

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Lampung dari bulan Februari hingga Mei 2015.

3.2 Bahan dan Alat

3.2.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas bahan tanaman dan bahan untuk media kultur.

3.2.1.1 Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah *seedling* anggrek *Cattleya* hibrida yang berumur 3 BST (bulan setelah tanam) yang berukuran 0,7–1 cm. *Seedling* anggrek ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. *Seedling* anggrek *Cattleya* sebagai bahan tanam

3.2.1.2 Bahan Media Kultur

Bahan media kultur yang digunakan terdiri atas pupuk lengkap (32:10:10) berupa Growmore dan addenda organik. Addenda organik yang digunakan adalah ekstrak tomat, ekstrak wortel, ekstrak nanas, dan pisang ambon. Komposisi media perlakuan ditunjukkan pada Tabel 6.

Tabel 6. Komposisi media perlakuan.

No	Komponen Media	Konsentrasi
1	Growmore	2 atau 3 g/l
2	Vitamin MS	10 ml/l
3	Air Kelapa	100 ml/l
4	Sukrosa	20 g
5	Bahan Addenda Organik	nanas 200 g/l, tomat 200 g/l, wortel 200 g/l, atau pisang ambon 100 g/l
6	Agar-agar	7 g/l

3.2.1.3 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah *laminar air flow cabinet* (LAFC), *magnetic stirrer*, pH meter, timbangan, labu erlenmeyer, botol kultur, *petridish*, keramik, gelas ukur, alat-alat diseksi seperti pinset, spatula, skalpel, dan *blade*.

3.3 Metode Penelitian

Perlakuan disusun secara faktorial 2x4. Faktor pertama adalah konsentrasi pupuk lengkap Growmore (32:10:10) sebagai media dasar yaitu 2 g/l dan 3 g/l. Faktor kedua adalah pemberian berbagai jenis addenda organik yaitu nanas 200 g/l, tomat 200 g/l, wortel 200 g/l, dan pisang ambon 100 g/l. Dari kedua faktor tersebut membentuk kombinasi perlakuan yang ditunjukkan pada Tabel 7.

Tabel 7. Kombinasi perlakuan.

No	Kombinasi perlakuan
1	Growmore 2 g/l + nanas 200 g/l
2	Growmore 2 g/l + tomat 200 g/l
3	Growmore 2 g/l + pisang ambon 100 g/l
4	Growmore 2 g/l + wortel 200 g/l
5	Growmore 3 g/l + nanas 200 g/l
6	Growmore 3 g/l + tomat 200 g/l
7	Growmore 3 g/l + pisang ambon 100 g/l
8	Growmore 3 g/l + wortel 200 g/l

Percobaan ini dilakukan dalam rancangan teracak sempurna (RTS). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 5 kali. Setiap ulangan terdiri atas 1 botol, yang berisi 10 *seedling*.

Homogenitas data diuji dengan uji Bartlett. Apabila asumsi terpenuhi, dilakukan analisis ragam. Pemisahan nilai tengah dilakukan dengan menggunakan uji beda nyata terkecil (BNT) pada taraf nyata 5%.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat merupakan langkah pertama yang harus dilakukan. Botol sebagai media kultur harus berada dalam kondisi aseptik. Botol disterilisasi menggunakan autoklaf Budenberg pada suhu 121⁰C dan tekanan 1,2 atm selama 30 menit.

Setelah diautoklaf, bagian dalam botol dicuci untuk menghilangkan sisa media dan direndam dalam air yang diberi detergen dan desinfektan selama \pm 12 jam.

Botol yang telah direndam, dicuci kembali bagian dalam dan luar botol. Setelah itu, botol dibilas dengan air mengalir dan direndam dalam air panas selama 15 menit. Setelah direndam air panas, botol ditiriskan, ditutup dengan plastik, dan diikat dengan karet.

Alat-alat untuk keperluan tahap subkultur seperti *petridish*, keramik, alat diseksi berupa pinset, spatula, dan skalpel juga harus disterilisasi, alat-alat tersebut dibungkus kertas lalu dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dan diikat dengan karet. Semua alat-alat tersebut disterilisasi dengan autoklaf Tomy dengan suhu 121⁰C dan tekanan 1,2 atm selama 30 menit.

3.4.2 Pembuatan Media

Pembuatan media terdiri atas dua tahap, yaitu pembuatan media dasar dan pembuatan addenda organik. Pembuatan addenda organik meliputi pembuatan ekstrak addenda (nanas, tomat, dan wortel) dan pembuatan bubur pisang ambon.

