

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Wibi Orchid Nursery (Lampiran 4), Kampung Kalibening, Banjarharja, Kalipucang, Pangandaran, Jawa Barat dengan ketinggian tempat 31 mdpl. Kegiatan penelitian dilaksanakan dari bulan Desember 2024 hingga Maret 2025.

3.2 Alat dan bahan penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian yaitu autoklaf, entkas, alat diseksi (pinset, pisau, spatula), rak botol kultur, timbangan analitik, botol kultur, alat memasak (kompor gas, panci, sendok pengaduk), gelas beker, cawan petri, pengaduk kaca, corong, *hand sprayer*, blender, bunsen, pH meter, tissue, plastik wrap, karet gelang, plastik, kertas label, thermohigrometer, alat tulis, dan kamera.

Bahan yang digunakan dalam percobaan yaitu eskplan hasil kultur *in vitro* anggrek *Cattleya* yang diperoleh dari Wibi Orchid Nursery, bahan organik : (air kelapa, dan buah pisang), ubi jalar putih, kentang, arang aktif, pupuk Gaviota 63, alkohol, aquades, gula, dan agar-agar. Bahan untuk mensterilkan alat adalah clorox, alkohol, dan formalin.

3.3 Metode penelitian

Percobaan dilakukan dengan menggunakan metode eksperimental dan rancangan percobaan dengan pendekatan Rancangan Acak Lengkap (RAL) non faktorial, terdiri dari 5 taraf dan diulang 5 kali sehingga terdapat 25 unit percobaan. Faktor perlakuan, yaitu konsentrasi ubi jalar putih yang ditambahkan ke dalam media subkultur standar (g/L). Media subkultur standar yang digunakan terdiri dari pupuk daun Gaviota, agar, gula, arang aktif dan bahan organik (pisang ambon dan air kelapa). Perlakuan yang dicoba yaitu penggantian kentang dengan ubi jalar putih yang ditambahkan kedalam media standar. Adapun taraf perlakuan sebagai berikut:

A = Media standar + Kontrol (Kentang 50 g/L)

B = Media standar + Ubi jalar putih 50 g/L

C = Media standar + Ubi jalar putih 100 g/L

D = Media standar + Ubi jalar putih 150 g/L

E = Media standar + Ubi jalar putih 200 g/L

Berdasarkan rancangan yang digunakan, maka analisis data dilakukan dengan metode kuantitatif.

3.4 Analisis data

Model linier untuk rancangan acak lengkap menurut Gomez dan Gomez (2010) adalah sebagai berikut:

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

Keterangan :

Y_{ij} : Nilai pengamatan pada perlakuan ke-i dalam ulangan ke-j

μ : Nilai tengah umum

τ_i : Pengaruh perlakuan ke-i

ϵ_{ij} : Galat percobaan perlakuan ke-i ulangan ke-j

Berdasarkan metode linear, data kuantitatif dianalisis dengan menggunakan analisis ragam/anova Tabel 1.

Tabel 2 Tabel Sidik Ragam

SK	db	JK	KT	FHit	Ftabel 5%
Perlakuan	4	$(\sum y_{ij})^2 / r - FK$	JKP/dbp	KTP/KTG	2,87
Galat	20	JKT-JKP	JKG/dbg		
Total	24	$\sum (y_{ij})^2 - FK$			

Sumber: (Gomez & Gomez, 2010)

Pengaruh yang diberikan ubi jalar putih terhadap subkultur plantlet anggrek diketahui dengan menggunakan uji F. Berikut kaidah pengambilan keputusan disajikan dalam tabel. Kesimpulan hasil analisis uji F sebagaimana pada tabel 3.

Tabel 3 Kaidah Pengambilan Keputusan

Hasil Analisa	Kesimpulan Analisa	Keterangan
$F_{hit} \leq F_{0,05}$	Berbeda tidak nyata	Tidak ada perbedaan pengaruh antara perlakuan
$F_{hit} > F_{0,05}$	Berbeda nyata	Ada perbedaan pengaruh antara perlakuan

Apabila hasil Uji F berbeda nyata maka akan dilanjutkan dengan uji Jarak Berganda Duncan pada taraf kesalahan 5% dengan rumus sebagai berikut :

$$LSR = SSR (\alpha 0.0. db. p). S_{\bar{x}}$$

Keterangan:

