

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Wibi Orchid Nursery, Kampung Kalibening, Banjarharja, Kalipucang, Pangandaran, Jawa Barat. Waktu pelaksanaan dimulai pada bulan Desember 2023 sampai dengan bulan Maret 2024.

3.2 Alat dan bahan penelitian

Peralatan yang digunakan pada percobaan ini antara lain enkas, autoklaf, alat diseksi (pinset, pisau, spatula), rak botol kultur, alat memasak (kompor gas, panci, sendok pengaduk), *beaker glass*, cawan petri, pengaduk kaca, corong, timbangan analitik, *hand sprayer*, botol kultur (botol kaca ukuran 100 ml), pH meter, *tissue*, plastik wrap, karet gelang, plastik, kertas label, *thermohigrimeter*, penggaris, alat tulis, dan alat dokumentasi.

Bahan yang digunakan adalah eskplan hasil kultur *in vitro* anggrek *Cattleya* hibrida yang diperoleh dari Wibi Orchid Nursery, bahan organik : (umbi kentang, air kelapa, dan buah pisang), arang aktif, pupuk Gaviota 63, alkohol, aquades, media *Murashige & Skoog* (MS), gula, dan agar-agar. Bahan sterilisasi yang digunakan untuk mensterilkan alat adalah *clorox*, detergen, alkohol, dan formalin.

3.3 Metode penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan rancangan percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) non faktorial dengan 5 perlakuan dan 5 ulangan sehingga diperoleh 25 unit percobaan dan setiap unit percobaan terdiri dari 4 *plantlet*. Formula nutrisi yang digunakan adalah pupuk gaviota dan bahan organik. Faktor perlakuan yaitu konsentrasi pupuk daun terdiri dari lima taraf perlakuan, yaitu :

A = Kontrol $\frac{1}{2}$ MS (2,21 g/L)

B = Pupuk daun konsentrasi 0,25 g/L

C = Pupuk daun konsentrasi 0,50 g/L

D = Pupuk daun konsentrasi 0,75 g/L

E = Pupuk daun konsentrasi 1 g/L

3.4 Analisis Data

Metode linier dari Rancangan Acak Lengkap (RAL) non faktorial sebagai berikut:

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

Keterangan:

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.

Berdasarkan metode linier tersebut disusun dalam daftar sidik ragam sebagai berikut ini tabel 5.

Tabel 1. Daftar sidik ragam

Sumber Ragam	DB	JK	KT	Fhit	F 0,05
Perlakuan	4	$\frac{\sum Y_i^2}{t} - FK$	JKP/DB	KTP/KTG	2,87
Galat	20	JK(T)-JK(P)	JKG/DBG		
Total	24	$\sum X_{ij}^2 - FK$	-		

Sumber : Gomez dan Gomez, 2010

Pengaruh yang diberikan terhadap subkultur *plantlet* anggrek diketahui dengan menggunakan uji F. Berikut kaidah pengambilan keputusan disajikan dalam tabel.

Tabel 2. Kaidah pengambilan keputusan

Hasil analisa	Kesimpulan analisa	Keterangan
$F_{hit} \leq F_{0.05}$	Berbeda tidak nyata	Tidak ada pengaruh antar perlakuan
$F_{hit} > F_{0.05}$	Tidak berbeda nyata	Ada pengaruh antar perlakuan

Jika nilai F menunjukkan perbedaan nyata maka dilakukan uji lanjutan dengan jarak berganda *Duncan* pada taraf 5% dengan rumus sebagai berikut :

$$s\bar{x} = \sqrt{\frac{KT_{galat}}{r}}$$

Keterangan :

- $S\bar{x}$: Galat baku rata-rata (*Standard Error*)
KTG : Kuadrat Tengah galat
r : Jumlah ulangan pada tiap nilai tengah perlakuan yang dibandingkan.

3.5 Prosedur penelitian

3.5.1 Sterilisasi alat

Sterilisasi alat meliputi alat-alat penanaman (*multiplikasi*) dan botol kultur. Sterilisasi alat-alat penanaman seperti cawan petridish, pinset dan *scalple* dilakukan dengan cara mencuci alat-alat tersebut sampai bersih dengan detergen kemudian dikeringkan. Alat yang sudah dikeringkan kemudian dimasukkan ke dalam plastik tahan panas yang sudah disemprot alkohol 70% lalu diikat dengan karet agar tidak lepas selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung *autoclave* dengan suhu 121°C selama 20 menit setelah katup berbunyi.

