

III. TATACARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur *In vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Waktu penelitian yaitu pada bulan Januari 2018 sampai dengan April 2018.

B. Alat dan Bahan Penelitian

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah PLB anggrek *Vanda tricolor*. PLB ini berasal dari biji anggrek *Vanda tricolor* yang sebelumnya telah disemai secara *in vitro*. Bahan lain yang digunakan adalah media MS, VW dan NDM, Zat Pengatur Tumbuh (TDZ dan NAA), *Plant Preservatif Mixture* (PPM), arang aktif, *Phytigel*, sukrosa, alkohol, aluminium foil, kertas payung, karet, HCl, KOH, plastik *wrap*, spirtus dan aquades steril.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi botol kultur, erlenmeyer, *petridish*, gelas ukur, *dissecting kits*, pH meter, timbangan analitik, *stirer*, *millipore*, pipet tetes, pembagi media, sendok, bunsen, cawan timbang, autoklaf, dan *Laminar Air Flow*.

C. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial (3x3) dengan 2 faktor. Faktor pertama adalah medium tumbuh yang terdiri dari 3 aras yaitu media MS (M1), media VW (M2), dan media NDM (M3). Faktor kedua adalah konsentrasi ZPT TDZ yang terdiri dari 3 aras yaitu 0 mg/l (T1), 0,5 mg/l (T2) dan 1 mg/l (T3)

disertai dengan penambahan NAA sebanyak 0,5 mg/l dan arang aktif sebanyak 0,2 g/liter pada setiap media. Jumlah eksplan per botol adalah 1 buah eksplan. Setiap kombinasi perlakuan diulang sebanyak 10 kali. PLB anggrek yang dibutuhkan sebanyak 90 buah. Kombinasi perlakuan disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan Jenis Media dan Konsentrasi Thidiazuron

ZPT	T1	T2	T3
MEDIA	TDZ 0 mg/l	TDZ 0,5 mg/l	TDZ 1 mg/l
MS (M1)	M1T1	M1T2	M1T3
VW (M2)	M2T1	M2T2	M2T3
NDM (M3)	M3T1	M3T2	M3T3

D. Cara Penelitian

1. Sterilisasi

Sterilisasi dilakukan dengan dua cara, yaitu sterilisasi basah dan sterilisasi bakar. Sterilisasi basah dilakukan dengan memasukkan alat-alat yang telah dibungkus dengan kertas payung di autoklaf pada suhu 121⁰C tekanan 1 atm selama 1 jam. Sterilisasi basah dilakukan pada alat – alat seperti botol kultur, pinset, scalpel, alumunium foil, *petridish*, dan erlenmeyer. Selain itu, sterilisasi basah juga dilakukan untuk mensterilkan media yang sudah dibuat dan aquades yang telah disuling.

Sterilisasi bakar dilakukan menggunakan spirtus. Sterilisasi ini dilakukan di dalam LAF. Caranya adalah dengan mencelupkan alat terlebih dahulu ke cairan alkohol 70%, kemudian membakar pada bunsen yang terisi larutan spirtus. Sterilisasi bakar dilakukan pada alat – alat seperti pinset dan scalpel yang digunakan saat penanaman eksplan. Sebelum digunakan, LAF juga harus

disterilisasi terlebih dahulu. Sterilisasi LAF ini dilakukan dengan menyemprotkan alkohol 70% pada seluruh permukaan, kemudian di lap dengan tisu kering, kemudian lampu UV dapat dinyalakan selama 15 menit sebelum LAF digunakan.

2. Pembuatan Media

1. Medium MS

Medium MS dibuat sebanyak 600 ml untuk 3 perlakuan, setiap perlakuan sebanyak 200 ml, masing – masing perlakuan digunakan 10 botol kultur. Setiap botol kultur diisi sebanyak 20 ml larutan medium MS.

Bahan bahan yang dibutuhkan untuk membuat 200 ml media MS adalah media MS bubuk = 0,88 g; sukrosa = 6 g; Phytigel = 0,5 g; PPM = 0,1 ml; arang aktif 0,04 g; NAA 0,5 mg/l (1 ml/200 ml larutan), aquades, serta Thidiazuron sesuai perlakuan, yaitu 0 (tanpa Thidiazuron), 0,5 mg/l (1 ml/200ml larutan), dan 1 mg/l (2 ml/200 ml larutan). Pemberian Thidiazuron dilakukan di dalam LAF dengan menggunakan *millipore* steril untuk mencegah terjadinya kontaminasi.

2. Medium VW

Medium VW dibuat sebanyak 600 ml untuk 3 perlakuan, setiap perlakuan sebanyak 200 ml, masing – masing perlakuan digunakan 10 botol kultur. Setiap botol kultur diisi sebanyak 20 ml larutan medium VW.

Bahan bahan yang dibutuhkan untuk membuat 200 ml media VW adalah media VW bubuk = 0,334 g; sukrosa = 6 g; Phytigel = 0,5 g; PPM = 0,1 ml; arang aktif 0,04 g; NAA 0,5 mg/l (1 ml/200 ml larutan), aquades, serta Thidiazuron sesuai perlakuan, yaitu 0 (tanpa Thidiazuron), 0,5 mg/l (1 ml/200ml larutan), dan

1 mg/l (2 ml/200 ml larutan). Pemberian Thidiazuron dilakukan di dalam LAF dengan menggunakan *millipore* steril untuk mencegah terjadinya kontaminasi.

3. Medium NDM

Medium NDM dibuat sebanyak 600 ml untuk 3 perlakuan, setiap perlakuan sebanyak 200 ml, masing – masing perlakuan digunakan 10 botol kultur. Setiap botol kultur diisi sebanyak 20 ml larutan medium NDM.

Bahan bahan yang dibutuhkan untuk membuat 200 ml media NDM adalah media NDM bubuk = 0,2 g; sukrosa = 6 g; Phytigel = 0,5 g; PPM = 0,1 ml; arang aktif 0,04 g; NAA 0,5 mg/l (1 ml/200 ml larutan), aquades, serta Thidiazuron sesuai perlakuan, yaitu 0 (tanpa Thidiazuron), 0,5 mg/l (1 ml/200ml larutan), dan 1 mg/l (2 ml/200 ml larutan). Pemberian Thidiazuron dilakukan di dalam LAF dengan menggunakan *millipore* steril untuk mencegah terjadinya kontaminasi.

3. Persiapan 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 :

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

4. Perlakuan

Perlakuan untuk menentukan total bahan yang dibutuhkan dilakukan dengan menghitung kebutuhan per ulangan. Satu erlenmeyer diisi dengan larutan sebanyak 200ml, yang telah berisi media, sukrosa, vitamin, Phytigel, ppm, NAA, TDZ, arang aktif dan aquades. Larutan yang telah tercampur kemudian dimasukkan ke dalam botol, masing – masing botol berisi 20 ml larutan. Berikut merupakan perlakuan yang akan diujikan :

a. M1T1



Aquades 50 ml (untuk melarutkan) + media MS + sukrosa + NAA, cek dan sesuaikan pH (pH normal = 6) + arang aktif + PPM + Phytigel + aquades hingga volume larutan menjadi 200 ml + 0 ml TDZ. Kemudian digunakan untuk satu kali ulangan (10 botol).

b. M1T2



Aquades 50 ml (untuk melarutkan) + media MS + sukrosa + NAA, cek dan sesuaikan pH (pH normal = 6) + arang aktif + PPM + Phytigel + aquades hingga volume larutan menjadi 199 ml + 1 ml TDZ. Kemudian digunakan untuk satu kali ulangan (10 botol).

c. M1T3



Aquades 50 ml (untuk melarutkan) + media MS + sukrosa + NAA, cek dan sesuaikan pH (pH normal = 6) + arang aktif + PPM + Phytigel + aquades hingga volume larutan menjadi 198 ml + 2 ml TDZ. Kemudian digunakan untuk satu kali ulangan (10 botol).

d. M2T1



Aquades 50 ml (untuk melarutkan) + media VW + sukrosa + NAA, cek dan sesuaikan pH (pH normal = 6) + arang aktif + PPM + Phytigel + aquades hingga volume larutan menjadi 200 ml + 0 ml TDZ. Kemudian digunakan untuk satu kali ulangan (10 botol).

e. M2T2



Aquades 50 ml (untuk melarutkan) + media vw + sukrosa + NAA, cek dan sesuaikan pH (pH normal = 6) + arang aktif + PPM + Phytigel + aquades hingga volume larutan menjadi 199 ml + 1 ml TDZ. Kemudian digunakan untuk satu kali ulangan (10 botol).

f. M2T3

Aquades 50 ml (untuk melarutkan) + media VW + sukrosa + NAA, cek dan sesuaikan pH (pH normal = 6) + arang aktif + PPM ++ Phytigel aquades hingga volume larutan menjadi



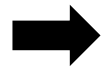
198 ml + 2 ml TDZ. Kemudian digunakan untuk satu kali ulangan (10 botol).

g. M3T1



Aquades 50 ml (untuk melarutkan) + media NDM + sukrosa + NAA, cek dan sesuaikan pH (pH normal = 6) + arang aktif + PPM + Phytigel + aquades hingga volume larutan menjadi 200 ml + 0 ml TDZ. Kemudian digunakan untuk satu kali ulangan (10 botol).

h. M3T2



Aquades 50 ml (untuk melarutkan) + media NDM + sukrosa + NAA, cek dan sesuaikan pH (pH normal = 6) + arang aktif + PPM + Phytigel + aquades hingga volume larutan menjadi 199 ml + 1 ml TDZ. Kemudian digunakan untuk satu kali ulangan (10 botol).

i. M3T3



Aquades 50 ml (untuk melarutkan) + media NDM + sukrosa + NAA, cek dan sesuaikan pH (pH normal = 6) + arang aktif + PPM + Phytigel + aquades hingga volume larutan menjadi 198 ml + 2 ml TDZ. Kemudian digunakan untuk satu kali ulangan (10 botol).

