	BAP					
		0.5	1	1.5	2	2.5	3
Kitosan	0	X1	X2	X3	X4	X5	X6
	5	X7	X8	X9	X10	X11	X12
	15	X13	X14	X15	X16	X17	X18
	25	X19	X20	X21	X22	X23	X24
	35	X25	X26	X27	X28	X29	X30
	45	X31	X32	X33	X34	X35	X36
	55	X37	X38	X39	X40	X41	X42

Tabel 3.2 Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh BAP-Air Kelapa

	Konsentrasi	BAP					
		0.5	1	1.5	2	2.5	3
Air Kelapa	0	A1	A2	A3	A4	A5	A6
	5%	A7	A8	A9	A10	A11	A12
	10%	A13	A14	A15	A16	A17	A18
	15%	A19	A20	A21	A22	A23	A24
	20%	A25	A26	A27	A28	A29	A30
	25%	A31	A32	A33	A34	A35	A36
	30%	A37	A38	A39	A40	A41	A42

Tabel 3.1 dan Tabel 3.2 merupakan tabel kombinasi ZPT BAP-Kitosan dan BAP-Air Kelapa. Berdasarkan tabel tersebut maka dibuat rancangan plotting botol kultur pada Tabel 3.3 dan Tabel 3.4 dalam kombinasi perlakuan kitosan sebanyak 42 perlakuan yang dikodekan dengan huruf dan angka X1 sampai X42. Perlakuan kitosan dilakukan pengulangan sebanyak 1 kali yang dikodekan dengan huruf dan angka Y1 sampai Y42. Perlakuan air kelapa dikodekan A1 sampai A42, dengan pengulangan sebanyak 1 kali yang dikodekan dengan B1 sampai B42. Jumlah pengulangan didasarkan pada perhitungan Rumus Federer (1977):

$$\begin{aligned}
 (t-1)(n-1) &\geq 15 \\
 (42-1)(n-1) &\geq 15 \\
 (41)(n-1) &\geq 15 \\
 41n &\geq 15 + 41 \\
 41n &\geq 56 \\
 n &\geq 1,36
 \end{aligned}$$

Keterangan :  
t = Jumlah perlakuan  
n = Jumlah pengulangan

Tabel 3.3 Rancangan Plotting Botol Kultur ZPT BAP-Kitosan

X25	Y21	X10	Y27	Y36	X5
Y13	X13	Y32	X24	X29	Y37
Y16	Y1	X34	X14	X22	Y31
Y22	X6	X19	X17	X9	X37
Y20	X32	Y23	Y41	X20	Y7
X39	Y35	Y3	Y15	Y10	X8
X23	X41	X12	Y2	Y4	Y29
X39	Y14	Y40	X35	Y9	Y6
X18	Y42	Y18	Y30	X30	Y28
Y11	X2	X3	Y34	X31	X42
X11	X4	Y24	Y5	Y26	Y25
Y8	X27	X16	Y12	X7	X38
X40	X28	X21	Y38	Y33	X17
X33	X1	X36	X26	X15	Y19

Ket:  
X: Perlakuan  
Y: Pengulangan

Tabel 3.4 Rancangan Plotting Botol Kultur ZPT BAP-Air Kelapa

A16	A14	B33	A19	A31	B35
B29	B16	A17	B24	A32	A23
B21	B6	A27	B41	A29	B2
A11	B11	A37	B3	A24	B42
A26	A28	B5	B27	A1	B40
A22	A6	B22	B32	A8	B38
A40	A36	A9	A41	B36	B17
A21	A39	B1	B25	B19	A15
A7	B20	A35	A33	A38	B7
B9	A12	A13	A4	B18	B14
A25	B15	A30	B8	A34	B26
B37	A42	A2	A18	B30	B4
B10	B12	A3	B13	A10	B23
B31	A5	B28	A20	B34	B39

Ket:  
A: Perlakuan  
B: Pengulangan

### 3.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama 7 bulan, dimulai pada bulan Januari 2022 sampai Juli 2022. Pengambilan dan penyusunan data dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, FPMIPA B, 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

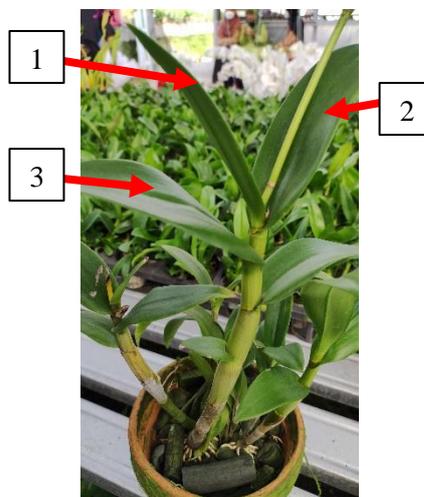
Populasi dalam penelitian ini adalah tanaman *Dendrobium sonia* di Kota Bandung. Sampel yang digunakan adalah tanaman *Dendrobium sonia* di wilayah Cihideung.

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Persiapan Pelaksanaan Penelitian

##### 3.5.1.1 Persiapan Eksplan

Tahap persiapan eksplan dimulai dengan mencari eksplan *Dendrobium sonia*. Daun yang digunakan adalah daun ke-1 hingga ke-3 (Gambar 3.1).



Gambar 3.1 Eksplan daun Anggrek *Dendrobium sonia* yang digunakan dalam penelitian.

