

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia sebagai negara megabiodiversitas menempati peringkat kedua di dunia dalam hal kekayaan keanekaragaman hayati, setelah Brasil. Status ini terutama disebabkan oleh iklim tropis dan letaknya di garis khatulistiwa (Lubis, 2021). Menurut Mittermeier et al., (1999), kriteria klasifikasi sebagai negara megabiodiversitas meliputi keberadaan setidaknya 5.000 spesies tanaman endemik dan ekosistem maritim di dalam wilayahnya. Indonesia juga terkenal karena keberagaman plasma nutfah anggreknya. Di antara semua itu, anggrek hitam (*Coelogyne pandurata* Lindl), yang endemik di Kalimantan, dianggap sebagai simbol Indonesia (Britto et al., 2021). *Coelogyne pandurata* pertama kali dideskripsikan pada tahun 1853 oleh John Lindley, dan ilustrasinya yang khas telah dimuat dalam beberapa publikasi anggrek terkemuka, termasuk "*Curtis's Botanical Magazine*" karya Hooker pada tahun 1858.

Anggrek hitam memiliki ciri khas berupa bunga besar berwarna hijau dengan lidah berwarna hitam, yang merupakan sifat langka dari spesies ini. Sebagai spesies anggrek endemik Kalimantan, anggrek hitam menampilkan karakteristik unik dan langka. Bunga anggrek ini dicirikan oleh kelopak dan mahkota berwarna hijau cerah dengan ukuran besar, serta labellum atau lidah bunga berwarna hitam pekat yang menjadi ciri khas dan daya tarik utamanya (Hartati, Budiyo dan Cahyono, 2017). Keunikan dan kelangkaan anggrek hitam ini, sayangnya, telah menjadikannya target eksploitasi berlebihan, yang dikombinasikan dengan kerusakan habitat alamnya, mengakibatkan penurunan populasi yang signifikan di alam liar (Kartiman et al., 2018). Fenomena ini menimbulkan kekhawatiran serius terhadap kelangsungan hidup spesies tersebut dan meningkatkan urgensi upaya konservasi dan perbanyakan yang efektif.

Metode perbanyakan konvensional anggrek hitam memiliki sejumlah keterbatasan, sehingga memerlukan waktu lama dan kurang efisien dalam menjaga integritas genetik dan menghasilkan tanaman dalam jumlah besar. Menghadapi tantangan ini, para peneliti dan praktisi hortikultura beralih ke teknik kultur *in vitro* sebagai solusi yang menjanjikan. Teknik ini menawarkan pendekatan efektif dalam perbanyakan anggrek hitam, memungkinkan produksi tanaman skala besar dengan waktu singkat, sambil mempertahankan kualitas genetik tanaman induk (Apriliyana dan Wahidah, 2021). Teknik kultur *in vitro* juga membuka peluang manipulasi genetik dan seleksi sifat yang diinginkan, yang dapat berkontribusi pada pelestarian dan pengembangan varietas unggul anggrek hitam.

Banyak peneliti telah melaporkan kendala dalam perbanyakan anggrek secara konvensional, seperti laju pertumbuhan lambat, kontaminasi, dan rendahnya efisiensi dalam menghasilkan tanaman berkualitas. Oleh karena itu, diperlukan alternatif seperti penggunaan *Temporary Immersion System* (TIS). Penelitian Murthy et al.

(2023) melaporkan bahwa TIS dapat meningkatkan efisiensi perbanyakan tanaman dari segi jumlah dan kualitas. TIS bekerja dengan perendaman sementara yang memberi kesempatan akar memperoleh oksigen lebih baik, serta mengurangi risiko kerusakan akibat kekurangan oksigen pada metode kultur jaringan tradisional (Nongdam et al., 2023). Keunggulan ini meningkatkan keberhasilan perbanyakan dan berpotensi mempercepat pertumbuhan serta vigor tanaman. TIS menawarkan prospek menjanjikan untuk revolusi teknik perbanyakan anggrek, membuka peluang bagi industri hortikultura dan konservasi spesies langka.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Hallaç, Mendi dan Yag, (2024) mengenai aplikasi TIS pada tanaman *Phalaenopsis*, yang membandingkan metode kultur semi-padat dan bioreaktor TIS dengan sistem perendaman sementara dalam perbanyakan anggrek, ditemukan bahwa TIS memiliki keunggulan dalam hal tingkat anakan, pertumbuhan, dan kualitas tanaman. Keunggulan pada tingkat anakan ditunjukkan oleh peningkatan jumlah tunas yang terbentuk per eksplan, yang berkaitan dengan ketersediaan nutrisi dan aerasi yang lebih optimal selama siklus perendaman dan pengeringan pada sistem TIS. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa TIS efektif untuk perbanyakan berbagai jenis anggrek. Sebagai contoh, penelitian yang dilakukan oleh Rahayu et al., (2024) menunjukkan bahwa TIS dapat meningkatkan jumlah tunas dan akar anggrek hitam secara signifikan dibandingkan dengan kultur in vitro konvensional.

Review terbaru tentang TIS menegaskan bahwa selain keunggulan dalam peningkatan multiplikasi dan kualitas planlet, TIS tetap menghadapi tantangan kontaminasi yang berkaitan dengan desain bioreaktor, frekuensi imersi, volume media, serta kesulitan sterilisasi sistem pada skala besar, sehingga optimalisasi parameter teknis dan penggunaan senyawa antimikroba modern (misalnya PPM, antibiotik, dan nanopartikel) menjadi kunci keberhasilan implementasi TIS dalam bioteknologi tanaman (Georgiev et al, 2014). Kontaminasi mikroba merupakan salah satu kendala utama pada kultur jaringan tanaman menggunakan (TIS) karena dapat menyebabkan kehilangan kultur secara massal dan menurunkan efisiensi mikropropagasi. Dalam sistem bioreaktor imersi sementara untuk kentang, berbagai bakteri (seperti *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Corynebacterium*, *Proteus*, *Bacillus*) dan jamur (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Rhizopus*) teridentifikasi sebagai kontaminan yang dapat menyerang pada berbagai tahap pertumbuhan tunas, sehingga protokol pengendalian yang spesifik sangat diperlukan (Rahman et al., 2017).

