

### **III. TATA CARA PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei sampai dengan Agustus 2014. Tempat percobaan adalah di Laboratorium Kultur *In-Vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

#### **B. Bahan dan Alat**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu eksplan anggrek Merapi (*Vanda tricolor* Lindl.) varietas *suavis*, medium MS, medium NDM, Sukrosa, PPM, Kapas steril, *gellan gum*, alkohol 70% dan aquades.

Alat yang digunakan yaitu sebagai berikut: *Hot Plate Magnetic Stirer* untuk mengaduk larutan stok dan medium hingga homogen; timbangan analitik untuk menimbang bahan-bahan dalam penelitian; pH stik untuk mengukur pH pada larutan stok dan medium; *timer* untuk mengukur waktu; *aluminium foil* sebagai penutup botol kultur (medium); *dissecting kits*; *autoclave* untuk mensterilkan medium dan alat yang akan digunakan dalam penelitian. Peralatan gelas yang digunakan yaitu *petridish*, botol kultur sebagai tempat untuk menumbuhkan eksplan, gelas ukur untuk mengukur banyaknya larutan yang dibutuhkan dalam pembuatan medium stok dan medium perlakuan, pipet tetes untuk mengambil larutan dalam jumlah yang sedikit, pinset untuk mengambil eksplan dalam botol sub kultur, *Laminar Air Flow* (LAF) sebagai tempat

melakukan kegiatan penanaman dan sub kultur, lampu Bunsen untuk sterilisasi pada saat penanaman dan sub kultur eksplan.

### **C. Metode Penelitian**

Metode penelitian yang digunakan yaitu metode percobaan faktor tunggal dengan enam (6) perlakuan dan disusun dalam Rancangan Acak Lengkap. Setiap perlakuan terdiri dari 15 ulangan, setiap ulangan terdiri dari satu sampel, sehingga jumlah keseluruhan sebanyak 90 unit

Perlakuan :

1. M1Z0 = Medium  $\frac{1}{2}$  MS + 0 mg/l Thidiazuron (kontrol)
2. M1Z1 =  $\frac{1}{2}$  MS + 0,5 mg/l Thidiazuron
3. M1Z2 =  $\frac{1}{2}$  MS + 1 mg/l Thidiazuron
4. N1Z0 = Medium NDM + 0 mg/l Thidiazuron (kontrol)
5. N1Z1 = NDM + 0,5 mg/l Thidiazuron
6. N1Z2 = NDM + 1 mg/l Thidiazuron

### **D. Analisis Data**

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan sidik ragam pada taraf  $\alpha$  5%. Apabila terdapat beda nyata dilanjutkan dengan Uji Berjarak Ganda Duncan dengan  $\alpha$  5% dan apabila data yang diperoleh tidak signifikan serta tidak dapat diolah maka analisis yang dilakukan adalah analisis dengan metode kualitatif dengan menggunakan metode deskriptif.

## **E. Cara Penelitian**

### **a. Sterilisasi**

Sterilisasi dilakukan dengan dua cara, yaitu sterilisasi basah/uap air yang bertekanan dan sterilisasi bakar. Sterilisasi basah dengan tekanan dilakukan dengan memasukkan alat-alat yang telah dibungkus dengan kertas payung di autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  bertekanan 1 atm selama 30 menit. Alat-alat yang disterilkan antara lain: botol-botol kultur, pinset, scalpel, aluminium foil, petridish, dan Erlenmeyer. Sterilisasi bakar digunakan lampu spiritus yang dilakukan di LAF. Cara yang digunakan yaitu dengan mencelupkan dahulu alat yang digunakan dalam alkohol 70% kemudian membakar pada lampu spiritus. Alat yang dibakar yaitu pinset dan skalpel yang berfungsi pada saat penanaman eksplan.

Penyeterilan LAF dilakukan dengan menyemprotkan alkohol 70% ke seluruh permukaan kemudian dilap hingga kering dan dinyalakan lampu UV selama satu jam sebelum LAF digunakan.

### **b. Pembuatan Medium**

Pembuatan medium dilakukan sesuai dengan jenis medium yang akan dibuat. Proses pembuatan medium ini dilakukan dengan mengambil stok makro dan mikro masing-masing sesuai dengan takaran yang dibutuhkan, kemudian ditambahkan sukrosa sesuai takaran yang diperlukan, kemudian pH diukur sehingga menunjukkan pH 6 yang dibutuhkan oleh tanaman. Setelah selesai, aquadest steril dimasukkan ke dalam erlenmeyer, di tambahkan agar dan

kemudian dipanaskan. Setelah dipanaskan medium dituang ke dalam botol kultur.

#### 1. Medium ½ MS

Medium dibuat sebanyak 900 ml untuk 3 perlakuan, setiap perlakuan sebanyak 300 ml, masing – masing perlakuan digunakan 15 botol kultur. Setiap botol kultur diisi sebanyak 20 ml medium ½ MS.

Bahan – bahan yang dibutuhkan untuk 300 ml medium (medium satu perlakuan) yaitu: ½ makro(4,33 g/l) 0,649 g ; stok mikro (6 ml/l) 0,9 ml; stok vitamin (1ml/l) 0,3 ml; stok Fe (10 ml/l) 3 ml; stok mio inositol (10ml/l) 3 ml; sukrosa (30 g/l) 9 g ; *gellan gum* (3 g/l) 0,9 g ; stok 2,4-D sesuai perlakuan 0,5 mg/l secara keseluruhan, dan Thidiazuron sesuai perlakuan yaitu 0 (tanpa Thidiazuron), 0,5 mg/l, dan 1 mg/l. Pemberian Thidiazuron dilakukan di dalam LAF dengan menggunakan *millipore* steril untuk mencegah terjadinya kontaminasi.

#### 2. Medium NDM

Pembuatan medium NDM dilakukan seperti halnya pembuatan medium ½ MS yaitu medium dibuat sebanyak 600 ml yang terbagi menjadi 3 perlakuan, setiap perlakuan sebanyak 200 ml, masing – masing perlakuan digunakan 10 botol kultur. Setiap botol kultur diisi sebanyak 20 ml medium NDM.

Bahan – bahan yang dibutuhkan untuk 300 ml medium (medium satu perlakuan) yaitu: stok makro (10 ml/l) 2 ml ; stok mikro(1 ml/l) 0,3 ml; stok vitamin (1ml/l) 0,3 ml; stok Fe-EDTA (10 ml/l) 3ml; *gellan gum*

(3g/l) 0,9 g; stok 2,4-D sesuai perlakuan 0,5 mg/l secara keseluruhan dan Thidiazuron sesuai perlakuan yaitu 0 (tanpa Thidiazuron), 0,5 mg/l, dan 1 mg/l. Seperti halnya pembuatan medium  $\frac{1}{2}$  MS, pemberian Thidiazuron dilakukan di dalam LAF dengan menggunakan *millipore* steril untuk mencegah terjadinya kontaminasi.

### c. Inokulasi

Inokulasi dilakukan di dalam LAF yang telah disterilkan yaitu dengan menyemprotkan alkohol 70% dan dikeringkan dengan tissue, kemudian LAF disterilkan dengan lampu UV yang dinyalakan 1 jam sebelum penanaman. Inokulasi dilakukan dengan cara daun dikeluarkan dari botol hasil kultur *In vitro* dengan menggunakan pinset, setelah itu daun dipisahkan satu persatu dengan menggunakan *scalpel*. Kemudian daun yang memiliki bentuk yang hampir sama diambil dan dipotong dengan ukuran 2 cm dengan menggunakan *scalpel*. Eksplan yang akan dikulturkan ke dalam medium tanam diletakkan di Petridis yang berisi aquadest steril dan betadin, eksplan dikeringkan di petridis yang dialasi kertas saring. Kemudian eksplan ditanam ke dalam botol medium sesuai dengan perlakuan, setiap botol kultur terdiri dari satu eksplan.

### d. Pemeliharaan

Botol-botol yang sudah ditutup dengan aluminium foil segera diletakkan di rak-rak ruang inkubasi. Ruang inkubasi menggunakan cahaya lampu neon (TL) sebagai pengganti sinar matahari dengan kekuatan 40 watt

yang dinyalakan selama 24 jam. Suhu ruangan diatur menggunakan AC yang bersuhu 20-28<sup>0</sup> C. Pemeliharaan dilakukan selama dua (2) bulan terhitung setelah penanaman (inokulasi).

Rak-rak yang berada di ruang inkubasi dibersihkan dengan menyemprotkan alkohol 70%.

#### e. Pengamatan

Pengamatan dilakukan selama delapan (8) minggu dengan variabel pengamatan pertumbuhan yaitu: Persentase eksplan berkalus, persentase eksplan hidup, persentase *browning* dan persentase vitrifikasi.

### F. Parameter Pengamatan

#### 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.

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

#### 2. Persentase Eksplan Hidup (%)

Eksplan dapat dikatakan hidup apabila eksplan tersebut berwarna hijau, tidak mengalami kontaminasi, dan warna coklat kurang dari separuh. Persentase eksplan yang hidup dihitung pada akhir pengamatan dan dihitung menggunakan rumus.

$$\text{Persentase Eksplan Hidup} = \frac{\text{Jumlah Eksplan Hidup}}{\text{Jumlah Total Eksplan Tiap Perlakuan}} \times 100\%$$

### 3. Persentase Eksplan *Browning* (%)

Eksplan mengalami pencoklatan dihitung setiap minggu selama delapan minggu. Eksplan dikatakan *browning* apabila mengalami pencoklatan lebih dari separuh. Perhitungan eksplan *browning* dilakukan dengan menggunakan rumus.

$$\text{Persentase } *Browning* = \frac{\text{Jumlah Eksplan } *Browning*}{\text{Jumlah Total Eksplan Tiap Perlakuan}} \times 100\%$$

### 4. Persentase Eksplan Vitrifikasi (%)

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

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