

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

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

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur *In Vitro* Fakultas Pertanian UMY di Jl. Lingkar Selatan, Tamantirto, Kasihan, Bantul Daerah Istimewa Yogyakarta. Waktu penelitian dimulai pada bulan Januari sampai April 2018.

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

Bahan yang digunakan adalah *Protocorm Like Bodies* (PLB) anggrek *Vanda tricolor*, medium dasar *New Dogashima Medium* (NDM), NAA, PPM (*Plant Preservative Mixture*), Phytigel, arang aktif, alkohol 70 %, aquades, sukrosa, kertas pH meter, Zat Pengatur Tumbuh seperti BAP, TDZ, Kinetin.

Alat yang digunakan pinset, pisau, gunting, gelas ukur, erlenmeyer, labu takar, *petridish*, pipet tetes, pengaduk, karet, aluminium foil, cawan timbang, kertas saring/payung, syringe/jarum, pembagi media (Integra), botol sprayer, *milliphore*, lampu spritus. Peralatan gelas yang akan dipakai dicuci bersih dengan deterjen, kemudian disterilisasi selama 60 menit dengan autoklaf.

#### **C. Metode Penelitian**

Penelitian dilakukan menggunakan metode percobaan faktor tunggal yang disusun dalam rancangan acak lengkap (RAL). Tiap perlakuan terdiri dari 10 ulangan sehingga total 70 unit, dengan masing-masing perlakuan ditambahkan NAA 0,5 mg/L dan Arang aktif 0,2 g/L serta (*Plant Preservative Mixture*) PPM

0,5 mL/L ke dalam medium NDM. Perlakuan yang diuji meliputi tanpa ZPT, BAP 0,5 mg/L, BAP 1 mg/L, TDZ 0,5 mg/L, TDZ 1 mg/L, Kinetin 0,5 mg/L, Kinetin 1 mg/L.

#### **D. Cara Penelitian**

##### **1. Sterilisasi Alat**

Semua peralatan yang digunakan dalam kultur *in vitro* harus dalam kondisi steril. Sterilisasi dilakukan dengan cara mencuci semua peralatan yang digunakan, kemudian dikeringkan. Setelah itu, peralatan seperti pinset, cawan petri, erlenmeyer, *scalpel*, gelas ukur dan botol kultur dan *dissecting kits* dibungkus rapi dengan kertas lalu disterilkan dengan autoklaf selama 20 menit dengan tekanan 1 atmosfer ( suhu 121 °c ).

##### **2. Pembuatan Medium**

Pembuatan medium NDM dibuat sebanyak 1400 mL untuk 7 perlakuan, setiap perlakuan sebanyak 200 mL, masing-masing perlakuan digunakan 10 botol kultur. Setiap botol kultur diisi sebanyak 20 mL medium.

Bahan-bahan yang dibutuhkan untuk 200 mL, medium NDM 0,392 g, Phytigel 0,5 g, sukrosa 6 g, PPM 0,1 mL, Arang aktif 0,2 g/L dan masing-masing Zat Pengatur Tumbuh dengan konsentrasi 1 mg/L yaitu BAP 2 mL, TDZ 2 mL, Kinetin 2 mL, sedangkan konsentrasi 0,5 mg/L yaitu BAP 1 mL, TDZ 1 mL, Kinetin 1 mL. Setelah medium di autoklaf, medium yang diberi perlakuan TDZ harus dibawa ke dalam LAF, karena Zat Pengatur Tumbuh ini

tidak tahan terhadap suhu panas, pemberian TDZ dilakukan dengan menggunakan *milliphore* steril untuk mencegah terjadinya kontaminasi.

Pembuatan stok ZPT dengan cara menimbang masing-masing ZPT sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 100 mL aquades steril dan masing-masing ZPT dilarutkan, BAP dan Kinetin dilarutkan dengan HCl, NAA dan TDZ dilarutkan dengan KOH serta diberi pelabelan pada botol stok 1 mg ZPT sama dengan 10 mL.

### 3. Penanaman Eksplan

Eksplan yang digunakan adalah eksplan steril yang berasal dari *Protocorm Like Bodies* (PLB) anggrek *Vanda tricolor*. Penanaman eksplan dilakukan dalam *Laminar Air Flow Cabinet* dengan kondisi aseptik atau steril. Sebelum ditanam, terlebih dahulu dilakukan pemilihan eksplan. Eksplan yang digunakan adalah eksplan yang seragam dan sama besar setelah itu eksplan ditanam ke dalam botol media sesuai perlakuan. Setiap botol berisi satu eksplan. Setelah selesai ditanam, botol kultur diberi label sesuai perlakuan dan tanggal penanaman. Selanjutnya botol kultur disimpan pada rak kultur di ruang pemeliharaan/inkubasi.