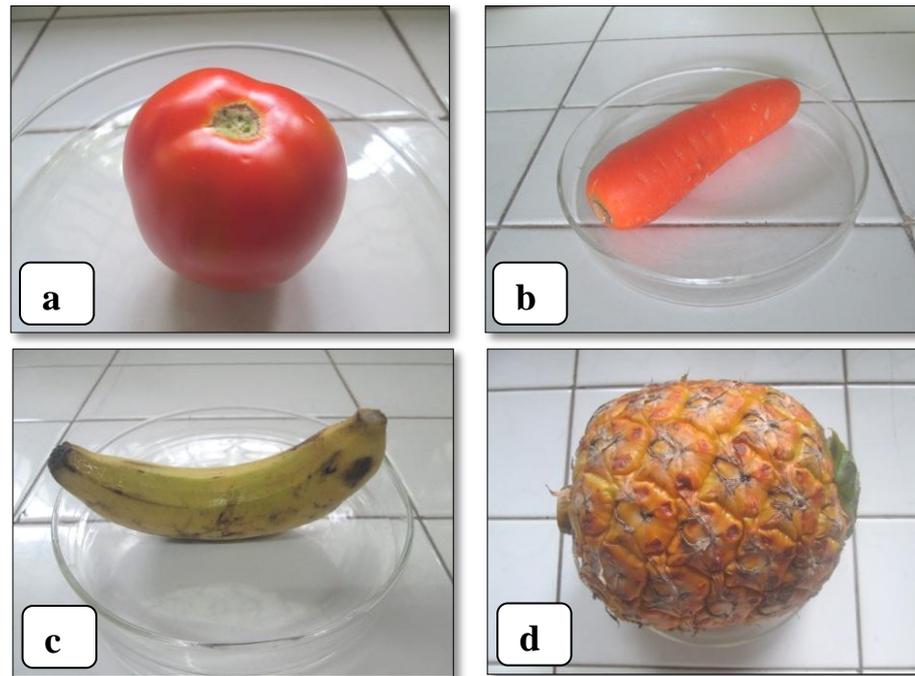
3.4.2.1 Pembuatan Media Dasar

Media dasar memiliki komposisi yaitu pupuk lengkap Growmore (32:10:10), air kelapa 100 ml/l, vitamin MS 10 ml/l, dan sukrosa 20 g/l. Sebelum membuat media dasar, semua alat gelas dan non gelas yang akan digunakan dibilas dengan aquades. Pembuatan media dilakukan dengan melarutkan Growmore (32:10:10) sesuai dengan perlakuan (2 g/l atau 3 g/l), air kelapa 150 ml/l, vitamin MS 10 ml/l, dan sukrosa 20 g/l dalam aquades. Semua bahan-bahan tersebut dilarutkan sampai homogen dengan menggunakan *magnetic stirrer*.

3.4.2.2 Pembuatan Addenda Organik

a) Pembuatan Ekstrak Addenda Organik

Addenda organik yang diekstrak adalah nanas, tomat, dan wortel. Nanas yang digunakan adalah nanas yang sudah matang berwarna kuning cerah. Tomat yang digunakan adalah tomat dengan warna buah yang secara keseluruhan berwarna merah, tidak ada warna hijau dan tidak terlalu keras. Wortel yang digunakan adalah wortel segar yang tidak terlalu tua. Addenda organik yang digunakan ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Bahan-bahan yang digunakan sebagai addenda organik; (a) tomat, (b) wortel, (c) pisang ambon, (d) nanas

Semua addenda organik dicuci dengan air mengalir dan aquades hingga bersih, serta dibilas dengan disinfektan. Sebelum diekstrak, semua addenda organik diukur $^{\circ}\text{Brix}$ -nya dengan menggunakan *hand refraktometer*. Pengukuran $^{\circ}\text{Brix}$ digunakan untuk mengetahui persen (%) padatan terlarut dalam suatu jus buah. $^{\circ}\text{Brix}$ nanas, tomat, dan wortel secara berurutan yaitu 2%; 4%, dan 5%. Pada penelitian sebelumnya, Septiana (2012) menggunakan tomat dengan $^{\circ}\text{Brix}$ 2%.

Buah nanas, tomat, dan wortel yang digunakan sebanyak 200 g/l. Buah dikupas, ditimbang, dan dihaluskan dengan menggunakan *blender*. Untuk buah tomat tidak dilakukan pengupasan. Setelah halus, bahan diberi aquades kemudian disaring dengan kapas hingga diperoleh ekstrak.

Masing-masing ekstrak addenda dicampurkan pada larutan media dasar. Setelah itu, larutan kembali dihomogenkan dengan menggunakan *magnetic stirrer*.