Sistem bioreaktor perendaman sementara telah terbukti efisien dalam mikropropagasi tanaman anggrek, dengan peningkatan kinerja dan inovasi baru. Beberapa peneliti juga telah menunjukkan adanya hubungan positif antara durasi perendaman dan periode cahaya. Penelitian yang dilakukan oleh Leyva-Ovalle et al. (2020) menyimpulkan bahwa perlakuan frekuensi pemaparan cairan nutrisi menggunakan bioreaktor TIS pada anggrek *Guarianthe skinneri* selama 2 menit setiap 4 jam menghasilkan produksi tunas tertinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Penelitian Kaladharan et al. (2024) melaporkan bahwa periode cahaya 16 jam terang

dan 8 jam gelap memberikan hasil pertambahan tunas terbaik pada *Coelogyne mossiase*. Temuan-temuan ini menunjukkan bahwa keberhasilan mikropropagasi sangat dipengaruhi juga oleh pengaturan kondisi lingkungan dan sistem yang digunakan. Oleh karena itu, integrasi teknologi inovatif menjadi kunci dalam mengoptimalkan proses perbanyakan tanaman secara *in vitro*.

Teknologi inovatif dalam sektor pertanian telah mengalami perkembangan pesat, terutama dalam hal automasi dan pemanfaatan *internet of things* (IoT). Sistem otomatisasi seperti kontrol iklim rumah kaca, irigasi, dan fertigasi telah terbukti meningkatkan produktivitas pertanian secara signifikan. Integrasi IoT dalam praktik pertanian telah membawa perubahan besar, memungkinkan pemantauan dan pengendalian variabel iklim mikro secara presisi dalam kultur jaringan tanaman, termasuk suhu, cahaya, dan kelembapan (Dalina dan Sobejana, 2019).

Penerapan teknologi TIS yang terintegrasi dengan IoT membuka peluang baru dalam upaya konservasi dan perbanyakan tanaman langka seperti anggrek hitam. Sistem ini memungkinkan optimalisasi kondisi pertumbuhan secara *in vitro*, yang diharapkan dapat meningkatkan keberhasilan perbanyakan anggrek hitam. Memanfaatkan teknologi ini, para peneliti dan praktisi pertanian dapat menciptakan lingkungan yang lebih terkontrol dan efisien untuk mendukung upaya pemulihan populasi anggrek hitam di alam. Integrasi teknologi TIS dan IoT tidak hanya berpotensi meningkatkan hasil perbanyakan, tetapi juga dapat mempercepat proses konservasi dan restorasi populasi anggrek hitam di habitat alaminya.

Meskipun Temporary Immersion System (TIS) telah terbukti efektif dalam perbanyakan anggrek hitam, terdapat sejumlah permasalahan yang memerlukan penelitian lebih lanjut. Sebagai contoh, kondisi optimal TIS untuk perbanyakan anggrek hitam, seperti frekuensi dan durasi perendaman serta lama penyinaran, belum banyak dilaporkan. Selain itu, penelitian yang mengevaluasi pengaruh TIS terhadap kualitas planlet anggrek hitam yang dihasilkan masih terbatas, dan belum banyak penelitian yang mengintegrasikan teknologi otomatisasi berbasis *Internet of Things* (IoT) dalam mengontrol kondisi ruang kultur perbanyakan anggrek hitam.

Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini dapat menjadi sangat penting bagi konservasi dan pemanfaatan komersial *C. pandurata*, sejenis anggrek yang terancam akibat eksploitasi berlebihan di alam, dengan mempertimbangkan pengaruh interval perendaman dan lama penyinaran.

1.2 Landasan Pemikiran & Kerangka Riset

1.2.1 Anggrek hitam (*Coelogyne pandurata*)

Anggrek hitam merupakan spesies anggrek endemik yang ditemukan di Kalimantan Timur dan Papua, Indonesia (Rahayu et al., 2023). Keunikan bunga serta nilai estetikanya yang tinggi menjadikan anggrek ini sangat diminati. Anggrek hitam memiliki pebungaan yang muncul dari pertumbuhan muda sebelum *pseudobulb* terbentuk, dengan bunga yang mekar dari pangkal ke atas dan berwarna hijau besar. Nama spesies "pandurata" berarti biola atau berbentuk biola, merujuk pada bentuk bibir berwarna hitam. Spesies ini menunjukkan variasi dalam ukuran tanaman dan

bunga, bergantung pada kondisi pertumbuhannya, dan dapat ditemukan sebagai epifit, litofit, serta tanaman terestrial (A'yunin, 2020). Namun, eksploitasi berlebihan dan konversi lahan telah menyebabkan penurunan populasi anggrek hitam di habitat aslinya, menjadikannya rentan terhadap kepunahan dan sulit diperbanyak secara alami (Kartiman et al., 2018).

Anggrek Hitam adalah tanaman hias yang sangat populer dan bernilai tinggi. Warna hitamnya yang langka menarik banyak orang (Hartati et al., 2017). Namun, tanaman ini terancam punah karena habitatnya berkurang dan sulit diperbanyak secara alami. Penelitian oleh Zakiah et al. (2023) membantu melestarikan *Coelogyne pandurata* dengan meningkatkan keberhasilan aklimatisasi melalui media tanam dan biostimulan yang lebih baik. Ini mendukung produksi massal dan pengembalian ke habitat aslinya. Kajian oleh Coelho et al. (2020) menyatakan bahwa tanaman endemik sangat rentan terhadap ancaman dari aktivitas manusia dan perubahan alam. Oleh karena itu, diperlukan konservasi *ex situ* dengan bantuan bioteknologi. Bioteknologi, seperti kultur jaringan dan kriopreservasi, menawarkan cara untuk melestarikan keanekaragaman genetik tanaman langka. Jadi, konservasi anggrek hitam sangat penting, dan perbanyakan *in vitro* adalah salah satu cara untuk melestarikannya.

Perbanyakan anggrek hitam secara *in vitro* dapat dilakukan melalui kultur biji. Namun, biji anggrek memiliki karakteristik khusus, seperti tidak adanya endosperm sebagai cadangan makanan, sehingga memerlukan media kultur yang tepat untuk mendukung perkecambahan. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penambahan bahan organik dapat meningkatkan pertumbuhan anggrek dalam kultur *in vitro*. Misalnya, penelitian oleh Stewart et al. (2008) membahas teknik perkecambahan biji anggrek *in vitro*, baik secara simbiotik dengan jamur mikoriza maupun asimbiotik menggunakan media nutrisi steril, yang telah meningkatkan keberhasilan propagasi dibandingkan perkecambahan alami, dan pendekatan ini juga dapat diterapkan dalam konservasi anggrek hitam untuk mempercepat perbanyakan dan menjaga kelangsungan populasinya (Nongdam et al., 2023).

1.2.2 Kultur *in-vitro*

Kultur *in vitro* merupakan salah satu teknik dalam perbanyakan tanaman yang memanfaatkan sifat totipotensi sel tanaman dalam kondisi aseptik. Teori Sel Schleiden (1838) dan Schwann (1839), telah mengemukakan teori totipotensi, yang menyatakan bahwa sel bersifat otonom dan, pada prinsipnya, mampu beregenerasi untuk menghasilkan tanaman yang lengkap, serta mengakui sel sebagai unit utama bagian dasar dari semua organisme hidup (Vasil, 2008). Teori tersebut merupakan dasar dari kultur sel. Kultur secara *in vitro* terbagi dalam beberapa jenis, di antaranya kultur embrio, kultur kalus, kultur organ, kultur suspensi sel, kultur anter, dan kultur protoplasma. Saat ini, industri telah menerapkan pendekatan perbanyakan secara *in vitro* dalam perbanyakan tanaman varietas unggul dan perbanyakan klon bebas penyakit dalam skala besar (Kumar dan Reddy, 2011).

Kultur *in vitro* dimanfaatkan untuk memperbanyak tanaman yang cepat, konservasi plasma nutfah, eliminasi patogen atau virus, dan untuk produksi metabolit sekunder (Kumar dan Reddy, 2011). Kultur *in vitro* juga digunakan dalam menghasilkan tanaman identik dengan induknya. Upaya memperbanyak dengan kultur *in vitro* juga tidak memerlukan terlalu banyak ruang dan bahan tanaman. Perbanyakkan secara mikro melalui kultur *in vitro*, seperti embriogenesis somatik (ES), menjadi alternatif dalam mendapatkan bahan tanam klon yang identik dengan induknya. Oleh karena itu, memperbanyak tanaman secara *in vitro* menjadi solusi untuk memperbanyak tanaman yang sulit berkembang biak secara konvensional. Keberhasilan kultur *in vitro* dapat dipengaruhi oleh genotip tanaman, lingkungan tumbuh, kondisi eksplan, dan media (Ramlan, 2023).

Dalam kultur *in vitro*, media pertumbuhan memiliki pengaruh signifikan terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan serta bibit yang dihasilkan. Media dasar yang umum digunakan untuk memperbanyak tanaman secara *in vitro* adalah Murashige and Skoog (MS), yang pertama kali diperkenalkan oleh Murashige dan Skoog pada tahun 1962 (Hapsoro et al. 2019). Media MS sangat diperlukan pada tahap multiplikasi untuk menghasilkan planlet dalam jumlah besar. Media MS mengandung berbagai nutrisi penting seperti makro dan mikroelemen, vitamin, serta sumber karbon yang mendukung pertumbuhan jaringan tanaman. Komposisi media ini dapat dimodifikasi sesuai dengan kebutuhan spesifik jenis tanaman dan tujuan kultur jaringan.

1.2.3 *Temporary immersion system (TIS)*

Perbanyakkan tanaman secara *in vitro* telah menjadi metode yang banyak diterapkan untuk meningkatkan kualitas dan kuantitas tanaman, khususnya pada tanaman yang sulit diperbanyak secara konvensional (Safitri, 2021). Salah satu teknik yang telah banyak diterapkan dalam memperbanyak tanaman adalah kultur jaringan dengan sistem imersi, salah satunya TIS. TIS merupakan sistem yang menggabungkan teknik kultur jaringan dengan prinsip imersi sementara yang memungkinkan pertukaran oksigen dan nutrisi secara optimal untuk mendukung pertumbuhan tanaman. Sistem TIS memfasilitasi renovasi udara secara periodik untuk mencegah akumulasi gas etilen yaitu hormon gas yang pada konsentrasi tinggi dapat menghambat pemanjangan tunas dan mempercepat penuaan jaringan. Melalui ketersediaan CO₂ yang stabil selama fase aerasi, tanaman didorong untuk beralih menjadi fotoautotrof, yaitu kondisi di mana planlet mampu memproduksi energi mandiri melalui fotosintesis, sehingga mengurangi ketergantungan pada sukrosa eksogen dan meningkatkan sintasan selama aklimatisasi (Méndez-Hernández, 2024).