### 4. Inkubasi

Botol-botol yang sudah dilabeli dan ditanami segera diletakkan di rak-rak ruang inkubasi. Ruang inkubasi ini dilengkapi lampu neon (TL) dengan kekuatan 40 watt yang dinyalakan selama 24 jam sebagai pengganti sinar matahari. Suhu ruang inkubasi ini diatur menggunakan AC dengan suhu rata – rata 20-28°C. Sebelumnya, rak-rak yang berada di ruang inkubasi harus

dibersihkan dengan menyemprotkan alkohol 70%. Inkubasi dilakukan selama 8 minggu dimulai setelah inokulasi selesai.

## 5. Pengamatan

Pengamatan dilakukan dari awal penanaman sampai dengan minggu ke 8 setelah tanam. Parameter pengamatan yang diamati meliputi : persentase eksplan hidup (%), persentase eksplan kontaminasi (%), persentase eksplan *browning* (%), waktu muncul tunas, Mata Tunas, Jumlah tunas, persentase eksplan bertunas (%), jumlah tunas, Diameter PLB, waktu muncul akar, persentase eksplan berakar (%) dan waktu muncul daun (%).

### E. Parameter yang diamati

#### 1. Persentase eksplan hidup (%)

Eksplan yang hidup (eksplan yang tidak terkontaminasi dan tidak mengalami pencoklatan (*browning*) lebih dari separuh eksplan) diamati seminggu sekali selama 8 minggu. Persentase eksplan hidup dihitung di akhir pengamatan dengan rumus :

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

#### 2. Persentase eksplan terkontaminasi (%)

Eksplan yang terkontaminasi diamati seminggu sekali selama 8 minggu. Eksplan dikatakan terkontaminasi apabila ada jamur atau bakteri pada eksplan atau medium kultur tersebut. Persentase eksplan terkontaminasi rumus :

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

### 3. Persentasi eksplan *browning* (%)

Eksplan yang mengalami pencoklatan/*browning* diamati seminggu sekali selama 8 minggu, kriteria eksplan *browning* apabila pencoklatan pada eksplan lebih dari separuh eksplan. Persentase eksplan *browning* dapat dihitung dengan rumus :

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

### 4. Waktu muncul tunas

Waktu muncul tunas merupakan salah satu indikator pertumbuhan yang memperlihatkan sejauh mana eksplan merespon perlakuan yang diberikan. Waktu muncul tunas diamati setiap minggu. Penentuannya dengan menghitung dari minggu pertama sejak awal penanaman hingga muncul tunas pertama.

### 5. Jumlah mata tunas

Pengamatan dilakukan satu minggu sekali selama 8 minggu dengan mengamati mata tunas yang tumbuh pada masing-masing eksplan. Jumlah mata tunas yang diamati setiap minggu yakni benjolan berwarna hijau yang terdapat pada eksplan.

### 6. Jumlah tunas

Jumlah tunas merupakan faktor terpenting dalam multiplikasi tanaman pada kultur *in vitro*. Perhitungan jumlah tunas dilakukan pada keseluruhan tunas yang muncul pada eksplan. Jumlah tunas yang terbentuk diamati pada masing-masing botol, pengamatan dilakukan seminggu sekali selama 8 minggu.

#### 7. Waktu muncul daun

Waktu muncul daun diamati setiap minggu. Penentuannya dengan menghitung dari minggu pertama sejak awal penanaman hingga muncul daun pertama.

#### 8. Persentase eksplan bertunas (%)

Persentase eksplan bertunas dihitung setiap minggu. Perhitungan dilakukan dengan melihat penambahan tunas baru pada eksplan dan dinyatakan dalam persen untuk mengetahui pengaruh medium terhadap pertumbuhan tunas baru pada eksplan, dengan rumus :

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

#### 9. Diameter PLB

Diameter *Protocorm Like Bodies* (PLB) diukur pada setiap minggunya. Cara pengukurannya yaitu menempelkan penggaris ke dinding luar botol eksplan sebanyak tiga kali ulangan, kemudian diambil rata-ratanya. Diameter PLB diukur untuk mengetahui pengaruh dari media serta ZPT yang diberikan terhadap pertumbuhan ukuran eksplan.

#### 10. Waktu muncul akar

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

#### 11. 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 :

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

### **F. Analisis Data**

Hasil pengamatan kuantitatif dianalisis menggunakan sidik ragam (*Analysis of Variance Anova*), jika ada beda nyata antar perlakuan yang diujikan maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT).