

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur *in vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan Desember 2018 – Februari 2019.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari eksplan tunas steril angrek *Vanda tricolor*, medium MS, Pupuk Daun, Pupuk organik cair, clorox, alkohol 70%, spiritus, tisu, plastik kaca, karet gelang, kertas saring, aluminium foil, akuades, ZPT TDZ, dan ekstrak Jagung muda.

Alat penelitian yang digunakan meliputi: botol kultur, lampu Bunsen, Autoklaf, LAF, pinset, plastik wrap, petridish, pisau, *scalpel*, pinset, *erlenmayer*, blender, aluminium *foil*, alat pengukur yaitu pH stik, gelas ukur, pipet ukur, *stirer*, oven, plastic, sprayer, timbangan analitik, *wheaton unisperse*, peralatan glassware, dan Mikroskop Stereo SZM45 B2

C. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan metode eksperimen di laboratorium dengan rancangan percobaan faktor tunggal, yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap sebanyak 6 perlakuan yaitu kombinasi macam medium (Pupuk daun 3g/L; POC 3ml/L dan MS 4,43g) serta macam sitokinin (*Thidiazuron* 2mg/L, ekstrak jagung muda 100ml/L) dan semua perlakuan di tambahkan arang aktif 0,2 g/L

A : Pupuk daun 3g/L + TDZ (*Thidiazuron*) 2mg/L

B : Pupuk daun 3g/L + Ekstrak jagung muda 100ml/L

C : Pupuk Organik Cair 3ml/L + TDZ (*Thidiazuron*) 2mg/L

D : Pupuk Organik Cair 3ml/L + Ekstrak jagung muda 100ml/L

E : Medium MS 4,43g + TDZ (*Thidiazuron*) 2mg/L

F : Medium MS 4,43g + Ekstrak Jagung muda 100ml/L

Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali, setiap ulangan terdiri dari 3 sampel, setiap sampel terdiri dari 1 eksplan sehingga total unit perlakuan sebanyak 54 botol (*lay out* di lampiran I).

D. Cara Penelitian

1. Sterilisasi alat

Sterilisasi alat dilakukan dengan dua metode yaitu metode sterilisasi basah dan bakar. Sterilisasi basah dilakukan untuk botol kultur, gelas piala, cawan petri, erlenmeyer, pinset, dan pipet. Alat-alat tersebut dibungkus dengan kertas payung kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf dengan tekanan 1 atm selama 60 menit dengan suhu 121⁰C. Sterilisasi bakar dilakukan dalam *Laminar Air Flow* (LAF) sebelum proses penanaman dengan memasukkan alat (skalpel, gunting, pinset) ke dalam alkohol 70% kemudian dibakar di atas lampu bunsen (lampiran VIa).

2. Pembuatan stok ZPT

a. *Thidiazuron*

Thidiazuron merupakan senyawa kimia yang mempunyai sifat termolabil, yaitu senyawa yang mampu bekerja pada suhu tertentu dan akan mengalami penurunan kualitas dan rusak pada suhu tinggi, sehingga penggunaan *Thidiazuron* sebaiknya dilakukan menggunakan *Millipore* agar

cendawan penyebab kontaminasi tersaring dan aplikasinya dilakukan di LAF.

Untuk mendapatkan konsentrasi TDZ sesuai dengan perlakuan, maka harus dilakukan pengenceran terlebih dahulu. Rumus dasar yang biasa digunakan dalam mengencerkan TDZ adalah 10 mg TDZ dilarutkan dalam 100 ml aquades steril, sehingga rumus kebutuhan untuk setiap ulangan adalah :

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

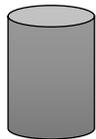
b. Pembuatan Ekstrak Jagung Muda

Membuat ekstrak jagung muda dengan cara memblender jagung muda hingga menjadi ekstrak kemudian diambil sesuai perlakuan yaitu 100ml/L untuk 200 ml larutan.

3. Pembuat medium pada setiap perlakuan

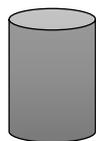
Medium dibuat sebanyak 180 ml yang dibulatkan menjadi 200 ml setiap perlakuan dalam satu erlenmeyer, dalam satu botol berisi 20 ml medium dan ZPT, masing – masing perlakuan digunakan untuk 9 botol kultur (lampiran IVb). Setiap satu erlenmeyer disesuaikan dengan setiap perlakuan yang berisi medium MS, POC , Pupuk daun , *Thidiazuron*, Ekstrak jagung muda, *sukrosa*, phytigel, ppm, arang aktif, dan aquadest. Berikut merupakan perlakuan yang akan dilakukan:

- a. A : Pupuk daun 3gr/L + TDZ (*Thidiazuron*) 2mg/L (+arang aktif 0,2 gr/L)



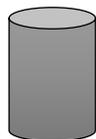
Dalam satu medium terdiri dari : 20 ml aquades + Pupuk daun 0,6 g + sukrosa 6 g + vitamin 2 ml + *mio inositol* 2 ml + ppm 0,1 ml + arang aktif 0,04 g lalu di cairkan dengan aquades sampai volume 180 ml + cek dan sesuaikan pH menggunakan pH stik hingga mencapai pH 6 + Agar 1,4 g + tambahkan aquades hingga mencapai volume 196 ml lalu panaskan hingga homogen dan mendidih, setelah itu di autoklaf selama 1 jam. TDZ ditambahkan dengan menggunakan *milipore* di LAF sebanyak 4 ml. Kemudian digunakan untuk 9 unit percobaan sebanyak 20 ml perbotol.

- b. B : Pupuk daun 3gr/L + Ekstrak Jagung muda 100g/L (+arang aktif 0,2 gr/L)



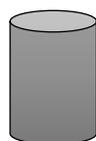
Dalam satu medium terdiri dari : 20 ml aquades + Pupuk daun 0,6 g + sukrosa 6 g + ekstrak jagung muda 20 ml + vitamin 2 ml + *mio inositol* 2 ml + ppm 0,1 ml + arang aktif 0,04 g lalu di cairkan dengan aquades sampai volume 180 ml + cek dan sesuaikan pH menggunakan pH stik hingga mencapai pH 6 + Agar 1,4 g + tambahkan aquades hingga mencapai volume 200 ml lalu panaskan hingga homogen dan mendidih. Kemudian digunakan untuk 9 unit percobaan sebanyak 20 ml perbotol lalu di autoklaf selama 1,5 jam.

- c. C : Pupuk Organik Cair 3mg/l + TDZ (Thidiazuron) 2mg/L (+arang aktif 0,2 gr/L)



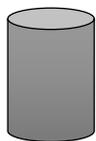
Dalam satu medium terdiri dari : 20 ml aquades + Pupuk organik cair 0,6 ml + sukrosa 6 g + vitamin 2 ml + *mio inositol* 2 ml + ppm 0,1 ml + arang aktif 0,04 g lalu di cairkan dengan aquades sampai volume 180 ml + cek dan sesuaikan pH menggunakan pH stik hingga mencapai pH 6 + Agar 1,4 g + tambahkan aquades hingga mencapai volume 196 ml lalu panaskan hingga homogen dan mendidih, setelah itu di autoklaf selama 1,5 jam. TDZ ditambahkan dengan menggunakan *milipore* di LAF sebanyak 4 ml. Kemudian digunakan untuk 9 unit percobaan sebanyak 20 ml perbotol.

- d. D : Pupuk Organik Cair 3mg/l + Ekstrak Jagung muda 100g/L (+arang aktif 0,2 gr/L)



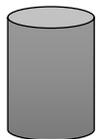
Dalam satu medium terdiri dari : 20 ml aquadest + Pupuk daun 0,6 g + sukrosa 6 g + ekstrak jagung muda 20 ml + vitamin 2 ml + *mio inositol* 2 ml + ppm 0,1 ml + arang aktif 0,04 g lalu di cairkan dengan aquades sampai volume 180 ml + cek dan sesuaikan pH menggunakan pH stik hingga mencapai pH 6 + Agar 1,4 g + tambahkan aquades hingga mencapai volume 200 ml lalu panaskan hingga homogen dan mendidih. Kemudian digunakan untuk 9 unit percobaan sebanyak 20 ml perbotol lalu di autoklaf selama 1,5 jam.

e. E : Medium MS + TDZ (Thidiazuron) 2mg/L (+arang aktif 0,4 gr/L)



Dalam satu medium terdiri dari : 20 ml aquades + Medium MS 0,886 g + sukrosa 6 g + ppm 0,1 ml + arang aktif 0,04 g lalu di cairkan dengan aquades sampai volume 180 ml + cek dan sesuaikan pH menggunakan pH stik hingga mencapai pH 6 + Agar 1,4 g + tambahkan aquades hingga mencapai volume 196 ml lalu panaskan hingga homogen dan mendidih, setelah itu di autoklaf selama 1 jam. TDZ ditambahkan dengan menggunakan *milipore* di LAF sebanyak 4 ml. Kemudian digunakan untuk 9 unit percobaan sebanyak 20 ml perbotol.

f. F : Medium MS + Ekstrak Kecambah 150g/L (+arang aktif 0,4 gr/L)



Dalam satu medium terdiri dari : 20 ml air + Medium MS 0,886 g + sukrosa 6 g + ppm 0,1 ml + arang aktif 0,04 g lalu di cairkan dengan aquades sampai volume 180 ml + cek dan sesuaikan pH menggunakan pH stik hingga mencapai pH 6 + Agar 1,4 g +lalu dimasukan dalam gelas ukur + tambahkan aquades hingga mencapai volume 196 ml lalu di autoklaf. TDZ ditambahkan dengan menggunakan *milipore* di LAF sebanyak 4ml. Kemudian digunakan untuk 9 unit percobaan sebanyak 20 ml perbotol.

4. **Penanaman**

a. Persiapan eksplan

Eksplan yang ditanam adalah eksplan tunas Anggrek yang telah diseleksi dan diambil dari tanaman induk yang sehat. Eksplan tersebut disubkultur ke dalam medium MS 0 dahulu yang berfungsi menghomogenkan eksplan. Setelah inkubasi dalam medium MS 0 selama 1 minggu eksplan siap digunakan.

b. Inokulasi eksplan

Penanaman dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* secara aseptik dan steril. Sebelum ditanam, terlebih dahulu dilakukan pemilihan eksplan. Eksplan yang digunakan adalah eksplan seragam. Kemudian, eksplan ditanam di dalam botol medium sesuai perlakuan. Setiap satu botol berisi satu eksplan. Setelah selesai ditanam, botol kultur diberi label sesuai perlakuan diberi label sesuai perlakuan dan tanggal penanaman. Selanjutnya botol kultur disimpan pada rak kultur diruang penyimpanan/inkubasi (lampiran IVc).

5. **Inkubasi**

Proses inkubasi dimulai dengan mensterilkan rak-rak inkubasi dengan menyemprotkan alkohol 70% dan dilap dengan kain bersih. Suhu mang inkubasi kultur antara 24-27⁰C dan kelembaban berkisar 70% serta intensitas cahaya 1000 lux selama 24 jam setiap harinya. Botol-botol diletakkan secara acak kemudian diamati pertumbuhannya sesuai dengan parameter pengamatan yang telah ditentukan.

6. Pengamatan

Pengamatan dilakukan selama delapan (8) minggu dengan variabel pengamatan pertumbuhan perkembangan tunas Anggrek *Vanda tricolor*.

E. Parameter yang diamati

a. Keberhasilan Hidup

1. Persentase eksplan hidup (%)

Jumlah eksplan yang hidup dihitung setiap minggu. Kriteria eksplan hidup apabila warna hijau atau tumbuh tunas pada eksplan.

Rumus:

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

2. Persentase eksplan kontaminasi (%)

Eksplan yang terkontaminasi dihitung setiap minggu, eksplan dikatakan terkontaminasi apabila terdapat pertumbuhan jamur dan bakteri.

Rumus:

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

3. Persentase eksplan *Browning* (%)

Eksplan yang mengalami pencoklatan atau *browning* dihitung setiap minggu, kriteria eksplan *browning* apabila pencoklatan pada eksplan lebih dari separuh eksplan.

Rumus :

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

4. **Persentase eksplan vitrifikasi (%)**

Pengamatan dilakukan dengan melihat eksplan yang mengalami vitrifikasi. Eksplan yang dikategorikan vitrifikasi apabila eksplan tersebut mengalami kehilangan klorofil dan tampak transparan yang disebabkan oleh kandungan air yang tinggi dalam jaringan eksplan.

Rumus:

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

b. **Perkembangan Kalus**

1. **Persentase eksplan berkalus (%)**

Kalus merupakan sekumpulan sel amorphous yang terbentuk dari pembelahan sel tanaman yang dirangsang oleh zat pengatur tumbuh pada suatu medium secara *in vitro*. Pengamatan dilakukan dengan melihat kalus yang terbentuk pada eksplan.

Rumus:

$$\text{Persentase Eksplan Berkalus} = \frac{\sum \text{Eksplan Berkalus}}{\sum \text{Eksplan Tiap Perlakuan}} \times 100\%$$

2. **Pengamatan Pertumbuhan Tunas**

Pengamatan pertumbuhan tunas menggunakan Mikroskop Stereo SZM45 B2 + Optilab advance. Pengamatan perkembangan tunas bertujuan untuk mengetahui perkembangan kalus, perkembangan tunas, pembesaran tunas, pertumbuhan tunas, dan akar. Pengamatan ini dilakukan pada minggu ke-0, minggu ke-4, dan minggu ke-8 setelah tanam (lampiran IVd).

c. **Pertumbuhan Tunas**

1. **Tinggi Tunas**

Pengamatan yang dilakukan setiap satu minggu sekali selama 8 minggu dengan mengamati tinggi eksplan yang tumbuh pada masing-masing eksplan. Tinggi eksplan diukur dari pangkal medium tanaman sampai pada daun yang paling tinggi.

2. **Pertumbuhan Jumlah Daun**

Pengamatan dilakukan pada tiap botol dengan menghitung jumlah daun yang terbentuk. Pengamatan dilakukan satu minggu sekali selama 8 minggu. Kriteria daun yang dihitung adalah daun yang sudah membuka.

3. **Warna daun**

Warna daun diamati setiap seminggu sekali selama 8 minggu, dengan mengamati visual warna daun menggunakan Munsell *Plant Tissue Colour Chart 5 G/Y (Green/Yellow)*.

F. **Analisis Data**

Data hasil pengamatan akan dianalisis menggunakan sidik ragam (*Analysis of Variance*) pada taraf kesalahan $\alpha = 5\%$, apabila ada beda nyata antar perlakuan yang diujikan maka dilakukan uji lanjutan dengan menggunakan DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) pada jenjang $\alpha 5\%$.