

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Kultur *In vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan Februari sampai Mei 2018.

B. Alat dan Bahan Penelitian

Alat - alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *glassware*, *dissecting kits*, pH meter, pembagi media, *autoklaf* elektrik, neraca analitik, *scalpel*, *stirer*, *milipore*, pipet tetes, sendok, bunsen, cawan timbang, *petridish*, *erlenmeyer*, botol kultur dan *Laminar Air Flow Cabinet*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari eksplan PLB umur 1,5 bulan dan tunas anggrek *Vanda tricolor in vitro* umur 1 tahun, medium *Vacin and Went* (VW), Zat Pengatur Tumbuh *Thidiazuron* (TDZ), *Napthalene Acetic Acid* (NAA), sukrosa, *Phytigel* (agar), Alkohol, arang aktif, *Plant Preservatif Mixture* (PPM), *aluminium foil*, kertas payung, karet, HCl, KOH, *plastic wrap*, spirtus dan aquadest steril.

C. Metode Penelitian

Penelitian ini terdiri dari 2 tahap, yaitu :

- a) Tahap 1 : Pengaruh konsentrasi TDZ terhadap eksplan PLB *Vanda tricolor* secara *in vitro*.

Penelitian dilaksanakan menggunakan metode percobaan faktor tunggal 3 perlakuan yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) menggunakan eksplan PLB. Tiap 3 perlakuan terdiri dari 10 ulangan sehingga total 30 unit, semua perlakuan ditambahkan 0,5 mg/l NAA, 0,2 g/l arang aktif dan 0,5 ml/l *Plant Preservative Mixture* (PPM). Perlakuan yang diuji meliputi :

$$P1 = \text{PLB} + 0 \text{ mg/l TDZ}$$

$$P2 = \text{PLB} + 0,5 \text{ mg/l TDZ}$$

$$P3 = \text{PLB} + 1 \text{ mg/l TDZ}$$

b) Tahap 2 : Pengaruh konsentrasi TDZ terhadap eksplan Tunas *Vanda tricolor* secara *in vitro*.

Penelitian dilaksanakan menggunakan metode percobaan faktor tunggal 3 perlakuan yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) menggunakan eksplan tunas. Tiap 3 perlakuan terdiri dari 10 ulangan sehingga total 30 unit, semua perlakuan ditambahkan 0,5 mg/l NAA, 0,2 g/l arang aktif dan 0,5 ml/l *Plant Preservative Mixture* (PPM). Perlakuan yang diuji meliputi :

$$T1 = \text{Tunas} + 0 \text{ mg/l TDZ}$$

$$T2 = \text{Tunas} + 0,5 \text{ mg/l TDZ}$$

$$T3 = \text{Tunas} + 1 \text{ mg/l TDZ}$$

D. Cara Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap, yaitu mulai dari sterilisasi alat, pembuatan medium, persiapan ZPT, persiapan media pertumbuhan, persiapan eksplan, inokulasi dan pemeliharaan. Adapun penjelasan tahapan tersebut, yaitu :

1. Sterilisasi Alat

Sterilisasi dilakukan dengan dua cara yaitu, sterilisasi basah atau uap air yang bertekanan dan sterilisasi bakar. Sterilisasi basah bertekanan dilakukan dengan memasukkan alat-alat yang telah dibungkus dengan kertas payung dalam *autoklaf* pada suhu 121°C bertekanan 1 atm selama 30 menit. Alat-alat yang disterilisasi antara lain : botol kultur, *scalpel*, pinset, *aluminium foil*, *petridish*, dan *erlenmeyer*.

Sterilisasi bakar menggunakan lampu bunsen yang dilakukan di *Laminar Air Flow* (LAF). Cara yang digunakan yaitu alat yang digunakan dicelupkan dalam Alkohol 70%, kemudian dibakar pada lampu spritus. Alat yang dibakar yaitu pinset dan *scalpel* yang berfungsi untuk penanaman eksplan.

2. Persiapan Zat Pengatur Tumbuh

Zat Pengatur Tumbuh yang digunakan yaitu TDZ dan NAA. Persiapan pembuatan stok TDZ dan NAA yaitu masing-masing ZPT ditimbang 0,01 gram dan ditambahkan beberapa tetes KOH, kemudian ditambahkan aquadest steril sampai mencapai 100 ml (lampiran IV). Rumus kebutuhan untuk setiap ulangan adalah :

$$\text{Kebutuhan ZPT} = \frac{\text{Total larutan setiap ulangan (ml)}}{1000 \text{ ml aquadest}} \times \text{ZPT (ml)}$$

3. Pembuatan Medium

Medium pertumbuhan kultur berupa VW dengan tambahan ZPT yaitu *Thidiazuron* dan NAA. Medium VW dibuat sebanyak 1200 ml untuk 6

perlakuan, setiap perlakuan sebanyak 200 ml, masing-masing perlakuan digunakan 10 botol kultur, sehingga terdapat 60 botol kultur. Setiap botol kultur diisi sebanyak 20 ml larutan medium VW.

Tahap awal untuk pembuatan medium VW yaitu dengan mencampurkan komponen VW, Sukrosa dan NAA terlebih dahulu. Kemudian ditambahkan aquadest steril 20 ml dan diaduk, selanjutnya diatur pH nya dengan penambahan KOH jika basah atau HCl jika asam sampai mencapai angka 6. Setelah itu, ditambahkan aquadest steril sampai mencapai 200 ml dan komponen lain yaitu PPM, *Phytigel* dan arang aktif. Setelah itu larutan dimasukkan ke dalam botol kultur masing-masing 20 ml dengan alat pembagi media, botol yang sudah berisi medium ditutup dengan plastik dan disterilisasi menggunakan *autoklaf* 1 atm selama 20 menit dengan suhu 121°C. Setelah itu diletakkan di ruang inkubasi.

Sementara itu untuk perlakuan yang menggunakan TDZ, pembagian larutan ke dalam botol kultur dilakukan di dalam LAF. Pemberian TDZ menggunakan *millipore* steril agar cendawan tersaring dan mencegah terjadinya kontaminasi, kegiatan ini dilakukan per ulangan. Perhitungan komponen pembuatan medium VW (200 ml) disajikan pada (lampiran I).

4. Persiapan Eksplan

Eksplan yang digunakan berupa PLB dan tunas dari koleksi angrek botol berumur 1,5 bulan dan 1 tahun yang sudah steril. Eksplan PLB diambil satu persatu dari koleksi angrek botol menggunakan *scalpel* dan ditanam

kembali pada masing-masing botol kultur sesuai perlakuan. Masing-masing botol kultur berisi 1 PLB eksplan anggrek.

Eksplan tunas yang digunakan yaitu tunas yang paling muda pada bagian tengah. Sebelum ditanam, eksplan tunas terlebih dahulu direndam *clorox* 5% selama 5 menit agar lebih steril, kemudian dibilas dengan aquadest steril sebanyak tiga kali. Bagian pucuk tunas dipotong dan bagian pangkal tunas juga dipotong dengan menyisakan sedikit akar. Kemudian eksplan ditanam pada masing-masing botol kultur yang berisi medium sesuai dengan perlakuan.

5. Inokulasi

Inokulasi dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) yang terlebih dahulu disterilkan dengan menyemprotkan Alkohol 70% dan dikeringkan menggunakan tisu yang kemudian disterilisasi kembali menggunakan lampu UV yang dinyalakan 1 jam sebelum digunakan. *Blower* dinyalakan di dalam LAF 10 menit setelah lampu UV mati sebelum LAF digunakan.

Setelah LAF siap digunakan, Eksplan PLB dan tunas anggrek *Vanda tricolor* diinokulasi. Setiap botol kultur diinokulasi 1 eksplan anggrek dan ditutup dengan *aluminium foil* secara rapat dan bagian luar dilapisi plastik *wrap* dan dilabel.

6. Pemeliharaan

Botol yang sudah diinokulasi dan ditutup rapat kemudian diletakkan di rak dalam ruang inkubasi. Ruang inkubasi menggunakan cahaya lampu

neon (TL) sebagai sumber cahaya dengan kekuatan 40 watt yang dinyalakan selama 24 jam.

Cahaya dalam kultur *in vitro* dibutuhkan untuk mengatur proses morfogenesis. Suhu di dalam ruangan inkubasi diatur menggunakan AC yang bersuhu 20°C-28°C. Pemeliharaan dilakukan selama tiga bulan terhitung setelah penanaman. Rak-rak yang berada di ruang inkubasi dibersihkan dengan menyemprot Alkohol 70%.