Harris dan Mason (1983), pertama kali mendeskripsikan mesin miring yang dirancang untuk mencapai perendaman sementara, untuk menggabungkan aerasi dan efek positif dari kultur media cair (Etienne dan Berthouly, 2002). Mereka mendesain sebuah alat yang dikenal sebagai '*auxophyton*', yang memutar wadah kultur pada roda, memaparkan eksplan secara bergantian ke udara, atau

merendamnya dalam cairan. TIS juga sebagai metode perendaman jaringan tanaman secara berkala dalam media nutrisi, dan kemudian mengeringkan larutan nutrisi (Hartati et al., 2017). Dengan menggunakan TIS, tanaman dapat memperoleh kondisi pertumbuhan yang lebih baik, di mana akar tanaman tidak terendam terus-menerus dalam medium nutrisi, tetapi hanya terendam dalam interval waktu tertentu. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa TIS dapat meningkatkan produksi biomassa dan kualitas tanaman pada berbagai spesies tanaman, seperti anggrek Vanda (Tran, 2022) dan Anggrek reofit, yang menunjukkan potensi besar untuk digunakan pada perbanyakan anggrek hitam (*Coelogyne pandurata*).

Inovasi teknologi seperti juga telah diterapkan untuk meningkatkan efisiensi perbanyakan anggrek secara in vitro. Rahayu (2024) melaporkan bahwa aplikasi TIS yang terintegrasi dengan sensor automasi dapat meningkatkan pertumbuhan dan kualitas planlet anggrek hitam. Penggunaan TIS memungkinkan tanaman menerima nutrisi dalam jumlah optimal melalui sistem imersi sementara, yang dapat meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Media cair sangat ideal dalam mikropopagasi untuk mengurangi biaya produksi plantlet dan untuk otomatisasi (Etienne dan Berthouly, 2002). Sistem kultur cair dapat memberikan kondisi kultur jauh lebih seragam, media dapat dengan mudah diperbaharui tanpa mengganti wadah, sterilisasi dapat dilakukan dengan mikrofiltrasi, dan pembersihan wadah jauh lebih mudah.

1.2.4 Sistem perendaman

Faktor lingkungan, seperti interval perendaman dan durasi penyinaran dalam sistem TIS, memainkan peran penting dalam keberhasilan perbanyakan anggrek secara in vitro (Ahmadian et al., 2017). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pengaturan interval perendaman yang optimal dapat meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan akar tanaman. Sistem perendaman sesaat dan berkala dapat memfasilitasi sel dalam memperoleh oksigen yang cukup, serta membatasi paparan terhadap media kultur, sehingga mampu menekan abnormalitas (Ernayunita dan Taryono, 2020). Steward et al. (1952) memperkenalkan teknik suspensi sel bebas untuk memperoleh populasi sel yang tersuspensi secara bebas dan mempertahankannya agar selalu tersedia untuk digunakan. Teknik ini merupakan hasil pengembangan dari metode sebelumnya yang dirancang dan banyak digunakan untuk pertumbuhan jaringan baru. Teknik ini mencakup fitur dengan tabung kultur berputar perlahan, potongan jaringan yang dieksplanasi secara bergantian terpapar udara dan terendam dalam medium, dan saat medium cair mengalir di sepanjang tabung, medium tersebut dijaga dalam keseimbangan dengan udara dan, saat bercampur perlahan, medium tersebut mendistribusikan isi cairan di sekitarnya ke jaringan (Steward et al., 1958).

Penelitian yang dilakukan oleh Bozkurt et al. (2023) menyimpulkan bahwa interval perendaman dalam sistem TIS memiliki pengaruh signifikan terhadap hasil mikropopagasi tanaman. Secara khusus, frekuensi dan durasi pencelupan dapat memengaruhi faktor-faktor seperti keberhasilan perakaran dan hiperhidrisitas.

Sebagai contoh, variasi interval pencelupan dapat mengurangi efek negatif dari hiperhidrisitas, yang merupakan masalah umum dalam kultur jaringan tanaman. Selain itu, studi oleh Etienne dan Berthouly (2002) menekankan bahwa frekuensi pencelupan merupakan parameter penting yang dapat mempengaruhi keberhasilan perbanyakan *in vitro*. Hasil penelitian oleh Leyva-Ovalle et al. (2020) menunjukkan bahwa perlakuan frekuensi pemaparan cairan nutrisi menggunakan bioreaktor TIS pada anggrek *Guarianthe skinneri* (Bateman) selama 2 menit setiap 4 jam menghasilkan produksi tunas yang paling tinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Penelitian yang dilakukan oleh Uma et al. (2021) menunjukkan bahwa perlakuan frekuensi perendaman 2 menit setiap 6 jam terbukti efisien untuk proliferasi tunas dan perakaran pada pisang kultivar Rasthali yang memiliki susunan genetik AAB dan termasuk dalam kelompok Silk.

Studi oleh Shekhawat et al., (2015) menekankan bahwa frekuensi pencelupan merupakan parameter penting yang mempengaruhi keberhasilan perbanyakan *in vitro*. Penelitian ini menyoroti bahwa pengoptimalan frekuensi pencelupan dan waktu kontak dalam sistem bioreaktor pencelupan sementara, seperti *SETIS TIB* (*simple temporary immersion system – temporary immersion bioreactor*), dapat secara signifikan meningkatkan mikropropagasi, perakaran, dan adaptasi terhadap kondisi rumah kaca. Dengan menyesuaikan parameter ini, pengguna kultur *in vitro* dapat mencapai hasil produksi yang lebih sukses dan berkelanjutan dalam kultur jaringan tanaman. Oleh karena itu, durasi perendaman yang tepat dalam kultur *in vitro* merupakan salah satu kunci dalam perbaikan metode budidaya *in vitro* (Kusuma dan Manuhara, 2022).