Larutan yang telah homogen dimasukkan ke dalam labu ukur dengan menambahkan aquades hingga tera. Larutan kembali dihomogenkan. Setelah homogen, larutan diukur keasamannya (pH) dan ditetapkan menjadi 5,8 dengan menggunakan pH meter. Jika larutan memiliki pH kurang dari 5,8 ditambahkan beberapa tetes KOH, sedangkan jika lebih dari 5,8 ditambahkan HCl.

b) Pembuatan Bubur Pisang

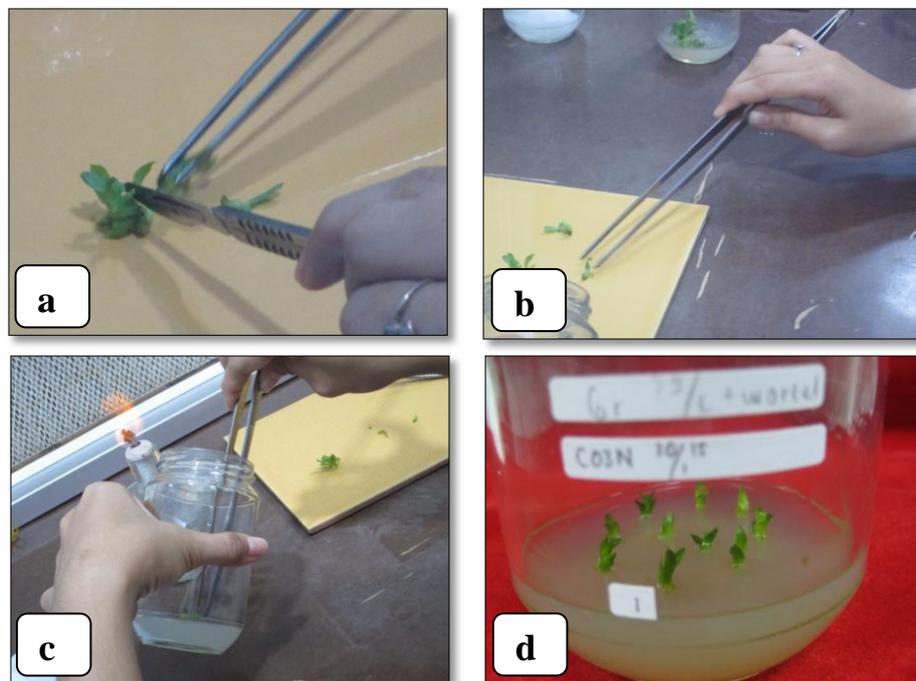
Jenis pisang yang digunakan adalah pisang ambon yang sudah matang. ⁰Brix pisang ambon yang digunakan dalam penelitian ini sebesar 22%, nilai ini hampir sama dengan ⁰Brix pisang ambon yang digunakan pada penelitian Septiana (2012) yaitu sebesar 21%. Pisang ambon yang digunakan sebanyak 100 g/l. Pisang tidak dihaluskan menggunakan *blender*, melainkan dihancurkan dengan menggunakan spatula diatas *petridish*. Berbeda dengan ekstrak addenda, pencampuran bubur pisang ke media dasar dilakukan sesudah larutan ditera dan diukur keasamannya (pH).

Selanjutnya, masing-masing larutan media yang telah dicampur sesuai dengan perlakuan dimasukkan ke dalam panci dan diberi bahan pematat berupa bubuk agar sebanyak 7 g/l. Larutan media dimasak dan diaduk hingga mendidih.

Larutan media sebanyak 30–35 ml dituang ke dalam botol kultur steril, ditutup plastik dan diikat dengan karet. Setelah itu, botol-botol kultur yang telah terisi media disterilisasi dengan autoklaf Tomy dengan suhu 121⁰C dan tekanan 1,2 atm selama 7 menit.

3.4.3 Subkultur

Subkultur adalah pemindahan kultur dari media lama ke media yang baru untuk memperoleh pertumbuhan baru yang diinginkan. *Seedling* anggrek *Cattleya* yang berasal dari botol kultur sebelumnya, disubkulturkan ke media perlakuan. Setiap botol berisi 10 *seedling* berukuran 0,7–1 cm. Pemindahan dilakukan secara hati-hati dan dalam kondisi aseptik di dalam *laminar air-flow cabinet* (LAFC). Tahap-tahap subkultur ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Tahap-tahap subkultur, (a) pemisahan *seedling* anggrek *Cattleya* dari kultur sebelumnya, (b) pengambilan *seedling*, (c) penanaman *seedling* ke media, (d) botol yang telah berisi 10 *seedling*

3.4.4 Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada awal subkultur dan satu bulan sekali hingga berumur 3 bulan setelah *seedling* ditransfer ke media perlakuan (4 MST, 8 MST, dan 12 MST). Variabel pengamatan meliputi:

1. Jumlah tunas *seedling*

Tunas baru yang muncul dihitung per *seedling*.

2. Jumlah akar *seedling*

Jumlah akar dihitung per *seedling*.

3. Panjang akar *seedling*

Masing-masing akar diukur dari pangkal hingga ujung akar dan dirata-rata dalam satuan sentimeter (cm).

4. Tinggi *seedling*

Tinggi tanaman diukur dari pangkal *seedling* hingga ujung daun terpanjang.

5. Bobot basah

Penimbangan bobot basah *seedling* dilakukan pada awal penanaman *seedling* ke media perlakuan dan setelah 3 bulan atau 12 MST. Kesepuluh *seedling* pada setiap botol ditimbang dan dirata-rata untuk mengetahui bobot basah per *seedling*.

6. Persentase albino

Persentase albino diamati setelah *seedling* anggrek berumur 12 MST.