E. Variabel Pengamatan

Pengamatan dilakukan selama 12 minggu dengan berbagai variabel pertumbuhan. Parameter pengamatan yang diamati pada ke dua tahap penelitian adalah sebagai berikut :

1. Persentase Eksplan Hidup (%)

Persentase eksplan hidup adalah jumlah eksplan hidup dari jumlah total eksplan tiap perlakuan. Pengamatan dilakukan dengan cara melihat eksplan yang hidup (eksplan yang tidak terkontaminasi dan tidak mengalami pencoklatan atau *browning* >80%) diamati setiap seminggu sekali selama 12 minggu. Persentase eksplan hidup dihitung diakhir pengamatan dengan rumus :

$$\text{Persentase eksplan hidup (\%)} = \frac{\sum \text{eksplan hidup}}{\sum \text{total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

2. Persentase *Browning* (%)

Eksplan yang mengalami pencoklatan diamati setiap minggu hingga akhir pengamatan yaitu pada minggu ke-12. Eksplan yang mengalami

browning ditunjukkan dengan warna kecoklatan >50% pada eksplan. Eksplan yang mengalami *browning* atau pencoklatan setiap minggu dihitung dengan rumus :

$$\text{Persentase eksplan browning (\%)} = \frac{\sum \text{eksplan browning}}{\sum \text{total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

3. Persentase Kontaminasi (%)

Persentase eksplan terkontaminasi adalah jumlah eksplan terkontaminasi dari jumlah total eksplan tiap perlakuan. Eksplan yang terkontaminasi diamati setiap seminggu sekali selama 12 minggu. Eksplan dikatakan terkontaminasi apabila terdapat jamur atau bakteri pada eksplan atau medium kultur tersebut. Persentase eksplan terkontaminasi dihitung dengan rumus :

$$\text{Persentase eksplan kontaminasi (\%)} = \frac{\sum \text{eksplan terkontaminasi}}{\sum \text{total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

4. Pertambahan Diameter PLB (mm)

Pengamatan dilakukan dengan mengukur eksplan PLB menggunakan penggaris dengan satuan milimeter (mm). Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali dari sudut yang berbeda, kemudian dirata-rata. Pengamatan dilakukan setiap minggu selama 12 minggu, kemudian dihitung selisih diameter eksplan. Selisih diameter eksplan dihitung dengan rumus :

$$\text{Selisih diameter eksplan} = \text{Diameter PLB 8 MST} - \text{Diameter PLB 1 MST}$$

5. Tinggi Tunas (cm)

Pengamatan yang dilakukan dengan mengukur tinggi eksplan tunas saja mulai dari permukaan medium sampai ujung daun dengan satuan sentimeter (cm). Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali dari sudut yang

berbeda, kemudian dirata-rata. Pengamatan dilakukan setiap minggu selama 12 minggu.

6. Jumlah Tunas

Pengamatan dilakukan satu minggu sekali selama 12 minggu dengan mengamati jumlah tunas yang tumbuh pada masing-masing eksplan. Tunas yang diamati yaitu tunas yang sudah memiliki bakal daun atau yang sudah memiliki tinggi 2 mm.

7. Waktu Muncul Tunas

Pengamatan dilakukan satu minggu sekali selama 12 minggu dengan mengamati tunas baru yang tumbuh pada masing-masing eksplan. Waktu muncul tunas yang diamati ialah benjolan berwarna hijau yang terdapat pada eksplan.

8. Persentase Eksplan Bertunas (%)

Persentase eksplan bertunas dihitung setiap minggu selama 12 minggu. Perhitungan dilakukan dengan melihat penambahan tunas baru pada masing-masing eksplan dan dinyatakan dalam persen dengan rumus :

$$\text{Persentase eksplan bertunas (\%)} = \frac{\sum \text{eksplan bertunas}}{\sum \text{total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

9. Persentase Eksplan Berakar (%)

Persentase eksplan berakar dihitung setelah selesai pengamatan. Perhitungan dilakukan dengan melihat jumlah eksplan yang berakar pada hari terakhir pengamatan dan dinyatakan dalam persen, dengan rumus :

$$\text{Persentase eksplan berakar (\%)} = \frac{\sum \text{eksplan berakar}}{\sum \text{total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

F. Analisis Data

Data hasil pengamatan diolah dengan software *Statistical Analysis System* (SAS). Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam *General Linier Model* (GLM). Jika hasil menunjukkan signifikansi pada taraf $\alpha = 5\%$, maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan Uji Jarak berganda DMRT (*Duncan Multiple Range Tes*) pada taraf $\alpha = 5\%$ untuk mengetahui perlakuan yang berbeda nyata atau tidak berbeda nyata. Hasil analisis ditampilkan dalam bentuk tabel dan gambar.