

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Kultur *In vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada Bulan Desember 2018 – Maret 2019.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah eksplan tunas anggrek *Vanda tricolor* umur 12 bulan, Medium New Dogashima (NDM), arang aktif, Thidiazuron, air kelapa, buah pisang, buah tomat, alkohol 70%, aquades, spirtus, sukrosa, phytigel dan PPM (*Plant Preservative Mixture*).

Alat-alat yang digunakan adalah timbangan analitik, pH stik, alumunium foil, karet, plastik wrap, sprayer, kertas payung, label, *dissecting kits*, autoklaf, petridish, botol kultur, gelas ukur, gelas piala, corong gelas, pipet, erlenmeyer, pipet tetes, pinset, pengaduk kaca, *Laminar Air Flow* (LAF), *syringe*, *milipore*, bunsen, blender, kompor gas, blender, gunting dan mikroskop.

C. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode percobaan laboratorium, yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap dengan desain percobaan faktor tunggal 4 perlakuan yaitu: Medium NDM yang ditambahkan thidiazuron, air kelapa, ekstrak tomat, ekstrak tomat dan arang aktif 0,2 g/l.

A : TDZ 0,5 mg/L

B : Air kelapa 150 ml/L

C : Air kelapa 150 ml/L + Ekstrak tomat 150 ml/L

D : Air kelapa 150 ml/L + Ekstrak pisang 150 g/L

Setiap perlakuan diulang sebanyak 5 kali, setiap ulangan terdiri dari 3 sampel sehingga total unit perlakuan adalah 60 botol (*Layout* pada lampiran 1).

D. Cara Penelitian

Tahap penelitian yang akan dilakukan meliputi sterilisasi, pembuatan medium, inokulasi, inkubasi, pengamatan dan analisis data.

1. Persiapan dan Sterilisasi Alat

Peralatan seperti botol kultur sebelum digunakan direndam terlebih dahulu pada larutan *Clorox* selama 1 hari. Setelah itu dicuci dengan menggunakan sabun dan dibilas dengan air mengalir. Botol kultur dan peralatan lainnya (erlenmeyer, gelas ukur, petridish dan pinset) yang sudah dicuci bersih dibungkus menggunakan kertas payung, kemudian disterilisasi ke dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 60 menit. (Sterilisasi alat pada lampiran 7a).

2. Pembuatan Medium NDM0

Medium NDM0 dibuat sebanyak 200 ml untuk menetralkan eksplan yang diinokulasi dari medium sebelumnya. Eksplan ditanam sebanyak 10 botol. Setiap botol ditanam 10 eksplan. (Komposisi Medium NDM pada lampiran 2).

3. Penyiapan Ekstrak

a. Air Kelapa

Air kelapa yang digunakan yaitu air kelapa muda yang masih memenuhi buah dan daging buah masih berlendir. Air kelapa disiapkan sebanyak 250 ml disterilisasi dengan cara disaring menggunakan kertas saring. Hasil saringan dimasukkan ke dalam plastik.

b. Ekstrak Pisang

Pisang yang digunakan yaitu jenis pisang ambon. Kulit pisang bagian luar dikupas, kemudian buah pisang dipotong kecil. Selanjutnya daging buah diblender tanpa menggunakan air sampai halus. Bubur pisang ditimbang sebanyak 45 g, kemudian dimasukkan ke dalam botol steril dan ditutup.

c. Ekstrak Tomat

Sebanyak 200 g buah tomat yang sudah masak yang ditandai dengan kulit buah berwarna merah dipotong kecil kemudian diblender tanpa menggunakan air sehingga diperoleh ekstrak tomat murni. Ekstrak tomat disaring agar terpisah dari ampasnya sehingga diperoleh ekstrak tomat 100%. Hasil saringan kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup. Kandungan air kelapa, ekstrak pisang dan ekstrak tomat pada lampiran 3 dan penyiapan ekstrak pada lampiran 7b.

4. Pembuatan Medium Perlakuan

Tahap awal dalam pembuatan medium yaitu menentukan total kebutuhan bahan dilakukan dengan menghitung kebutuhan per ulangan. Sehingga untuk satu Erlenmeyer diisi dengan larutan sebanyak 300 ml yang berisi medium,

sukrosa, vitamin, Phytigel, ppm, aquades dan ekstrak ZPT organik. Larutan yang telah tercampur kemudian dipanaskan hingga mendidih, setelah mendidih dimasukkan ke dalam botol, masing-masing botol berisi 20 ml larutan. Botol-botol yang telah diisi larutan medium tersebut ditutup dengan plastik tahan panas kemudian disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 1,5 jam, setelah selesai medium disimpan di ruang inkubasi. Pembuatan medium perlakuan pada lampiran 7c. Berikut ini perlakuan yang dilakukan:

a. NDM + TDZ

Medium NDM + Aquades 50 ml (untuk melarutkan) + sukrosa, cek dan sesuaikan pH (pH normal = 6) + Phytigel + ppm + aquades hingga volume larutan menjadi 299,5 ml + TDZ. 0,5 ml, kemudian digunakan untuk 5 kali ulangan (15 botol). TDZ tidak disterilisasi di dalam autoklaf karena TDZ bersifat termolabil, sehingga sterilisasi dilakukan dengan metode sterilisasi filter. Cara sterilisasi TDZ menggunakan *millipore* yang berukuran 0,2 yang telah disterilisasi dan *syringe* tanpa jarum. Penambahan TDZ di LAF pad Lampiran 7d. Untuk mendapatkan konsentrasi TDZ sesuai dengan perlakuan, maka dilakukan pengenceran terlebih dahulu. Rumus dasar yang biasa digunakan untuk mengencerkan TDZ yaitu 10 mg TDZ dilarutkan dalam 100 ml aquades steril, sehingga rumus kebutuhan untuk setiap ulangan adalah :

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

b. NDM + Air Kelapa

Medium NDM + Aquades 50 ml (untuk melarutkan) + sukrosa, cek dan sesuaikan pH (pH normal = 6) + Phytigel + ppm + aquades hingga volume larutan menjadi 300 ml + air kelapa. Kemudian digunakan untuk 5 kali ulangan (15 botol).

c. NDM + Air Kelapa + Ekstrak Pisang

Medium NDM + Aquades 50 ml (untuk melarutkan) + sukrosa, cek dan sesuaikan pH (pH normal = 6) + Phytigel + ppm + aquades hingga volume larutan menjadi 300 ml + air kelapa + ekstrak pisang. Kemudian untuk 5 kali ulangan (15 botol).

d. NDM + Air Kelapa + Ekstrak Tomat

Medium NDM + Aquades 50 ml (untuk melarutkan) + sukrosa, cek dan sesuaikan pH (pH normal = 6) + Phytigel + ppm + aquades hingga volume larutan menjadi 300 ml + air kelapa + ekstrak tomat. Kemudian digunakan untuk 5 kali ulangan (15 botol). Perhitungan medium pada lampiran 4.

5. Penyiapan Sumber Eksplan

Eksplan diambil dari koleksi laboratorium kultur *in vitro* UMY yang berupa tunas. Eksplan tunas anggrek *Vanda tricolor* yang digunakan berasal dari medium dengan penambahan ZPT yang berbeda, sehingga eksplan perlu dihomogenkan pada medium NDM0 selama 1 minggu. Hal ini bertujuan agar eksplan *Vanda tricolor* tidak terpengaruh oleh bahan-bahan yang terkandung dalam medium sebelumnya. Inokulasi NDM0 pada lampiran 7e.

6. Inokulasi Multiplikasi Eksplan

Inokulasi eksplan dilakukan di dalam LAF (*Laminar Air Flow*) yang telah dibersihkan dengan menyemprotkan alkohol 70%. LAF disterilkan dengan menyalakan lampu UV selama 1 jam. Eksplan yang digunakan pada penelitian ini adalah tunas anggrek *Vanda tricolor*. Eksplan yang telah dihomogenkan di dalam NDM0 dikeluarkan dengan menggunakan pinset. Eksplan diletakkan didalam cawan petri yang berisi aquadest steril dan betadine. Eksplan ditiriskan di atas cawan petri yang dilapisi dengan kertas saring. Eksplan kemudian ditanam pada masing-masing medium perlakuan. Setiap botol ditanam 1 eksplan anggrek *Vanda tricolor*, setelah itu botol ditutup rapat dengan aluminium foil dan pada bagian luar diikat dengan karet gelang, kemudian dilapisi dengan plastik wrap dan diberi label. Inokulasi multiplikasi eksplan pada lampiran 7f.

7. Inkubasi

Eksplan yang telah diinokulasi kemudian diletakkan di rak inkubasi dan diatur sesuai dengan *layout* rancangan perlakuan. Ruangan inkubasi menggunakan cahaya lampu neon (TL) yang dinyalakan selama 24 jam dengan kekuatan 44 watt. Suhu di dalam ruang inkubasi diatur antara 20°C - 28°C dengan menggunakan AC. Pemeliharaan dilakukan selama 2 bulan dihitung saat mulai penanaman. Rak-rak diruang inkubasi dibersihkan dengan menyemprotkan alkohol 70%.

8. Pengamatan

Pengamatan dilakukan dari awal penanaman sampai dengan minggu ke-8 setelah tanam. Parameter yang diamati meliputi : Persentase eksplan hidup (%), persentase eksplan kontaminasi (%), Persentase eksplan *browning* (%), persentase eksplan vitrifikasi (%), pertambahan tinggi tunas (cm), waktu muncul tunas (minggu), pertambahan jumlah tunas, persentase eksplan bertunas (%), pertambahan jumlah daun (helai), warna daun, waktu muncul akar (minggu), pertambahan jumlah akar dan perkembangan eksplan. Tahapan penelitian yang dilakukan tersaji pada lampiran 5.

E. Parameter yang Diamati

1. Persentase Eksplan Hidup (%)

Persentase eksplan yang hidup dihitung setelah pengamatan selesai yaitu pada minggu ke-8. Perhitungan dilakukan dengan melihat jumlah eksplan yang hidup dengan ciri-ciri; eksplan berwarna hijau, tidak terkontaminasi, tidak *browning* dan tidak mengalami vitrifikasi. Persentase eksplan hidup dinyatakan dalam persen dan dihitung dengan rumus:

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

2. Persentase Kontaminasi (%)

Persentase eksplan kontaminasi dilihat dari jumlah eksplan yang mengalami kontaminasi oleh jamur dan bakteri. Pengamatan eksplan yang terkontaminasi dilakukan dengan cara mengamati secara langsung pada medium dan eksplan setiap satu minggu sekali selama 8 minggu kemudian dihitung dengan rumus :

$$\text{Persentase eksplan kontaminasi} = \frac{\text{Jumlah eksplan kontaminasi}}{\text{Jumlah total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

3. Persentase Eksplan *Browning* (%)

Pencoklatan pada eksplan diamati setiap satu minggu sekali sampai pada hari pengamatan terakhir pada minggu ke-8. Eksplan yang dihitung *browning* apabila mengalami pencoklatan lebih dari separuh. Persentase eksplan *browning* dinyatakan dalam persen dan dihitung dengan rumus:

$$\text{Persentase eksplan } \textit{browning} = \frac{\text{Jumlah eksplan } \textit{browning}}{\text{Jumlah total eksplan tiap perlakuan}} \times 100 \%$$

4. Persentase Eksplan Vitrifikasi (%)

Vitrifikasi pada eksplan diamati setiap satu minggu sekali sampai pada hari pengamatan terakhir pada minggu ke-8. Eksplan yang dihitung vitrifikasi apabila mengalami perubahan warna menjadi putih transparan lebih dari separuh. Persentase eksplan vitrifikasi dinyatakan dalam persen dan dihitung dengan rumus:

$$\text{Persentase eksplan vitrifikasi} = \frac{\text{Jumlah eksplan vitrifikasi}}{\text{Jumlah total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

5. Pertambahan Tinggi Tunas (cm)

Pengamatan tinggi eksplan dilakukan dengan cara mengukur tinggi eksplan menggunakan penggaris dimulai dari permukaan medium atau pangkal tunas sampai ujung daun atau titik tumbuh dengan satuan cm. Pengamatan dilakukan setiap satu minggu sekali selama 8 minggu, kemudian dihitung selisih dari tinggi tunas.

6. Waktu Muncul Tunas (minggu)

Waktu muncul tunas diamati setiap minggu. Penentuannya dengan menghitung jumlah tunas yang tumbuh dari minggu pertama sejak awal penanaman hingga minggu ke-8.