1.2.5 Photoperiode tanaman

Cahaya merupakan salah satu faktor lingkungan yang signifikan dalam mengendalikan pertumbuhan dan perkembangan tanaman, karena berhubungan erat dengan proses fotosintesis, fototropisme, dan morfogenesis. Pertumbuhan dan perkembangan tanaman secara *in vitro* dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti suhu, fotoperiode, intensitas cahaya, kelembapan, dan udara, yang dapat memengaruhi proses fisiologis tanaman, mengingat cahaya adalah sumber energi, serta pada periodefoto 16 jam menghasilkan tunas terbanyak per eksplan (Normasari, 2024). Selain itu, metabolisme karbon fotosintesis menyediakan energi dan kerangka karbon untuk metabolisme nitrogen, yang bermanfaat bagi tanaman muda dalam mensintesis asam amino dan protein, dan lain-lain (Huppe et al., 1994).

Kondisi cahaya (fotoperiode) memengaruhi morfogenesis, pertumbuhan vegetatif, dan sifat fisiologis dan biokimia tanaman, misalnya perubahan pertumbuhan, anatomi daun, pigmen fotosintetik, dan metabolit sekunder sebagai respons terhadap kualitas cahaya dan radiasi (Vitale et al. 2023). Pengaturan kondisi lingkungan kultur, termasuk lama penggelapan/penyinaran, terbukti memengaruhi induksi dan pertumbuhan tunas secara *in vitro*, sehingga dapat dimanfaatkan untuk mengoptimalkan pertumbuhan tunas (Mary et al. 2024). Pertumbuhan tunas *in vitro* yang ideal sangat penting untuk mikropropagasi, karena semakin banyak tunas yang

dihasilkan, semakin tinggi pula tingkat perbanyakan tanaman. Dalam studi oleh Smirnov et al. (2022), ditemukan bahwa peningkatan aktivitas fotosintesis diamati pada kedua varietas selada ketika iradiator LED dioperasikan selama 16 jam. Selain itu, penyinaran sepanjang waktu (24 jami) diterapkan di salah satu rak, karena beberapa penelitian menunjukkan potensi keuntungan dari rejimen penyinaran 24 jam untuk pertumbuhan tanaman (Smirnov et al. 2022).

Perubahan periode dapat mempengaruhi regulasi pigmen fotosensitif pada enzim metabolisme sukrosa, meningkatkan aktivitas enzim metabolisme sukrosa terkait, dan menyebabkan akumulasi fotosintat yang signifikan pada tanaman muda. Penelitian oleh Xu et al. (2020) menunjukkan bahwa fotoperiode 16 jam pada tanaman Cemara Tiongkok (*Cunninghamia lanceolata*) dapat meningkatkan efisiensi daun plantlet dalam kultur in vitro untuk menangkap, mengubah, dan mentransfer energi cahaya. Peningkatan kadar klorofil menunjukkan kemampuan adaptasi cahaya yang lebih kuat, peningkatan kemampuan transfer elektron klorofil, dan peningkatan aktivitas enzim siklus Calvin. Periode cahaya yang sesuai dapat mempengaruhi perpendekan waktu kultur, meningkatkan laju perakaran, serta meningkatkan jumlah daun dan akar (Marques et al. 2021).

1.2.6 *Internet of things (IoT)*

Praktik pertanian presisi modern, termasuk teknologi rumah kaca yang sebagian besar diotomatisasi, serta teknologi informasi yang dipadukan dengan teknologi IoT (*internet of things*), berkembang dengan baik dan efisien. Seiring dengan kemajuan teknologi, penerapan praktik otomatis seperti drone, sensor jarak jauh, komputer citra, dan alat analitis terus ditingkatkan dalam IoT untuk memantau tanaman, iklim mikro ruang kultur, dan peta lahan secara real-time (Rajak et al. 2023). Teknologi IoT semakin banyak digunakan dalam pertanian untuk mempromosikan praktik pertanian yang lebih berkelanjutan.

Pengaruh teknologi inovatif di sektor pertanian semakin nyata dari hari ke hari. Sistem otomatis berbasis IoT telah memberikan dampak signifikan pada industri pertanian, tidak hanya dalam bidang produksi dan diagnostik tanaman pangan, tetapi juga berdampak pada modifikasi praktik pertanian (Narinbaeva et al., 2021). Sistem IoT otomatis diterapkan untuk mengatur dan memantau iklim mikro kultur jaringan seperti suhu, kelembapan relatif (RH), dan cahaya di laboratorium. Sistem pemantauan berbasis IoT mencakup enam bagian utama, yaitu sensor, mikrokontroler, sumber internet, platform IoT berbasis cloud, perangkat kontrol, dan aplikasi (Rajak et al. 2023). Bagian-bagian ini dihubungkan dan diintegrasikan untuk tujuan kontrol dan pemantauan.

Tingkat suhu dan kelembapan sangat penting untuk kultur jaringan anggrek karena kehidupan kultur jaringan bergantung pada suhu dan kelembapan tersebut. Oleh karena itu, suhu dan kelembapan kultur jaringan anggrek harus dipertahankan pada tingkat tertentu. Rekomendasi umum untuk anggrek epifit adalah suhu siang 27–30°C, malam 21–24°C, kelembapan 50–80%, dan intensitas cahaya 2.000–3.000 lux (Yunanda et al., 2023). Inovasi berbasis IoT yang digunakan di laboratorium kultur

jaringan tanaman telah dikembangkan oleh para peneliti. Hasil penelitian (Dalina dan Sobejana, 2019) menunjukkan bahwa sistem IoT berhasil diuji untuk mengatur suhu dan RH di laboratorium kultur jaringan pisang.

1.3 Tujuan dan Kegunaan

Penelitian dilakukan untuk mempelajari apakah pemberian interval waktu perendaman dan lama penyinaran lampu meningkatkan perbanyakan anggrek hitam pada TIS.

Kegunaan penelitian untuk mendapatkan interval waktu perendaman dan lama penyinaran lampu menghasilkan perbanyakan anggrek hitam pada TIS dan sebagai bahan informasi penelitian selanjutnya.

1.4 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini terfokus 3 pada hal, yaitu :

1. Terdapat interaksi antara interval perendaman dan lama penyinaran lampu menghasilkan perbanyakan anggrek hitam
2. Terdapat interval perendaman yang menghasilkan perbanyakan anggrek hitam
3. Terdapat pengaruh signifikan lama penyinaran lampu yang menghasilkan perbanyakan anggrek hitam

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1. Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biosains & Bioreproduksi Tanaman, Fakultas Pertanian Universitas Hasanuddin, yang bertempat di Gedung Teaching Industry, Inkubasi Bisnis Teknologi *Science and Techno Park* (IBT-STP). Pelaksanaan penelitian ini mulai dari bulan April hingga September 2025.

2.2. Bahan dan Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu *laminar air flow* cabinet (LAFC), oven, autoklaf, cawan Petri, gelas ukur, *hot plate*, pH meter, timbangan analitik 620 gram, erlenmeyer, alat diseksi (*scalpel*), bunsen, mata pisau, pinset, *RHS Color Chart* dan *temporary immersion system* (TIS), *RTC*, *arduino uno*, *ESP8266*, relay, kabel jumper.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini berupa plantlet anggrek hitam, media *Murashige and Skoog*, aquades, alkohol 70%, alkohol 96%, plastik wrap, karet gelang, *aluminium foil*, label, plastik bening tahan panas, larutan NaOH, larutan NaCl, zat pengatur tumbuh *Benzile Amino Purin* (BAP), dan *Naphthalene Acetic Acid* (NAA).

2.3. Metode Penelitian

Penelitian disusun dalam rancangan eksperimen dengan desain acak lengkap (RBD (*Randomized block design*)) dengan percobaan faktorial dua faktor. Terdapat 2 faktor perlakuan, dimana faktor pertama yaitu lama penyinaran (P) yang terdiri dari 4 taraf, dan faktor kedua yaitu perendaman (F) yang terdiri dari 3 taraf.

Faktor pertama perlakuan Lama Penyinaran (*Photoperiode*), terdiri dari 4 taraf sebagai berikut :

- (p1) 12 jam terang, 12 jam gelap
- (p2) 16 jam terang, 8 jam gelap
- (p3) 20 jam terang, 4 jam gelap
- (p4) 24 jam terang, 0 jam gelap

Faktor kedua yaitu perlakuan Interval perendaman (*Immersion Frequency*), terdiri dari 3 taraf sebagai berikut :

- (f1) 6 kali/hari, dengan perendaman 2 menit
- (f2) 4 kali/hari, dengan perendaman 2 menit
- (f3) 8 kali/hari, dengan perendaman 2 Menit

Total perlakuan yaitu 12 kombinasi, masing-masing diulang 5 kali, maka total unit percobaan adalah 60 unit percobaan.

2.4. Pelaksanaan Penelitian

2.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan dalam kultur *in vitro* harus dalam keadaan steril sehingga perlu dilakukan sterilisasi dengan beberapa langkah sebagai berikut :

- a. Bungkus setiap bagian-bagian komponen TIS pada plastik tahan panas
- b. Sterilisasi setiap komponen secara terpisah yang telah dibungkus pada plastik tahan panas selama 30 menit pada suhu 121°C
- c. Tuang media pada botol TIS di dalam LAFC, sekaligus merakit setiap komponen yang telah disterilisaasi sebelumnya
- d. Sterilisasi ulang TIS yang telah terisi media pada suhu 121°C selama 20 menit
- e. Sterilisasi cawan Petri, gagang dan skalpel, dan pingset di oven selama 2 jam 30 menit pada suhu 121°C yang sebelumnya telah dibungkus kertas putih
- f. Sebelum melakukan kegiatan didalam LAFC, LAFC terlebih dahulu di UV selama 30 menit, lalu menyalakan blower selama 15 menit.

2.4.2 Persiapan Media Tanam

Langkah-langkah pembuatan media dasar MS untuk subkultur seedling anggrek hitam adalah sebagai berikut :

- a. Siapkan Erlenmeyer berukuran 1 liter yang berisi aquades steril sebanyak 1/3 dari volume erlenmeyer dan masukkan *magnetic stirrer* kemudian tempatkan di atas *hot plate stirrer*.
- b. Gula ditimbang sebanyak 30 g, kemudian dilarutkan ke dalam Erlenmeyer
- c. Masukkan larutan stok MS (makro, mikro, stok Fe, stok vitamin) yang telah disiapkan dengan konsentrasinya masing-masing ke dalam erlenmeyer
- d. Aduk larutan menggunakan *magnetic stirrer* diatas *hot plate*.
- e. Tambahkan ZPT BAP 3 mg/L dan NAA 0,5 mg/L (Than et al., 2008; Hartati et al., 2016 dan Syamsiah et al., 2020)
- f. Tambahkan aquades kedalam erlenmeyer hingga volume mencapai 900 ml
- g. Ukur pH larutan menggunakan pH meter, tambahkan NaOH secukupnya jika pH larutan kurang dari 5,8 dan HCL secukupnya jika pH larutan lebih dari 5,8
- h. Tambahkan aquades hingga volume larutan menjadi 1000 ml
- i. Masukkan media ke dalam botol kultur sebanyak 250 mL/botol, kemudian ditutup dan diberi plastik wrap.