Sterilisasi botol kultur dilakukan dengan cara merendam botol-botol dengan air yang sudah dicampur dengan detergen selama 12 jam, setelah itu dicuci hingga bersih dan dikeringkan. Botol-botol yang sudah kering kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 20 menit setelah katup berbunyi. Botol yang sudah steril kemudian dimasukkan ke dalam plastik yang sudah disemprot alkohol 70% lalu diikat (Pebriyanti, 2023).

3.5.2 Sterilisasi enkas

Enkas yaitu ruangan kotak kedap udara dan steril yang terbuat dari kaca atau akrilik. Cara kerja sterilisasi enkas dilakukan dengan cara menyemprotkan alkohol 70% ke dalam enkas kemudian seluruh permukaan kaca dalam enkas dilap hingga bersih. Enkas kemudian ditutup dan disterilkan menggunakan formalin selama 24 jam sebelum penanaman (Pebriyanti, 2023).

3.5.3 Pembuatan media kultur dan penerapan perlakuan

Media dasar yang digunakan dalam percobaan ini yaitu bahan organik yang terdiri dari buah pisang, umbi kentang, dan air kelapa. Untuk percobaan perlakuan yang digunakan pada penelitian ini yaitu nutrisi *Murashige & Skoog* sebagai kontrol

perlakuan dan pupuk daun Gaviota 63 sebagai percobaan perlakuan. Tahapan pembuatan media kultur dan penerapan perlakuan adalah sebagai berikut :

a. Pembuatan larutan bahan organik

Untuk setiap 1 L larutan bahan organik terdiri dari buah pisang sebanyak 50 g, umbi kentang sebanyak 50 g, dan air kelapa 50 ml dicampurkan dengan air sampai 1 liter, kemudian dihaluskan dengan blender menjadi campuran yang cair dan homogen (larutan bahan organik). Larutan bahan organik yang dibuat sebanyak 5 L untuk 5 perlakuan (Wibisono, 2022).

b. Penerapan perlakuan

Perlakuan A, nutrisi *Murashige & Skoog* sebanyak 2,21 g ditambahkan ke larutan bahan organik 1 L. Perlakuan B, pupuk daun sebanyak 0,25 g ditambahkan ke dalam larutan bahan organik 1 L, demikian pula untuk perlakuan C, D, dan E, sebanyak 0,50 g, 0,75 g, dan 1 g ditambahkan ke dalam larutan bahan organik 1 L. Selanjutnya ditambahkan glukosa sebanyak 20 g, agar-agar sebanyak 7 g, dan arang aktif sebanyak 2 g ke dalam masing-masing larutan media.

c. Lalu campuran media tersebut dipanaskan hingga mendidih dan dimasukkan ke dalam botol kultur masing-masing sebanyak 30 ml.

d. Botol yang sudah berisi media kemudian ditutup dengan tutup botol karet dan dibalut plastik *wrap*.

e. Botol media kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 20 menit setelah katup berbunyi.

f. Botol media yang sudah dikeluarkan dari *autoclave* kemudian di simpan di ruang inkubasi.

3.5.4 Penanaman

Proses penanaman *plantlet* ini dilakukan pada enkas secara aseptik. Bahan *plantlet* yang digunakan merupakan hasil kultur *in vitro* dari buah anggrek *Cattleya*

yang berumur 7 bulan. Satu perlakuan terdiri dari 5 botol, dan satu botol terdiri dari 4 planlet.

Langkah-langkah penanaman :

- a. Subkultur dilakukan di dalam enkas yang sudah di sterilisasi.
- b. Memasukkan alat-alat penanaman ke dalam enkas diantaranya seperti *scalpel*, pinset, botol kultur, kertas steril, dan bahan *plantlet*.
- c. *Plantlet* yang digunakan adalah *plantlet* yang diperoleh dari hasil kultur *in vitro*, kemudian tutup botol dibuka dan disterilkan menggunakan alkohol.
- d. Mengambil *plantlet* dengan pinset dan diletakkan dalam kertas steril.
- e. *Plantlet* di pilih dengan kriteria yang seragam yaitu memiliki dua daun dan belum memiliki akar.
- f. *Plantlet* ditanam dengan menggunakan pinset steril ke dalam botol. Setiap botol ditanami 4 *plantlet*.
- g. Botol yang telah ditanami kemudian diolesi *chlorox* pada lubang botol lalu ditutup kembali dengan tutup plastik dan disepmrot alkohol, kemudian di selotip dengan *cling wrap* dan diberi label.
- h. Botol kultur disimpan di rak penyimpanan (rak inkubasi) dengan pencahayaan lampu selama 12 jam/ hari pada suhu ruang.

3.5.5 Pemeliharaan

- a. Ruang kultur dipelihara kestabilan pencahayaan dengan lampu *Light Emitting Diode* (LED) 20 watt sebanyak 2 buah selama 12 jam dan kondisi suhunya.
- b. Botol kultur yang terkontaminasi segera dikeluarkan, dan menjaga alat serta ruang kultur tetap steril.

3.6 Variabel pengamatan

3.6.1 Pengamatan penunjang

- a. Suhu dan kelembapan

Pencatatan data suhu dan kelembapan dilakukan setiap hari dengan cara mengamati temperature dan kondisi kelembapan ruang penyimpanan dengan menggunakan alat *thermohygrometer*.

b. Presentase kontaminasi

Pengamatan dilakukan setiap hari dengan cara menghitung lalu mempresentasikan jumlah botol yang mengalami kontaminasi akibat kondisi yang tidak aseptik. Dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ kontaminasi} = \frac{\text{jumlah botol yang kontaminasi tiap perlakuan}}{\text{jumlah perlakuan}} \times 100\%$$

c. Presentase kematian

Pengamatan dilakukan setiap hari dengan cara mengamati setiap botol dan mencatat *plantlet* yang mati dalam setiap botol kultur. Dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah eksplan yang mati}}{\text{jumlah eksplan keseluruhan}} \times 100 \%$$

3.6.2 Pengamatan utama

a. Panjang daun

Panjang daun diukur dari pangkal daun sampai ujung daun *plantlet*. Dengan cara menempelkan penggaris pada dinding luar botol, kemudian mengambil gambar dari jarak dan sudut yang sama untuk kemudian diukur menggunakan aplikasi ImageJ dalam kondisi bibit masih dalam botol. Variabel ini diamati pada 3, 6, 9, 12 minggu setelah subkultur.

b. Lebar daun

Lebar daun diukur dari tepi kiri daun sampai tepi kanan daun terlebar. Dengan cara menempelkan penggaris pada dinding luar botol, kemudian mengambil gambar dari jarak dan sudut yang sama untuk kemudian diukur menggunakan aplikasi ImageJ dalam kondisi bibit masih dalam botol. Variabel ini diamati pada 3, 6, 9, 12 minggu setelah subkultur.

c. Jumlah daun

Jumlah daun yang dihitung adalah daun yang telah membuka sempurna. Variabel ini diamati saat bibit masih dalam botol pada 3, 6, 9, 12 minggu setelah subkultur.

d. Jumlah tunas baru

Tunas baru yang dihitung adalah tunas yang baru pertama muncul sejak planlet ditanam. Variabel ini diamati saat bibit masih dalam botol pada 3, 6, 9, 12 minggu setelah subkultur.

e. Panjang akar

Panjang akar diukur dari pangkal akar terpanjang pada planlet. Dilakukan dengan cara mengeluarkan planlet dari dalam botol kemudian diukur menggunakan penggaris. Variabel ini dilakukan ketika akhir pengamatan.

f. Jumlah akar

Jumlah akar dihitung berdasarkan jumlah akar yang muncul pada planlet, dilakukan dengan cara mengeluarkan planlet dari dalam botol. Variabel ini dilakukan ketika akhir pengamatan.

g. Berat basah

Berat basah total dihitung dengan menimbang seluruh bagian tanaman baik daun, batang, dan akar. Dilakukan dengan cara mengeluarkan planlet dari dalam botol dan menimbanginya. Variabel ini dilakukan pada akhir pengamatan.