LSR : Least Significant Range

SSR : Significant Studentized Range

$S_{\bar{x}}$: Simpangan baku rata-rata perlakuan

Untuk mencari $S_{\bar{x}}$ dengan rumus sebagai berikut :

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r}}$$

Keterangan :

KTg : Kuadrat tengah galat

r : Banyak ulangan

3.5 Pelaksanaan penelitian

3.5.1 Sterilisasi alat

Sterilisasi alat penanaman (cawan petridish, pinset dan *scalple*) dilakukan dengan mencuci alat-alat tersebut dengan sabun dan air mengalir kemudian dikeringkan. Peralatan yang sudah dikeringkan kemudian disemprot dengan alkohol 70% dan dimasukkan ke dalam plastik tahan panas lalu diikat dengan karet. Peralatan tersebut kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 20 menit.

Sterilisasi botol kultur diawali dengan merendam botol-botol dengan air yang sudah dicampur dengan sabun selama 12 jam, setelah itu dicuci hingga

bersih di air mengalir dan dikeringkan. Botol-botol yang sudah kering disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 20 menit.

3.5.2 Sterilisasi entkas

Sterilisasi entkas dilakukan dengan menyemprotkan alkohol 70% ke seluruh permukaan entkas kemudian dilap hingga bersih. Entkas kemudian ditutup dan disterilkan menggunakan formalin selama 24 jam sebelum penanaman (Faudzy, 2024).

3.5.3 Pembuatan media kultur dan penerapan perlakuan

Media yang dibuat untuk tiap perlakuan adalah 1 liter. Tahapan pembuatan media dasar dan penerapan perlakuan sebagai berikut:

a. Pembuatan media standar subkultur 1 L

Pisang ambon sebanyak 50 g dihaluskan dengan blender hingga menjadi campuran homogen. Campuran yang sudah homogen ditambahkan 0,5 g pupuk Gaviota 63, air kelapa 50 ml, gula pasir 20 g, agar-agar 7 g, dan arang aktif 2 g. Campuran tersebut kemudian ditambahkan dengan akuades hingga volume mencapai 1 L (Wibisono, 2022).

b. Pembuatan media perlakuan untuk 1 Liter.

Media standar yang telah dibuat ditambahkan bahan organik sesuai perlakuan berikut :

- Perlakuan A : media standar + kentang 50 g/L (Kontrol)
- Perlakuan B : media standar + ubi jalar putih 50 g/L,
- Perlakuan C : media standar + ubi jalar putih 100 g/L,
- Perlakuan D : media standar + ubi jalar putih 150 g/L,
- Perlakuan E : media standar + ubi jalar putih 200 g/L.

Bahan organik (kentang dan ubi jalar putih) dihaluskan dengan blender, kemudian dicampurkan ke dalam media standar hingga homogen.

c. Larutan media yang telah tercampur dengan sempurna, diukur tingkat keasaman larutannya dengan menggunakan pH meter. Keasaman larutan media yang diinginkan adalah 5,5-5,8. Apabila media terlalu asam maka dapat ditambahkan KOH, sedangkan jika media terlalu basa dapat ditetesi dengan HCl.

- d. Setiap media tersebut dipanaskan hingga mencapai suhu 80°C dan dimasukkan ke dalam 20 botol kultur. Masing-masing botol kultur diisi media sebanyak 30 ml.
- e. Botol yang sudah berisi media kemudian ditutup dengan tutup botol karet dan dilapisi plastik wrap.
- f. Botol media kemudian disterilisasi menggunakan autoclave dengan suhu 121°C selama 20 menit setelah katup berbunyi.
- g. Botol media kemudian di simpan di ruang inkubasi.

3.5.4 Penanaman eksplan

Bahan plantlet yang digunakan merupakan hasil kultur *in vitro* berumur 10 bulan dari sejak tebar biji yang didapat dari Laboratorium Wibi *Orchid Nusery*. Terdapat 5 perlakuan, tiap perlakuan terdiri dari 3 botol dan diulang sebanyak 5 kali, sehingga terdapat 75 botol kultur. Adapun tahapan penanaman sebagai berikut :

- a. Alat-alat penanaman (scalpel, pinset), botol kultur, cawan petri, tisu steril, alkohol dan bahan eksplan plantlet dimasukan ke dalam entkas.
- b. Tutup botol yang berisi bahan kultur di buka, selanjutnya plantlet diambil dengan pinset dan diletakkan dalam cawan petri.
- c. Plantlet yang ditanam di pilih dengan kriteria yang seragam yaitu berukuran sama, memiliki dua daun, dan belum memiliki akar.
- d. Tunas-tunas yang sudah dipisahkan dari plantletnya kemudian ditanam dengan menggunakan pinset steril ke dalam botol.
- e. Lubang botol media yang telah ditanam tunas selanjutnya diolesi chlorox lalu ditutup dengan tutup karet dan disemprot alkohol, kemudian dilapisi dengan plastik wrap dan diberi label.
- f. Botol kultur disimpan di rak penyimpanan (rak inkubasi).

