

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu percobaan

Percobaan dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi dan Laboratorium Kultur Jaringan BRIN Kebun Raya Bogor pada bulan Agustus hingga November 2023.

3.2 Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan dalam percobaan ini yaitu autoklaf, *laminar airflow*, timbangan analitik, alat *shaker*, gelas ukur, *beaker glass*, botol kultur, labu Erlenmeyer, kertas *tissue*, *magnetic hotplate stirrer*, stapler, pipet ukur, mikropipet, blender, kompor, tabung gas, pembakar api Bunsen, *scalpel*, pinset, pemantik api, petridish, *plastic wrap*, mikroskop alat tulis, dan spatula.

Bahan yang digunakan adalah buah anggek, alkohol 70%, akuades, alkohol 95%, agar, sukrosa, spirtus, pH indikator, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Fe}(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaOH, HCl, hormon NAA dan umbi bawang merah.

3.3 Metode penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan metode eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 6 perlakuan dan diulang 5 kali. Perlakuan kombinasi konsentrasi ekstrak umbi bawang merah dan hormon NAA yang ditambahkan pada media *Vacin and Went* (VW) adalah sebagai berikut :

A = Tanpa Perlakuan (kontrol) ;

B = Ekstrak umbi bawang merah 50 g/L + NAA 1,25 ppm;

C = Ekstrak umbi bawang merah 100 g/L + NAA 1 ppm;

D = Ekstrak umbi bawang merah 150 g/L + NAA 0,75 ppm;

E = Ekstrak umbi bawang merah 200 g/L + NAA 0,5 ppm;

F = Ekstrak umbi bawang merah 250 g/L + NAA 0,25 ppm.

Terdapat 30 unit percobaan dan setiap unit terdiri dari dua botol kultur. Model linier untuk rancangan acak lengkap adalah sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan :

$i = 1, 2, 3, 4, 5, 6$

$j = 1, 2, 3, 4, 5$

Y_{ij} : Pengamatan pada perlakuan ke- i dan ulangan ke- j

μ : Rataan umum

τ_i : Pengaruh perlakuan ke- i

ε_{ij} : Pengaruh acak pada perlakuan ke- i ulangan ke- j .

Data hasil pengamatan dianalisis dengan sidik ragam (Uji F) pada taraf nyata 5%, seperti tersaji pada Tabel 2.

Tabel 2. Daftar Sidik Ragam

Sumber	db	JK	KT	F Hitung	F 0,05
Keragaman					
Perlakuan	5	JKP	JKP/db P	KTP/KTG	2,62
Galat	24	JKG	JKG/db galat		
Total	29	JKT			

Sumber : (Harsojuwono dkk., 2021)

Kaidah pengambilan keputusan berdasarkan pada nilai F hitung dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Kaidah Pengambilan Keputusan

Hasil Analisa	Kesimpulan analisa	Keterangan
$F_{hit} \leq F_{0,05}$	Berbeda tidak nyata	Tidak terdapat perbedaan yang nyata antara perlakuan
$F_{hit} > F_{0,05}$	Berbeda nyata	Terdapat perbedaan yang nyata antara perlakuan

Sumber : (Harsojuwono dkk., 2021)

Apabila hasil uji F terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan maka dilakukan pengujian lanjutan dengan menggunakan Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf kesalahan 5 %. Rumus yang digunakan adalah sebagai berikut:

$$LSR = SSR (\alpha \times dbg \times p) \times Sx$$

$$S_x = \sqrt{\frac{KTG}{r}}$$

Keterangan :

LSR = jarak nyata terkecil

SSR = titik kritis

α = taraf nyata

dbg = derajat bebas galat

p = jarak relatif antar perlakuan tertentu dengan peringkat berikutnya (2, 3, ...t)

Sx = galat baku

KTG = kuadrat tengah galat

r = banyaknya ulangan

3.3 Prosedur penelitian

3.3.1 Sterilisasi alat-alat

Semua peralatan yang digunakan untuk proses kultur *in vitro* seperti botol kultur, erlenmeyer, scalpel, mata pisau, gelas ukur, pinset diseterilkan dengan cara sebagai berikut : Peralatan yang akan digunakan tersebut dicuci dengan air bersih kemudian dikeringkan. Setelah kering kemudian peralatan tersebut dibungkus dengan kertas dan plastik yang tahan panas. Selanjutnya dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit.

3.3.2 Sterilisasi Laminar airflow

Sterilisasi *laminar airflow* dilakukan dengan cara menyemprotkan alkohol 70% ke bagian dalam *laminar airflow*, kemudian dilap dengan kertas *tissue*, setelah itu, lampu UV dinyalakan selama 60 menit.

3.3.3 Sterilisasi rak Inkubasi

Sterilisasi rak inkubasi dilakukan dengan cara disemprot dengan alkohol 70% kemudian di lap menggunakan kertas *tissue*.

3.3.4 Sterilisasi Eksplan

Buah anggek yang digunakan adalah jenis anggek *Dendrobium diggibum*. Buah anggek diseterilkan dengan cara dicuci pada air mengalir dan sedikit memakai detergen selama 30 menit, kemudian dibilas menggunakan aquadest

steril sebanyak 3 kali. Setelah dibilas buah anggek dimasukkan ke dalam botol kemudian diserilisasikan di dalam *laminar airflow*. Selanjutnya buah anggek disimpan di dalam botol steril untuk dibawa ke ruang penanaman.

3.3.5 Pembuatan larutan stok

Pembuatan larutan stok bertujuan untuk memudahkan dalam pembuatan media dan menghindari penimbangan komponen secara berulang agar meminimalisir kontaminasi terhadap media.

a. Pembuatan larutan stok hara. Larutan stok hara terdiri dari stok A ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), stok B (KNO_3), stok C (KH_2PO_4), stok D ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), stok E ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), dan stok F ($\text{Fe}(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Stok A, B dibuat 50 kali pembesaran, sementara stok C, D, E, dan F dibuat 250 kali pembesaran untuk pembuatan media satu liter, perhitungan jumlah bahan yang digunakan dalam pembuatan larutan stok hara dapat dilihat pada Lampiran 4.

Tahapan pembuatan larutan stok sebagai berikut :

- 1) Bahan untuk masing-masing larutan stok unsur hara makronutrien dan unsur hara mikronutrien ditimbang menggunakan timbangan analitik.
 - 2) Melarutkan masing-masing bahan yang sudah ditimbang dengan menambahkan akuades sebanyak 250 mL.
 - 3) Bahan yang sudah dilarutkan diaduk menggunakan *hot plate magnetic stirrer*, dan setelah masing-masing bahan larut, maka larutan ditambahkan akuades steril hingga volume mencapai 1 L menggunakan gelas ukur.
 - 4) Larutan stok hara yang sudah ditera, dimasukkan ke dalam botol gelas berwarna coklat lalu diberi label dan tanggal pembuatan larutan stok.
 - 5) Untuk botol larutan stok F dibungkus menggunakan aluminium foil agar tidak ada cahaya yang masuk, karena akan mempengaruhi reaksi di dalam larutan tersebut.
- b. Pembuatan larutan stok ekstrak bawang merah
- 1) Menyiapkan 1000 gam bawang merah yang telah dikupas dan dicuci bersih serta 1 L akuadest steril.
 - 2) Bawang merah dipotong hingga menjadi bagian yang kecil-kecil.
 - 3) Menghaluskan bawang merah menggunakan blender.

- 4) Ekstrak bawang merah tersebut disaring agar ampas bawang merah terpisah
 - 5) Ekstrak tersebut ditambahkan dengan akuades steril hingga volume mencapai 1 L dan disimpan di wadah yang steril.
- c. Pembuatan larutan stok hormon NAA 100 ppm
- 1) Menimbang hormon NAA sebanyak 50 mg.
 - 2) NAA yang sudah ditimbang kemudian dilarutkan menggunakan NaOH/KOH sampai larut
 - 3) Menambahkan akuades steril hingga 500 mL.
 - 4) Masukkan larutan stok NAA kedalam botol coklat
 - 5) Memberi label pada botol dan disimpan pada lemari pendingin.
- d. Pembuatan media VW (*Vacin and Went*)

Untuk menghitung jumlah kebutuhan volume larutan stok yang sudah dibuat dalam setiap pembuatan media menggunakan rumus sebagai berikut (Dwiyani, 2015) :

$$V1.M1 = V2.M2$$

Keterangan :

V1 = volume larutan stok yang akan diambil (mL atau L)

V2 = volume media (mL atau L)

M1 = konsentrasi pembesaran larutan stok (mg/L atau g/L)

M2 = konsentarsi sesuai kebutuhan (mg/L atau g/L)

Langkah-langkah pembuatan media VW sebagai berikut :

- 1) Komposisi senyawa tiap media dapat dilihat pada lampiran 3.
- 2) Pengambilan tiap larutan stok dan ekstrak bawang merah sesuai perlakuan, dimasukkan kedalam erlenmeyer ukuran 1 liter.
- 3) Selanjutnya ditambahkan sukrosa sebanyak 30g/L dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan akuadest sampai volume 900 mL.
- 4) Kemudian ukur pH larutan menggunakan indikator pH dan diusahakan pH antara 5,5-5,8. Jika pH terlalu rendah maka dinaikkan dengan menambahkan NaOH 0,1 N dan jika pH terlalu tinggi diturunkan dengan menambahkan HCL 0,1 N.

- 5) Menambahkan agar sebanyak 7 g/L, kemudian ditambahkan akuades steril sampai volume 1 liter.
- 6) Larutan media diaduk terus sambil dipanaskan hingga suhu mencapai 80°C.
- 7) Selanjutnya larutan media dimasukkan kedalam botol kultur dengan masing-masing botol sebanyak kurang lebih 25 mL, dan botol di tutup dengan rapat dengan penutup botol dan plastik *wrap*.
- 8) Botol kultur yang berisikan media di sterilisasi menggunakan autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C dengan tekanan sebesar 15 psi.
- 9) Mengeluarkan botol kultur setelah disterilisasi dan disimpan kedalam ruang penyimpanan. Ruang inkubasi.

3.3.6 Penanaman eksplan (biji anggek)

Penanaman eksplan biji dilakukan secara aseptik di dalam laminar *airflow*.

Dengan langkah-langkah sebagai berikut :

- 1) Buah anggek yang berada di dalam botol dikeluarkan dengan cara dijepit menggunakan pinset, kemudian buah anggek dicelupkan kedalam alkohol dan dibakar di atas api bunsen dan biarkan hingga api padam. Langkah tersebut diulangi hingga 3 kali dan selanjutnya setelah disterilkan buah anggek disimpan di dalam *petridish*.
- 2) Ujung buah dibelah dengan pisau steril mengikuti garis kulit menjadi 3 ruas.
- 3) Selanjutnya biji yang ada di dalam buah di tabur ke permukaan media dengan hati-hati, kemudian botol diketukkan di tangan agar biji merata.
- 4) Biji anggek yang telah ditanam ke dalam botol kultur kemudian di simpan di dalam ruang inkubasi.

3.3.7 Pemeliharaan

Botol-botol kultur yang sudah ditanami eksplan disimpan di dalam ruangan inkubasi/ruang kultur dengan pecahaya optimal (cahaya 1000 lux atau setara dengan 1 lampu TL 40 Watt) dengan suhu berkisar 24°C sampai 26°C dengan kelembaban 49% dan dilakukan penyemprotan menggunakan alkohol 70% (Saepuddin, Yulianto dan Aeni, 2021).

3.4 Pengamatan

3.4.1 Pengamatan penunjang

a. Waktu terbentuk *protocorm like bodies* (Plb)

Pengamatan dilakukan dengan mencatat pada minggu ke berapa struktur bulat hijau muncul pada eksplan pada setiap perlakuan. Pengamatan dilakukan selama masa percobaan berlangsung.

b. Jumlah kontaminasi

Pengamatan dilakukan dengan melihat jumlah media yang terkontaminasi dari luar botol dan mencatat berapa jumlah botol yang terkontaminasi pada tiap perlakuan. Pengamatan dilakukan selama masa percobaan berlangsung.

3.4.2 Pengamatan utama

a. Persentase biji berkecambah

Pengamatan persentase biji berkecambah dilakukan dengan menghitung jumlah biji yang berkecambah dibagi jumlah biji yang disebar. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop olympus CX31 + kamera yang terhubung dengan komputer, pengamatan dilakukan pada 4 MST.

Persentase perkecambahan biji anggek dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Persentase pertumbuhan biji} = \frac{\text{jumlah biji yang tumbuh}}{\text{jumlah biji yang disebar}} \times 100\%$$

b. Fase perkembangan embrio

Pengamatan dilakukan dengan melihat perkembangan embrio menggunakan mikroskop olympus CX31 + kamera yang terhubung dengan komputer dan mencatat jumlah setiap fase pertumbuhan biji anggek yang muncul dalam setiap botol kultur per perlakuan, pengamatan dilakukan pada 8 MST. Beberapa tahapan fase pertumbuhan anggek menurut Diantina dkk. (2020) adalah sebagai berikut :

Fase 0 : embrio di dalam biji terlindungi testa,

Fase 1 : embrio membengkak masih dilindungi testa,

Fase 2 : embrio membentuk protokorm dan rhizoid,

Fase 3 : inisiasi protokomeristem,

Fase 4 : munculnya daun pertama.

Gambar pengamatan fase perkembangan embrio sebagai referensi, dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Fase perkembangan embrio angkek *Dendrobium sp.* fase 0 : embrio masih dilindungi testa, fase 1 : embrio mulai mengalami pembengkakan, fase 2: embrio mulai membentuk protocorm serta membentuk akar semu, fase 3 : protocorm memiliki bakal tunas. (dokumentasi pribadi)

c. Persentase *Protocorm Like Bodies* (Plb) yang tumbuh

Pengamatan Persentase *protocorm like bodies* (Plb) yang tumbuh dilakukan dengan menghitung jumlah Plb yang tumbuh pada setiap botol per perlakuan dengan menggunakan “*handly tally counter*”. Pengamatan dilakukan pada 12 MST. Persentase Plb yang tumbuh dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Persentase Plb yang tumbuh} = \frac{\text{jumlah plb yang tumbuh}}{\text{jumlah biji yang disebar}} \times 100\%$$