2.4.3 Persiapan Planlet

Planlet anggrek hitam yang digunakan berasal dari Kalimantan dan di perbanyak di Agritani.id – PT Kreatif Digital Muda, Kota Bogor, Jawa Barat, Indonesia. Planlet dipisahkan satu sama lain, kemudian disubkulturkan di dalam media MS, yang telah ditambahkan arang aktif dan agar. Botol-botol media masing-masing berisi 5-10 planlet. Planlet berumur 2-3 minggu setelah dikulturkan kemudian dimasukkan pada masing-masing bejana TIS yaitu sebanyak 10 planlet per bejana TIS.

2.4.4 Instalasi Rangkaian Automasi Penyinaran Lampu

Instalasi sistem automasi penyinaran lampu dilakukan melalui beberapa tahapan yang saling berkaitan. Tahap awal dimulai dengan perancangan skematik otomatisasi fotoperiode menggunakan perangkat lunak *Fritzing* sebagai acuan perakitan rangkaian (Raditya et al., 2022). Selanjutnya, disiapkan alat dan bahan yang diperlukan, meliputi *Arduino Uno*, RTC (*Real Time Clock*), *relay*, kabel jumper, serta lampu colokan sebagai sumber penyinaran.

Setelah seluruh komponen tersedia, proses perakitan dilakukan dengan menghubungkan *Arduino Uno* ke modul RTC dan relay menggunakan kabel jumper sesuai dengan port yang telah ditentukan berdasarkan hasil rancangan pada software *Fritzing*. Relay kemudian dihubungkan dengan lampu serta sumber listrik PLN agar sistem dapat mengontrol penyalan dan pemadaman lampu secara otomatis.

Tahap berikutnya adalah pembuatan program (*coding*) pada *Arduino Uno* yang berfungsi untuk mengatur waktu hidup dan mati lampu sesuai dengan perlakuan lama penyinaran, yaitu: (p0) 12 jam terang dan 12 jam gelap, (p1) 16 jam terang dan 8 jam gelap, (p2) 20 jam terang dan 4 jam gelap, serta (p3) 24 jam terang dan 0 jam gelap. Program yang telah dibuat kemudian diunggah (*upload*) ke mikrokontroler *Arduino Uno*.

Setelah proses pengunggahan selesai, dilakukan pengecekan untuk memastikan seluruh rangkaian dan sistem automasi berfungsi dengan baik. Tahap akhir adalah pemasangan komponen dengan merekatkan seluruh rangkaian pada papan berukuran 30 cm × 30 cm menggunakan lem lilin agar rangkaian tersusun rapi dan aman digunakan.

2.4.5 Instalasi Rangkaian *Internet of Things* (IoT)

Langkah-langkah dalam instalasi sistem otomatisasi berbasis IoT yaitu sebagai berikut:

- a. Buat rangkaian skematik IoT sebagai pedoman instalasi melalui software *Fritzing*
- b. Siapkan alat dan bahan komponen IoT seperti ESP8266, DHT 22, Relay, kabel jumper, lampu, lem lilin, dan aplikasi Blynk IoT
- c. Sambungkan komponen satu dengan lainnya seperti sensor Lux, sensor Getar, sensor DHT22 menggunakan kabel jumper dan sesuai port dari pedoman skematik yang telah dibuat
- d. Lakukan coding untuk program melalui software *Fritzing*
- e. Rekatkan setiap komponen ke papan yang berukuran 30 cm x 30 cm dengan menggunakan lem lilin.

2.4.6 Penanaman Planlet

Penanaman dilakukan di dalam LAF dengan beberapa langkah sebagai berikut :

- a. Masukkan bahan planlet hasil perbanyakan ke dalam cawan petri dengan pinset dan memotong planlet untuk memisahkan satu persatu dengan menggunakan pisau scalpel.
- b. Masukkan 10 planlet ke dalam bejana TIS pada komparter atas menggunakan pinset, dan di komparter bawah berisi media (Leyva-Ovalle et al., 2020).
- c. Tutup rapat bejana kultur yang telah ditanami dan direkatkan dengan *plasticwrapping* untuk menghindari kontaminasi.
- d. Rekatkan selang TIS dan filter TIS pada tutup botol dan pada botol TIS yang menjadi saluran masuknya tekanan udara.
- e. Beri label pada bejana kultur yang telah ditanami dengan mencantumkan tanggal penanaman, nama media dan jenis perlakuan yang diberikan.
- f. Sambungkan selang dari manifold ke filter yang berada di TIS pada ruang inkubasi

2.4.7 Pemeliharaan Kultur

Ruangan inkubasi harus dijaga tetap steril dengan penyemprotan alkohol 70% pada ruang serta botol TIS, keluarkan eksplan yang terkontaminasi dari ruang kultur, dengan pengaturan suhu (25-28°C) (Safitri, 2021), Heriansyah et al. (2025), menyebutkan suhu (20–32°C), RH (40–90%), PPFD (*Photosynthetic Photon Flux Density*) (81-189 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Jenis *Dendrobium* memerlukan cahaya dengan intensitas 2.000-3.000 lux. Sementara itu, intensitas cahaya yang dibutuhkan untuk pertumbuhan anggrek adalah 1.000-2.000 (Prapitasari dan Kurniawan, 2022).

2.5. Pengamatan dan Pengukuran

Parameter pengamatan diukur dan dihitung dengan cara sebagai berikut:

2.5.1 Presentase planlet hidup (%)

Pengamatan presentase planlet hidup dilakukan ketika planlet telah berumur 30 HST (Hari setelah tanam). Menurut Eryuni et al., (2025), presentasi eksplan hidup dihitung pada akhir penelitian dengan menghitung seluruh planlet yang hidup. Pengamatan dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Planlet Hidup} = \frac{\text{Jumlah eksplan hidup}}{\text{Jumlah eksplan seluruhnya}} \times 100\%$$

2.5.2 Presentase kontaminasi (%)

Hitung botol TIS yang mengalami kontaminasi setiap minggu, dengan mempertimbangkan gejala seperti media yang menjadi keruh, munculnya jamur, bintik-bintik lendir, pembusukan pada pangkal tanaman yang terendam media berubah menjadi cokelat tua atau hitam dan teksturnya lembek (Gambar lampiran 2). Pengamatan dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ kontaminasi} = \frac{\text{Jumlah eksplan terkontaminasi}}{\text{Total eksplan}} \times 100\%$$

2.5.3 Jumlah tunas baru

Jumlah tunas dihitung pada akhir pengamatan dengan menghitung tunas yang terbentuk berukuran minimal 1 mm (Eryuni et al., (2025). Pengamatan dilakukan saat planlet berumur 30 HST pada akhir pengamatan.

2.5.4 Tinggi planlet (cm)

Tinggi planlet diukur dari pangkal hingga ujung titik tumbuh daun menggunakan penggaris berstarna cm. Pengamatan dilakukan saat planlet berumur 30 HST pada akhir pengamatan.

2.5.5 Jumlah daun (Helai)

Dihitung secara manual berdasarkan banyaknya daun dengan menghitung daun yang terbentuk dan mengembang sempurna. Pengamatan dilakukan saat tanaman berumur 30 HST pada akhir pengamatan (Hanifah et al., 2024).

2.5.6 Panjang daun (cm)

Hitung berdasarkan ukuran daun terpanjang pada planlet yang ditanam, diukur secara manual menggunakan penggaris mulai dari pangkal daun hingga ujung daun. Pengamatan dilakukan ketika tanaman berumur 30 HST pada akhir pengamatan.

2.5.7 Berat basah planlet (g)

Planlet utuh kemudian diukur menggunakan timbangan analitik dan dilakukan pendataan. Berat basah planlet dilakukan saat tanaman berumur 30 HST pada akhir pengamatan.

2.5.8 Panjang akar (cm)

Dihitung dengan mengukur rata-rata panjang akar yang tumbuh pada setiap planlet. Pengamatan dilakukan menggunakan penggaris yang diukur dari pangkal akar hingga ujung akar. Pengamatan dilakukan ketika tanaman berumur 30 HST pada akhir pengamatan.

2.5.9 Tingkat hiperhidrisitas (tunas)

Menurut Etienne dan Berthouly., (2002), metode TIS lebih terukur dengan menghitung proporsi planlet yang mengalami hiperhidrisitas. Rumus Indeks Hiperhidrisitas (IH);

$$IH = \frac{\text{Jumlah eksplan dengan gejala hiperhidrisitas}}{\text{Jumlah total eksplan}} \times 100\%$$

2.5.10 Pengamatan kualitas tanaman

Pengamatan bagian morfologi daun dilakukan dengan pencocokan warna duaan dengan RHS Colour Chart (*Royal Horticultural Society*, UK), dengan menggunakan sampel daun pada setiap perlakuan.

2.5.11 Kepadatan dan Ukuran Stomata pada Planlet

Pada saat pengamatan menggunakan 2 jenis sampel yaitu sampel daun pagi dan sore untuk menghitung densitas stomata. Pengamatan preparat stomata

dilakukan menggunakan mikroskop pada perbesaran 40x dengan luas bidang pandang 0.12 mm². Penghitungan kepadatan stomata dilakukan pada tiap kondisi morfologi stomata menggunakan rumus (Lestari, 2006) :

$$\text{Kepadatan Stomata} = \frac{\text{Jumlah stomata}}{\text{Luas bidang pandang}}$$

Panjang stomata μm (*Mikrometer*) = *Panjang stomata (mm)* x 1.000

Lebar stomata μm (*Mikrometer*) = *Panjang stomata (mm)* x 1.000

2.5.12 Kandungan total klorofil dan karotenoid pada planlet

Sampel daun anggrek hitam ditimbang masing masing sebanyak 5 gram. Sampel yang telah ditimbang kemudian dimaserasi dengan menggunakan pelarut sebanyak 100 mL selama 1 x 24 jam atau sampai terlarut. Dalam penelitian ini, pelarut yang digunakan adalah aseton.

Prosedur kerja untuk analisis kadar klorofil pada planlet menggunakan alat spektrofotometer adalah mengkalibrasi spektrofotometer terlebih dahulu terhadap nilai transmitansinya. Nilai transmitan pelarut diatur atau dibuat 100%, sehingga nilai absorbansi yang dihasilkan saat pengukuran semata mata ditentukan oleh klorofil sebagai zat terlarutnya (bukan oleh pelarut), kemudian larutan klorofil dimasukkan ke dalam kuvet sampai tanda batas dan selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 645 dan 663 nm (Metode Arnon) untuk pelarut aseton (Suyitno, 2010). Rumus untuk menghitung kadar klorofil a, kadar klorofil b dan kadar total klorofil sebagai berikut:

$$\text{Klorofil a} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = (12,7 \times \text{OD } 663) - (2,69 \times \text{OD } 645)$$

$$\text{Klorofil b} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = (22,9 \times \text{OD } 645) - (4,68 \times \text{OD } 663)$$

$$\text{Total Klorofil} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = (20,2 \times \text{OD } 645) - (8,02 \times \text{OD } 663)$$

2.6. Analisis Data

Data yang diperoleh akan dianalisis menggunakan analisis statistik deskriptif untuk mengidentifikasi perbedaan rata-rata antar perlakuan. Selanjutnya, analisis varians (ANOVA) akan dilakukan untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang signifikan antara perlakuan yang diberikan. Jika ditemukan perbedaan yang signifikan, akan dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf kepercayaan 0,05%.