3.5.5 Pemeliharaan ruang kultur

Pemeliharaan ruang kultur dilakukan dengan menjaga kestabilan pencahayaan lampu Light Emitting Diode (LED) 20 watt sebanyak 2 buah selama 12 jam, melakukan pengecekan suhu ruang dan kelembapan udara, mengeluarkan botol kultur yang terkontaminasi, serta menjaga alat serta ruang kultur tetap steril.

3.6 Variabel pengamatan

3.6.1 Pengamatan penunjang

Pengamatan penunjang adalah pengamatan yang dilakukan terhadap parameter yang datanya tidak diuji secara statistik untuk mengetahui kemungkinan pengaruh lain dari luar perlakuan. Parameter-parameter tersebut sebagai berikut :

1) Suhu dan kelembapan

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

2) Persentase kontaminasi (%)

Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati dan menghitung jumlah botol yang terkontaminasi oleh mikroorganisme (jamur dan bakteri) pada setiap perlakuan. Kontaminasi pada botol diamati setiap minggu dan dihitung persentasenya setelah selesai pengamatan. Persentase kontaminasi dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kontaminasi (\%)} = \frac{\text{Jumlah botol terkontaminasi}}{\text{Jumlah Seluruh Botol Perlakuan}} \times 100\%$$

3) Persentase kematian (%)

Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati dan menghitung jumlah plantlet yang mati dalam setiap botol kultur. Pengamatan dilakukan setiap hari dan dihitung persentasenya setelah selesai pengamatan. Persentase kematian dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kematian (\%)} = \frac{\text{Jumlah plantlet yang mati dalam botol}}{\text{Jumlah Seluruh Plantlet Setiap Perlakuan}} \times 100\%$$

3.6.2 Pengamatan utama

Pengamatan utama adalah pengamatan yang datanya diuji secara statistik. Pengamatan utama dilakukan pada kedua plantlet dalam satu botol. Data yang di uji merupakan hasil rata-rata kedua plantlet pada tiap parameter yang diamati. Pengamatan utama dilakukan terhadap parameter-parameter sebagai berikut :

1) Jumlah daun (helai)

Jumlah daun diamati dengan cara menghitung daun yang sudah membuka sempurna dalam botol kultur pada setiap tanaman yang hidup. Variabel ini diamati pada 3, 6, 9, 12 minggu setelah subkultur (MSS).

2) Panjang daun (mm)

Pengukuran panjang daun dilakukan dari pangkal daun hingga ujung daun plantlet. Variabel panjang daun diamati pada 12 minggu setelah subkultur (MSS).

3) Lebar daun (mm)

Lebar daun diukur dari tepi kiri daun sampai tepi kanan daun terlebar menggunakan penggaris. Variabel ini diamati pada 12 minggu setelah subkultur (MSS).

4) Jumlah tunas baru (buah)

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



Gambar 5. Tunas Plantlet Anggrek Cattleya
(Sumber : Harahap dkk., 2024)

5) Jumlah akar

Jumlah akar dihitung pada setiap plantlet yang hidup yang dilakukan dengan cara mengeluarkan plantlet dari dalam botol. Variabel ini dilakukan ketika akhir pengamatan (12 MSS). Bentuk akar plantlet anggrek *Cattleya* yang ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Akar plantlet anggrek Cattleya

Sumber : (Faudzy, 2024)

6) Panjang akar (cm)

Panjang akar diukur dari pangkal hingga ujung akar terpanjang pada plantlet. Dilakukan dengan cara mengeluarkan plantlet dari dalam botol kemudian diukur menggunakan penggaris. Variabel ini dilakukan ketika akhir pengamatan (12 MSS).

7) Bobot basah

Bobot basah total dihitung dengan menimbang seluruh bagian tanaman (daun, akar, batang). Dilakukan dengan cara mengeluarkan plantlet dari dalam botol dan menimbangnya. Variabel ini dilakukan pada akhir pengamatan (12 MSS).