7. Pertambahan Jumlah Tunas

Jumlah tunas yang tumbuh merupakan tanda keberhasilan dari tahap multiplikasi, karena tujuan dari multiplikasi yaitu untuk menggandakan tunas. Jumlah tunas merupakan salah satu parameter penting yang menunjukkan pengaruh dari perlakuan. Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung jumlah tunas yang tumbuh pada masing-masing eksplan setiap satu minggu sekali selama 8 minggu, kemudian dihitung selisih dari jumlah tunas pada minggu ke-8 dikurangi jumlah tunas minggu pada ke-0.

8. Persentase Eksplan Bertunas (%)

Persentase eksplan bertunas dihitung setelah pengamatan selesai. Perhitungan dilakukan dengan menghitung pertambahan tunas baru pada eksplan, kemudian dinyatakan dalam persen untuk mengetahui pengaruh medium terhadap pertumbuhan tunas baru pada eksplan, dengan rumus:

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

9. Pertambahan Jumlah Daun (helai)

Pengamatan jumlah daun dilakukan dengan cara menghitung pertambahan jumlah daun pada eksplan. Pengamatan dilakukan setiap minggu sekali selama 8 minggu. Untuk menentukan keseluruhan pertambahan jumlah

daun yaitu dengan menghitung selisih pertambahan jumlah daun pada minggu ke-8, kemudian dikurangi jumlah daun minggu pada ke-0.

10. Warna Daun

Pengamatan jumlah daun dilakukan dengan cara mengamati perubahan warna pada daun eksplan dengan menggunakan *Munsell Plant Tissue color chart*. Pengamatan dilakukan setiap minggu sekali selama 8 minggu. Untuk hasil pengamatan warna daun dilakukan dengan cara skoring (Tabel 1).

Tabel 1. Warna daun *Vanda tricolor* pada 8 MST

Kriteria Warna Daun	Warna Daun	Skor
5 <i>Green Yellow</i>		5
2,5 <i>Green Yellow</i>		4
5 <i>Yellow</i>		3
2,5 <i>Yellow</i>		2
7,5 <i>Yellow Red</i>		1

11. Waktu Muncul Akar (minggu)

Waktu muncul akar diamati pada setiap minggu. Penentuannya dengan menghitung dari minggu pertama sejak awal penanaman hingga muncul akar pertama pada eksplan.

12. Pertambahan Jumlah Akar

Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung jumlah akar yang tumbuh pada masing-masing eksplan setiap satu minggu sekali selama 8 minggu. Untuk menentukan keseluruhan pertambahan jumlah akar yaitu

dengan menghitung selisih pertambahan jumlah akar pada minggu ke-8, kemudian dikurangi jumlah akar pada minggu ke-0.

13. Persentase Eksplan Berakar (%)

Persentase eksplan bertunas dihitung setelah pengamatan selesai. Perhitungan dilakukan dengan menghitung pertambahan tunas baru pada eksplan, kemudian dinyatakan dalam persen untuk mengetahui pengaruh medium terhadap pertumbuhan tunas baru pada eksplan, dengan rumus:

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

14. Perkembangan Eksplan

Pengamatan perkembangan eksplan dilakukan dengan cara mengamati eksplan dibawah Mikroskop Stereo SZM45 B2 + *Optilab advance* pada 4 MST dan 8 MST. Eksplan yang diamati diambil dari 1 perwakilan pada setiap perlakuan. Pengamatan dilakukan dengan cara mengambil eksplan didalam botol dengan pinset steril, kemudian eksplan ditiriskan dengan menggunakan kertas saring didalam petridish. Setelah ditiriskan eksplan dipindahkan ke dalam petridish kosong untuk dilakukan pengamatan. Petridish yang berisi eksplan ditaruh dibawah mikroskop kemudian diatur perbesarannya. Perbesaran yang digunakan yaitu 0,7 dan 0,8.

F. Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini akan dianalisis menggunakan sidik ragam Analisis of Variance (ANOVA) dengan taraf nyata $\alpha=5\%$. Apabila terdapat pengaruh yang signifikan dari perlakuan yang diujikan, maka dilakukan uji

lanjutan dengan menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan taraf $\alpha=5\%$. Hasil dari analisis akan ditampilkan dalam bentuk grafik atau histogram.