(Dokumentasi Pribadi, 2022)

##### 3.5.1.2 Pembuatan Stok Larutan

Pembuatan stok larutan bertujuan untuk mempermudah dalam penimbangan dan pengambilan larutan tiap larutan baik larutan makronutrien, mikronutrien, vitamin, glisin, maupun mio-inositol, karena pada umumnya larutan yang digunakan dalam komposisi medium sangatlah sedikit. Larutan tersebut disimpan dalam wadah gelap dan ditutup rapat dengan plastik dan karet. Larutan stok disimpan dalam kulkas atau lemari es.

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

Larutan stok makronutrien dibuat sebanyak 100 ml, diperlukan 16.5 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 4.4 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3.7 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 19 g  $\text{KNO}_3$  dan 1.7 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Masing-masing zat ditimbang (Gambar 3.2 A) lalu dimasukkan ke dalam gelas ukur

dan dilarutkan dalam 100 ml akuades. Kemudian larutan yang telah jadi dipindahkan ke dalam gelas kimia dan dihomogenkan dengan *stirrer* (Gambar 3.2 B) hingga larut. Setelah larut, masing-masing larutan dipindahkan ke dalam botol gelap 250 ml dan ditutup rapat dengan plastik dan dieratkan dengan karet. Masing-masing botol larutan diberi label sesuai nama bahan dan tanggal pembuatan. Masing-masing larutan diambil sebanyak 5 ml untuk 1 L medium ½ MS.

#### **3.5.1.2.2 Larutan Stok Zat Besi 100 ml (100 kali konsentrasi)**

Larutan stok zat besi dibuat sebanyak 100 ml, diperlukan 0.373 g Na<sub>2</sub>EDTA dan 0.278 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. Masing-masing zat ditimbang (Gambar 3.2 A) lalu dimasukkan ke dalam gelas kimia dan dilarutkan dalam 100 ml akuades, kemudian larutan dihomogenkan dengan *stirrer* (Gambar 3.2 B) hingga larut. Setelah larut, masing-masing larutan dipindahkan ke dalam botol gelap 250 ml dan ditutup rapat dengan plastik dan dieratkan dengan karet. Masing-masing botol larutan diberi label sesuai nama bahan dan tanggal pembuatan. Masing-masing larutan diambil sebanyak 10 ml untuk 1 L medium ½ MS.

#### **3.5.1.2.3 Larutan Stok Mikronutrien 100 ml (100 kali konsentrasi)**

Larutan stok mikronutrien dibuat sebanyak 100 ml, diperlukan 0.62 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.006 g CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0.006 g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 2.23 g MnSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.083 g KI, 0.025 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O dan 0.86 g ZnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O. Masing-masing zat ditimbang (Gambar 3.2 A) lalu dimasukkan ke dalam gelas kimia dan dilarutkan dalam 100 ml akuades, kemudian larutan dihomogenkan dengan *stirrer* (Gambar 3.2 B) hingga larut. Setelah larut, masing-masing larutan dipindahkan ke dalam botol gelap 250 ml dan ditutup rapat dengan plastik dan dieratkan dengan karet. Masing-masing botol larutan diberi label sesuai nama bahan dan tanggal pembuatan. Masing-masing larutan diambil sebanyak 1 ml untuk 1 L medium ½ MS.

#### **3.5.1.2.4 Larutan Stok Glisin 100 ml (10 kali konsentrasi)**

Larutan stok Glisin dibuat sebanyak 100 ml, diperlukan 0.02 g glisin. Glisin ditimbang (Gambar 3.2 A) lalu dimasukkan ke dalam gelas kimia dan dilarutkan dalam 100 ml akuades, kemudian larutan dihomogenkan dengan *stirrer* (Gambar 3.2 B) hingga larut. Setelah larut, larutan Glisin dipindahkan ke dalam botol gelap 250 ml dan ditutup rapat dengan plastik dan dieratkan dengan karet.

Botol larutan diberi label sesuai nama bahan dan tanggal pembuatan. Larutan diambil sebanyak 1 ml untuk 1 L medium  $\frac{1}{2}$  MS.

#### **3.5.1.2.5 Larutan Stok Mio-Inositol 100 ml (10 kali konsentrasi)**

Larutan stok Mio-Inositol dibuat sebanyak 100 ml, diperlukan 1 g Mio-Inositol. Mio-Inositol ditimbang (Gambar 3.2 A) lalu dimasukkan ke dalam gelas kimia dan dilarutkan dalam 100 ml akuades, kemudian larutan dihomogenkan dengan *stirrer* (Gambar 3.2 B) hingga larut. Setelah larut, larutan Mio-Inositol dipindahkan ke dalam botol gelap 250 ml dan ditutup rapat dengan plastik dan dieratkan dengan karet. Botol larutan diberi label sesuai nama bahan dan tanggal pembuatan. Larutan diambil sebanyak 1 ml untuk 1 L medium  $\frac{1}{2}$  MS.

#### **3.5.1.2.6 Larutan Stok Niasin 100 ml (10 kali konsentrasi)**

Larutan stok Niasin dibuat sebanyak 100 ml, diperlukan 0.005 g Niasin. Niasin ditimbang (Gambar 3.2 A) lalu dimasukkan ke dalam gelas kimia dan dilarutkan dalam 100 ml akuades, kemudian larutan dihomogenkan dengan *stirrer* (Gambar 3.2 B) hingga larut. Setelah larut, larutan Niasin dipindahkan ke dalam botol gelap 250 ml dan ditutup rapat dengan plastik dan dieratkan dengan karet. Botol larutan diberi label sesuai nama bahan dan tanggal pembuatan. Larutan diambil sebanyak 1 ml untuk 1 L medium  $\frac{1}{2}$  MS.

#### **3.5.1.2.7 Larutan Stok Piridoksin 100 ml (10 kali konsentrasi)**

Larutan stok Piridoksin dibuat sebanyak 100 ml, diperlukan 0.005 g Piridoksin. Piridoksin ditimbang (Gambar 3.2 A) lalu dimasukkan ke dalam gelas kimia dan dilarutkan dalam 100 ml akuades, kemudian larutan dihomogenkan dengan *stirrer* (Gambar 3.2 B) hingga larut. Setelah larut, larutan Piridoksin dipindahkan ke dalam botol gelap 250 ml dan ditutup rapat dengan plastik dan dieratkan dengan karet. Botol larutan diberi label sesuai nama bahan dan tanggal pembuatan. Larutan diambil sebanyak 1 ml untuk 1 L medium  $\frac{1}{2}$  MS.

#### **3.5.1.2.8 Larutan Stok Tiamin 100 ml (10 kali konsentrasi)**

Larutan stok Tiamin dibuat sebanyak 100 ml, diperlukan 0.001 g Tiamin. Tiamin ditimbang (Gambar 3.2 A) lalu dimasukkan ke dalam gelas kimia dan dilarutkan dalam 100 ml akuades, kemudian larutan dihomogenkan dengan *stirrer* (Gambar 3.2 B) hingga larut. Setelah larut, larutan Tiamin dipindahkan ke dalam botol gelap 250 ml dan ditutup rapat dengan plastik dan dieratkan dengan karet.

Botol larutan diberi label sesuai nama bahan dan tanggal pembuatan. Larutan diambil sebanyak 1 ml untuk 1 L medium  $\frac{1}{2}$  MS.

### 3.5.1.2.9 Larutan Stok Benzil Amino Purin (BAP) 100 ml

Larutan stok BAP dibuat sebanyak 100 ml, diperlukan 0.02 g BAP yang telah ditimbang (Gambar 3.2 A), lalu dimasukkan ke dalam gelas kimia. Kemudian ditambahkan NaOH 1N sebanyak 5-15 tetes hingga larut. Lalu digenapkan dan dilarutkan dengan 100 ml akuades, setelahnya dihomogenkan dengan *stirrer* (Gambar 3.2 B) hingga larut. Setelah larut, larutan BAP dipindahkan ke dalam botol gelap 250 ml dan ditutup rapat dengan plastik dan dieratkan dengan karet. Botol larutan diberi label sesuai nama bahan dan tanggal pembuatan. BAP diambil sebanyak 0.75 ml (0,5 ppm), 1.5 ml (1 ppm), 2.25 ml (1.5 ppm), 3 ml (2 ppm), 3.75 ml (2.25 ppm), 4.5 ml (3 ppm) per 300 ml medium  $\frac{1}{2}$  MS.

### 3.5.1.2.10 Larutan Stok Kitosan 100 ml

Larutan stok kitosan dibuat sebanyak 100 ml, diperlukan 0.25 g kitosan yang telah ditimbang lalu dimasukkan ke dalam gelas kimia. Kemudian ditambahkan NaOH 1N sebanyak 5-15 tetes hingga larut. Lalu digenapkan dan dilarutkan dengan 100 ml akuades, setelahnya dihomogenkan dengan *stirrer* (Gambar 3.2 B) hingga larut. Setelah larut, larutan kitosan dipindahkan ke dalam botol gelap 250 ml dan ditutup rapat dengan plastik dan dieratkan dengan karet. Botol larutan diberi label sesuai nama bahan dan tanggal pembuatan. Penggunaan stok kitosan setiap kombinasi berbeda, bergantung pada konsentrasi yang digunakan. Kitosan diambil sebanyak 2 ml (5 ppm), 6 ml (15 ppm), 10 ml (25 ppm), 14 ml (35 ppm), 18 ml (45 ppm) dan 22 ml (55 ppm) untuk 100 ml medium  $\frac{1}{2}$  MS.



Gambar 3.2 Pembuatan Larutan Stok.

A. Penimbangan bahan untuk larutan stok; B. Larutan stok yang sedang dihomogenkan.

(Dokumentasi Pribadi, 2022)

### 3.5.1.3 Pembuatan Medium Kultur

Pembuatan medium dilakukan setelah pembuatan larutan stok makronutrien, larutan stok mikronutrien, larutan stok zat besi, larutan stok vitamin, larutan stok asam amino, dan larutan stok poliol. Medium yang digunakan adalah medium  $\frac{1}{2}$  MS yang merupakan setengah konsentrasi normal Murashige-Skoog. Syahid & Kristina (2014) mengatakan bahwa media dasar Murashige-Skoog (MS) mengandung unsur hara makro, termasuk nitrogen dan amonium. Penggunaan hara makro MS, memiliki kandungan potasium dan amonium nitrat yang tinggi, menyebabkan aktivitas biosintesis sitokinin meningkat yang mengakibatkan kultur bertunas. Pada penelitian ini, unsur hara pada medium MS yang dikurangi setengah konsentrasinya efektif untuk menginduksi pada beberapa tanaman. Penggunaan sukrosa sebagai sumber energi menggunakan sebanyak 30 g/l dan media dibuat padat dengan penambahan 7 g/l agar. pH media ditentukan dengan rentang 5.6 – 5.8 dengan penambahan NaOH maupun HCl. Medium  $\frac{1}{2}$  MS diberi kombinasi zat pengatur tumbuh BAP dan kitosan serta kombinasi zat pengatur tumbuh BAP dan air kelapa.

Pembuatan medium untuk 42 kombinasi kitosan membutuhkan sebanyak 2 L medium  $\frac{1}{2}$  MS. Sukrosa 30 g ditimbang (Gambar 3.3 E) lalu dituangkan ke dalam *beaker glass* berukuran 2L, kemudian ditambah akuades sebanyak 500 ml, diaduk dan dihomogenkan menggunakan *stirrer* dan supaya cepat larut dipanaskan menggunakan *hot plate* (Gambar 3.3 B), setelah sukrosa larut, seluruh larutan stok dituangkan ke dalam *beaker glass* (Gambar 3.3 D) kemudian dibiarkan hingga homogen. Kemudian dibagi ke dalam 3 *beaker glass* yang berukuran 1 L, masing-masing dituangkan sebanyak 600 ml medium. Ditambahkan kombinasi BAP atau Benzil Amino Purin sebanyak (0.5; 1; 1.5 ppm). Kemudian dibagi ke dalam 6 *beaker glass* ukuran 100 ml dengan masing-masing 100 ml medium, lalu ditambahkan kombinasi kitosan sebanyak (5, 15, 25, 35, 45, 55 ppm). Dilakukan pengukuran pH dengan pH meter sebesar 5.6 – 5.8 (Gambar 3.3 F). Penambahan larutan 0.1N NaOH dan atau 0.1N HCl (Gambar 3.3 C) ke dalam medium hingga mencapai pH yang diinginkan. Masukkan agar sebanyak 0.7 g/100 ml. Medium dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga seluruh agar larut (Gambar 3.3 G). Medium dituangkan ke dalam masing-masing botol kultur sebanyak 10 ml

menggunakan pipet (Gambar 3.3 H). Lalu dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm (Gambar 3.3 I). Medium disimpan pada ruangan steril dengan suhu ruangan (Gambar 3.3 J). Lakukan hal yang serupa pada kombinasi BAP (2; 2.5; 3 ppm).



Gambar 3.3 Pembuatan Medium Kultur.

A. Botol Medium Kultur; B. Medium yang dihomogenkan; C. Larutan Stok serta Larutan NaOH dan HCl; D. Penuangan Larutan Stok; E. Penimbangan Sukrosa; F. Pengukuran pH; G. Medium yang dipanaskan; H. Penuangan Medium ke dalam Botol Kultur; I. Medium yang siap disterilisasi; J. Tempat Penyimpanan Medium Kultur.

(Dokumentasi Pribadi, 2022)

Pembuatan medium untuk 42 kombinasi air kelapa membutuhkan sebanyak 1 L medium  $\frac{1}{2}$  MS. Sukrosa 30 g ditimbang (Gambar 3.3 E) lalu dituangkan ke dalam beaker glass berukuran 2L, kemudian ditambah akuades sebanyak 500 ml, diaduk dan dihomogenkan menggunakan *stirrer* dan supaya cepat larut dipanaskan menggunakan *hot plate* (Gambar 3.3 B), setelah sukrosa larut, seluruh larutan stok dituangkan ke dalam *beaker glass* (Gambar 3.3 D) kemudian

Sri Garcinia Lathifah, 2022

UJI KETAHANAN EKSPAN DAUN *Dendrobium sonia* YANG DIKULTUR PADA SUHU TINGGI DENGAN MEDIUM MS DITAMBAH BAP, KITOSAN DAN AIR KELAPA

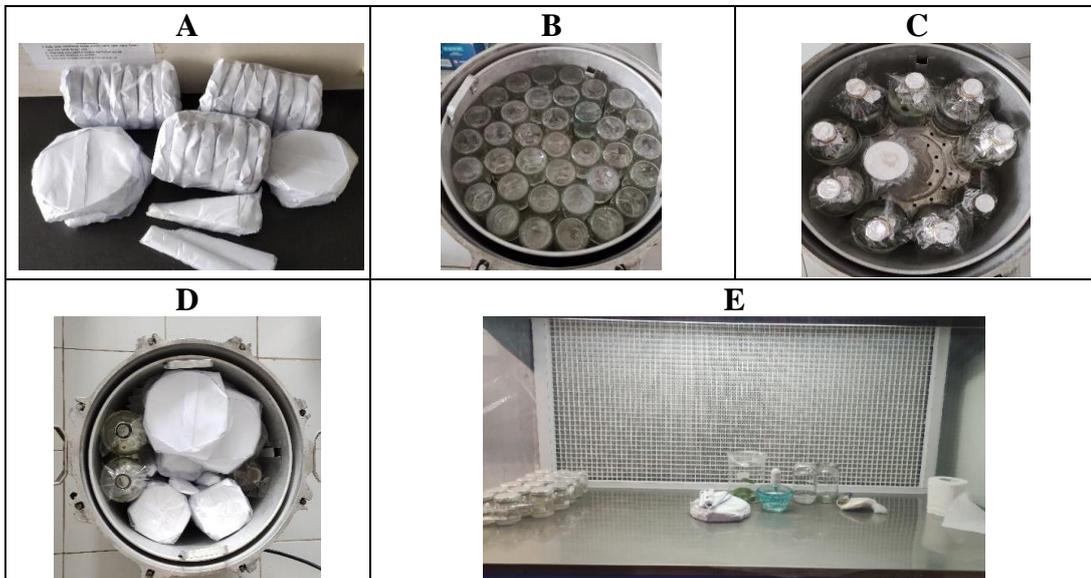
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

dibiarkan hingga homogen. Kemudian, ditambahkan BAP sebanyak (0.5 ppm), kemudian dibagi ke dalam 6 *beaker glass* ukuran 100 ml dengan masing-masing 50 ml medium, lalu ditambahkan kombinasi air kelapa sebanyak (5%; 10%; 15%; 20%; 25%; 30%) dan digenapkan dengan menambahkan ½ MS yang telah dibuat hingga volume mencapai 100 ml untuk setiap kombinasi air kelapa. Dilakukan pengukuran pH dengan pH meter sebesar 5.6 – 5.8 (Gambar 3.3 F). Penambahan larutan 0.1N NaOH dan atau 0.1N HCl (Gambar 3.3 C) ke dalam medium hingga mencapai pH yang diinginkan. Masukkan agar sebanyak 0.7 g/100 ml. Medium dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga seluruh agar larut (Gambar 3.3 G). Medium dituangkan ke dalam masing-masing botol kultur sebanyak 10 ml menggunakan pipet (Gambar 3.3 H). Lalu dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm (Gambar 3.3 I). Medium disimpan pada ruangan steril dengan suhu ruangan (Gambar 3.3 J). Lakukan hal yang serupa pada kombinasi BAP (1; 1.5; 2; 2.5; 3 ppm).

#### **3.5.1.4 Sterilisasi**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini seperti dalam melakukan pembuatan medium dan penanaman eksplan, perlu disterilisasi untuk meminimalisir terjadinya kontaminasi terhadap eksplan yang ditanam. Alat-alat gelas dan logam, serta alat *dissecting set* (scalpel dan pinset), botol kultur (Gambar 3.4 B), tips mikropipet, dan kertas saring dicuci dengan sabun lalu dibilas dengan air bersih dan dikeringkan. Alat gelas dan logam serta *dissecting set* yang telah bersih dan kering dibungkus dengan kertas dan dimasukkan ke dalam plastik tahan panas (Gambar 3.4 A). Seluruh alat disterilkan menggunakan autoklaf selama 30 menit dalam suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm (Gambar 3.4 D). Setelah proses sterilisasi, seluruh alat yang sudah disterilisasi disimpan ditempat yang bersih. Pada saat penanaman semua alat yang akan digunakan disterilkan dengan menggunakan alkohol 70% dan dalam keadaan aseptik menggunakan spirtus. Hal tersebut dilakukan setiap akan digunakan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Sebelum melakukan penanaman, LAF atau *Laminar Air Flow* disterilisasi terlebih dahulu menggunakan alkohol 70%, namun sebelumnya disinari dengan *Ultraviolet* (UV) selama 30 menit, dan dialirkan udara selama 30 menit (Gambar 3.4 E). Akuades

perlu disterilisasi untuk meminimalisir kontaminasi pada eksplan daun Anggrek *Dendrobium sonia* yang digunakan (Gambar 3.4 C).



Gambar 3.4 Sterilisasi Alat.

A. Alat yang sudah siap untuk disterilisasi; B. Sterilisasi Botol Kultur pada autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 30 menit; C. Sterilisasi Akuades pada autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 30 menit; D. Sterilisasi Alat pada autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 30 menit; E. Sterilisasi LAF dan alat yang digunakan untuk penanaman di dalam LAF.

(Dokumentasi Pribadi, 2022)

### 3.5.2 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.5.2.1 Pengambilan Eksplan

Tanaman Anggrek *Dendrobium sonia* (Gambar 3.5), yang berumur 6 bulan diambil dari wilayah Cihideung, Kota Bandung. Eksplan yang digunakan adalah daun ke-1 sampai daun ke-3.



Gambar 3.5 Eksplan Daun Anggrek *Dendrobium sonia*

(Dokumen Pribadi, 2022)

#### 3.5.2.2 Sterilisasi Eksplan

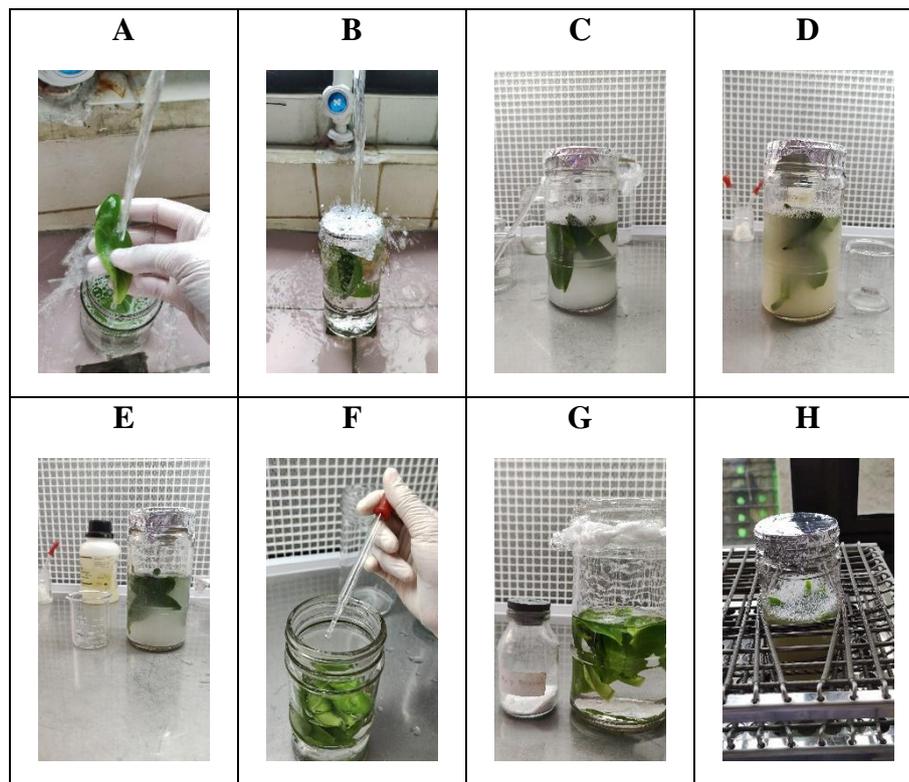
Sterilisasi eksplan terbagi menjadi dua tahap yakni tahap di luar LAF dan di dalam LAF. Sterilisasi yang dilakukan di luar LAF melalui 2 langkah, yakni

Sri Garcinia Lathifah, 2022

UJI KETAHANAN EKSPAN DAUN *Dendrobium sonia* YANG DIKULTUR PADA SUHU TINGGI DENGAN MEDIUM MS DITAMBAH BAP, KITOSAN DAN AIR KELAPA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

langkah pertama dengan sabun dan dibilas dengan air mengalir, lalu langkah kedua dengan detergen 2% dan dibilas dengan akuades. Langkah pertama yang perlu dilakukan adalah eksplan dibersihkan menggunakan sabun (Gambar 3.6 A) lalu dibilas dengan air mengalir sampai tidak ada sabun yang tersisa (Gambar 3.6 B) selama 45 menit atau 3 kali 15 menit. Langkah kedua, eksplan direndam dalam larutan detergen 2% (Gambar 3.6 C) selama 10 menit dan dikocok menggunakan *shaker* (Gambar 3.6 H). Eksplan dibilas menggunakan akuades sebanyak 3 kali hingga busa detergen hilang. Sterilisasi dilakukan di dalam LAF.



Gambar 3.6 Sterilisasi Eksplan.

A. Eksplan dicuci menggunakan sabun; B. Eksplan di aliri air mengalir; C. Eksplan direndam dalam larutan detergen 2%; D. Eksplan direndam dalam larutan agrept 0.1%; E. Eksplan direndam dalam larutan benstar 0.1%; F. Eksplan ditetesi larutan tween; G. Eksplan direndam dalam larutan  $\text{HgCl}_2$  0.1%; H. Eksplan yang dikocok menggunakan *shaker*.

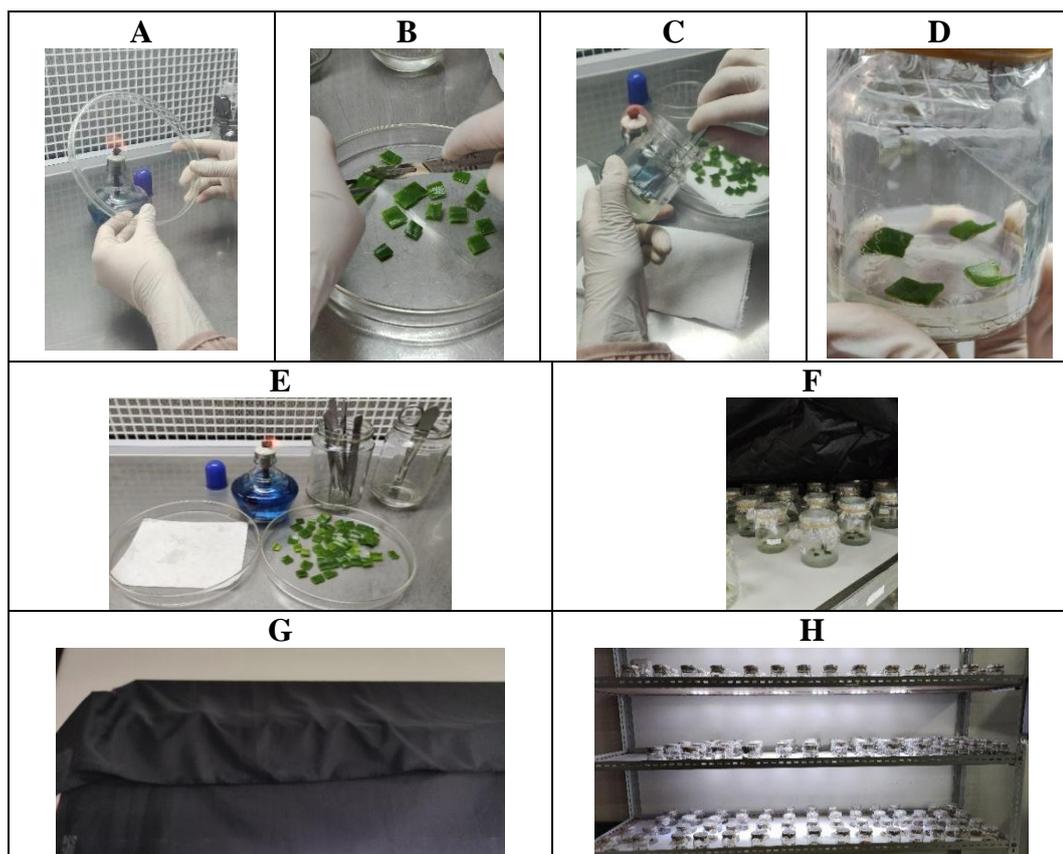
(Dokumentasi Pribadi, 2022)

Langkah ketiga, eksplan dibilas kembali menggunakan akuades steril, lalu dimasukkan ke dalam larutan agrept atau bakterisida 0.1% (Gambar 3.6 D) dikocok menggunakan *shaker* selama 30 menit (Gambar 3.6 H), lalu dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Langkah keempat, eksplan dimasukkan ke dalam larutan benstar atau fungisida 0.1% (Gambar 3.6 E) dikocok menggunakan *shaker* selama

30 menit (Gambar 3.6 H), lalu dibilas kembali menggunakan akuades steril sebanyak 3 kali. Langkah kelima, eksplan diberi larutan *tween* 20 sebanyak 2-4 tetes (Gambar 3.6 F) lalu dikocok menggunakan *shaker* selama 5 menit (Gambar 3.6 H), dibilas kembali menggunakan akuades steril sebanyak 3 kali. Langkah terakhir, eksplan disterilisasi menggunakan larutan HgCl<sub>2</sub> 0.1% (Gambar 3.6 G) dikocok menggunakan *shaker* (Gambar 3.6 H) selama 10 menit, lalu bilas menggunakan akuades.

### 3.5.2.3 Penanaman Eksplan

Tahap penanaman eksplan dilakukan di dalam LAF dengan kondisi steril dan aseptik. Alat yang digunakan dalam LAF dipanaskan atau dibakar pada bunsen spiritus (Gambar 3.7 A). Eksplan dipotong dengan ukuran 1x1 cm (Gambar 3.7 B) menggunakan *steril blade*. Eksplan daun ditanam ke dalam medium kombinasi zat pengatur tumbuh BAP dan kitosan serta BAP dan air kelapa (Gambar 3.7 C).



Gambar 3.7 Penanaman Eksplan.

A. Membakar alat yang akan digunakan saat penanaman dengan spirtus; B. Eksplan daun dipotong 1x1 cm; C. Penanaman ke dalam medium; D. Botol berisikan 4 buah eksplan; E. Alat yang digunakan dalam penanaman; F. Botol kultur yang disimpan dalam keadaan gelap; G. Kondisi Gelap; H. Kondisi Terang. (Dokumen Pribadi, 2022)

Setiap botol berjumlah 4 buah potongan eksplan (Gambar 3.7 D). Botol kultur ditutup menggunakan *aluminium foil* dan plastik yang dieratkan dengan karet. Botol kultur disimpan dalam ruang kultur dalam kondisi gelap (Gambar 3.7 F) selama 1 bulan. Setelah 1 bulan botol kultur dipindahkan ke tempat terang dengan penyinaran lampu neon 20 watt (3600 lm) selama 12 jam (Gambar 3.7 H).

### 3.5.3 Tahap Pengumpulan Data

Pengamatan ketahanan eksplan daun yang memberikan respons induksi berupa pembengkakan dan bulatan di tepi eksplan, dilakukan setelah penyimpanan di ruang gelap setiap 3 hari sekali selama 1 bulan. Semua respons induksi seperti yang mengalami pembengkakan atau pengembangan dan terbentuk bulatan-bulatan di tepi eksplan yang muncul didokumentasikan. Respons yang berhasil diinduksi maupun eksplan yang masih berwarna hijau serta eksplan yang mengalami *browning* dari berbagai kombinasi zat pengatur tumbuh BAP dan kitosan serta BAP dan air kelapa pada semua ulangan dihitung jumlahnya. Persentase ketahanan eksplan pada setiap kombinasi dihitung, lalu dirata-ratakan dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Persentase Ketahanan Eksplan} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang merespons}}{\text{Jumlah eksplan total}} \times 100\%$$

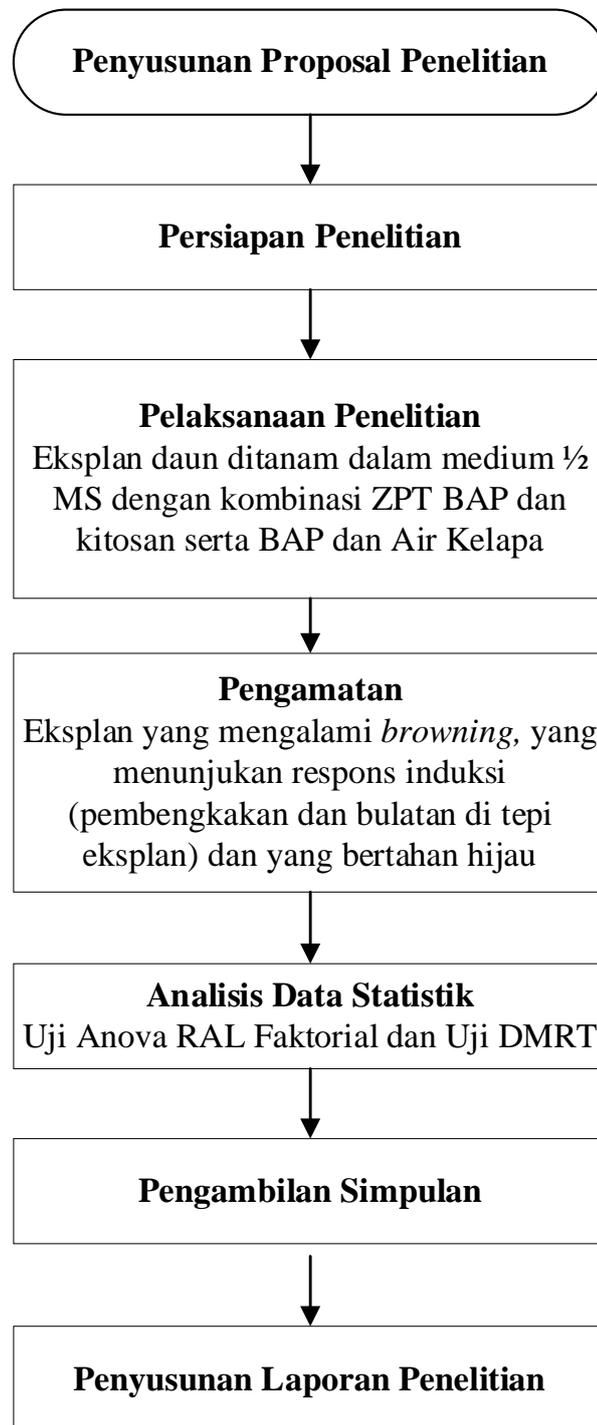
Perhitungan persentase ketahanan respons eksplan daun Anggrek *Dendrobium sonia* dihitung dengan menggunakan rumus uji ketahanan benih, dengan dihitung menggunakan rumus daya kecambah (%) berasal dari rumus *International Seed Testing Association* atau ISTA (1972 dalam Kuswanto 1996).

### 3.5.4 Analisis Data

Data dianalisis secara kualitatif dengan menggunakan analisis statistika melalui uji *anova RAL factorial* melalui *software Microsoft Excel* untuk melihat pengaruh dari setiap perlakuan yang diberikan. Uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) melalui *software Statistical Program for Social Science* (SPSS) untuk melihat perbedaan antara kombinasi zat pengatur tumbuh BAP dan kitosan serta BAP dan air kelapa yang diberikan.

### 3.6 Alur Penelitian

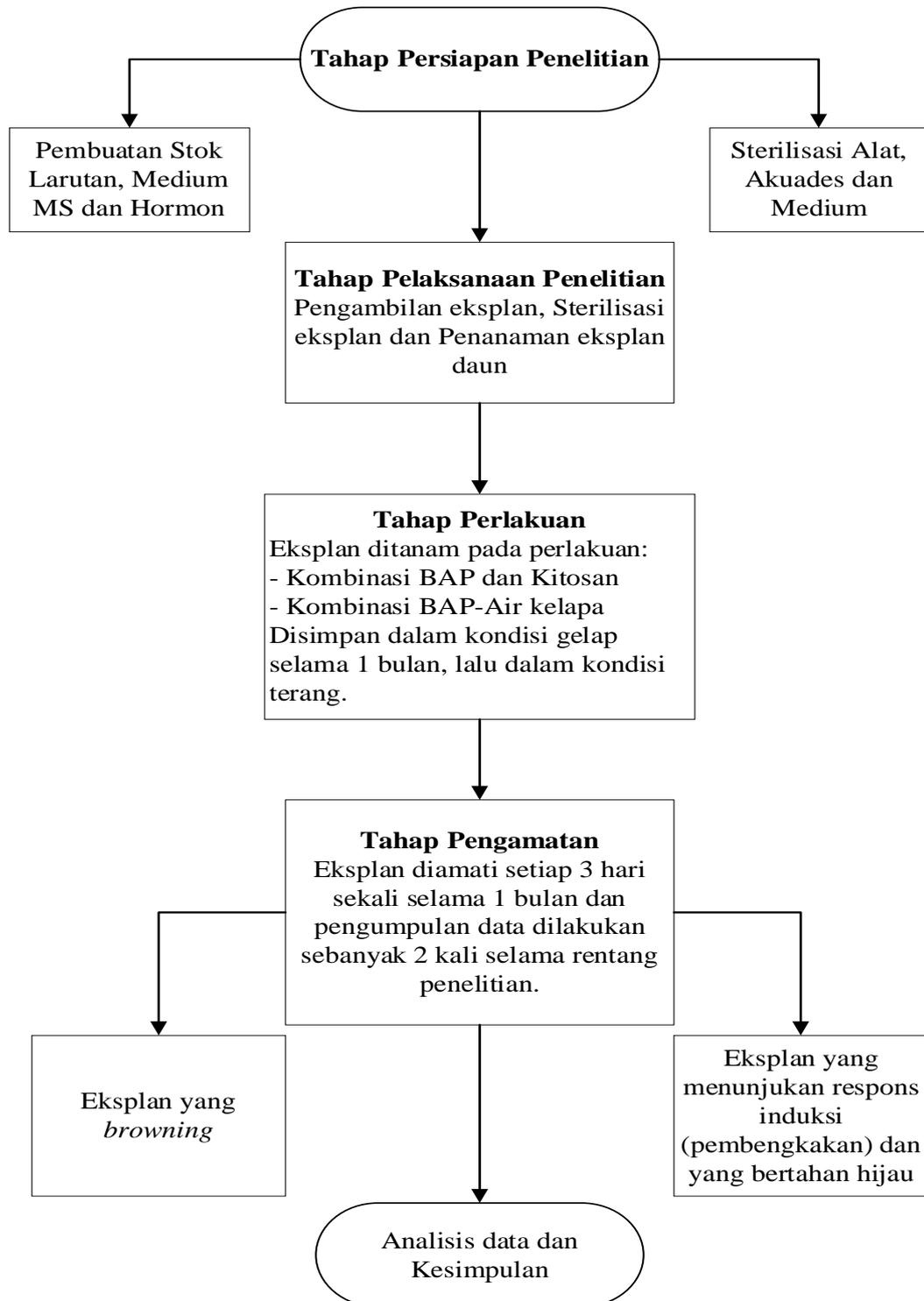
Pada Gambar 3.8 diilustrasikan bagan alur penelitian secara keseluruhan.



Gambar 3.8 Bagan Alur Penelitian

### 3.7 Alur Kerja

Berdasarkan penjelasan pada metode penelitian, pada Gambar 3.9 diilustrasikan bagan alur yang dilaksanakan secara sistematis.



Gambar 3.9 Bagan Alur Kerja