5. Penanaman

Penanaman eksplan dilakukan dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Peralatan tanam yang akan digunakan disemprot terlebih dahulu menggunakan alkohol 70%, termasuk botol media. Penanaman eksplan dilakukan dengan cara mengambil PLB dari botol semai yang tersedia, kemudian ditanam pada medium kultur yang telah dipersiapkan menggunakan pinset steril. Setiap satu botol diisi dengan satu buah PLB angrek. Botol yang sudah ditanami eksplan selanjutnya ditutup dengan aluminium foil, dikencangkan menggunakan karet gelang, dan dilapisi kembali dengan *plastic wrap*.

6. Inkubasi

Pada proses 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.

7. Pengamatan

Pengamatan dilakukan dari awal penanaman sampai dengan minggu ke-8 setelah tanam. Parameter pengamatan yang diamati meliputi : diameter PLB, persentase eksplan hidup (%), persentase eksplan *browning* (%), persentase eksplan kontaminasi (%), penambahan diameter PLB, waktu muncul tunas,

persentase eksplan bertunas (%), jumlah tunas, persentase eksplan berdaun (%), waktu muncul akar dan persentase eksplan berakar (%).

E. Parameter yang Diamati

1. Persentase Eksplan Hidup (%)

Persentase eksplan hidup dilihat dari jumlah eksplan yang hidup dan dihitung pada akhir pengamatan. Pengamatan ini dilakukan dengan cara melihat eksplan yang hidup (eksplan yang tidak terkontaminasi dan tidak mengalami pencoklatan atau *browning* >80%). Persentase eksplan hidup dinyatakan dalam persen untuk melihat tingkat adaptasi dari eksplan terhadap medium yang diberikan, dengan rumus:

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

2. Persentase Eksplan *Browning* (%)

Eksplan yang mengalami *browning* ditunjukkan dengan warna kecoklatan dengan skala >50% pada eksplan. Eksplan yang mengalami *browning* atau pencoklatan dihitung pada akhir pengamatan dengan menggunakan rumus :

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

3. Persentase Eksplan Kontaminasi (%)

Persentase eksplan kontaminasi dilihat dari jumlah eksplan yang terkontaminasi oleh bakteri maupun jamur dan dihitung pada akhir pengamatan. Eksplan yang terkontaminasi harus segera diambil. Persentase kontaminasi dihitung dengan rumus:

Persentase eksplan kontaminasi (%)

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

4. Pertambahan Diameter PLB

Diameter PLB diukur pada setiap minggunya. Cara pengukurannya yaitu menempelkan penggaris ke permukaan botol eksplan sebanyak tiga kali ulangan, dengan posisi penggaris berbeda-beda kemudian diambil rata – ratanya. Diameter PLB diukur untuk mengetahui pengaruh dari media serta ZPT yang diberikan terhadap pertumbuhan ukuran eksplan. Pengukuran pertambahan diameter PLB dilakukan dengan rumus :

Pertambahan diameter PLB

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

5. Waktu Muncul Tunas

Waktu muncul tunas merupakan salah satu indikator pertumbuhan yang memperlihatkan kecepatan tumbuh eksplan. Waktu muncul tunas diamati setiap minggu. Penentuannya dengan menghitung dari minggu pertama (awal penanaman) hingga muncul tunas pertama.

6. Persentase Eksplan Bertunas (%)

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

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

7. Jumlah Tunas

Jumlah tunas ini sangat penting diamati karena semakin banyak tunas yang terbentuk akan berpeluang mendapatkan bibit yang banyak pula. Jumlah tunas merupakan salah satu parameter penting yang dapat menunjukkan pengaruh perlakuan. Pada penelitian ini, jumlah tunas diamati pada setiap minggunya, dengan cara menghitung jumlah tunas yang muncul pada setiap planlet.

8. Persentase Eksplan Berdaun (%)

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

$$\begin{aligned} \text{Persentase eksplan berdaun (\%)} \\ = \frac{\sum \text{eksplan berdaun}}{\sum \text{total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\% \end{aligned}$$

9. Waktu Muncul Akar

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

10. 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

Hasil pengamatan kuantitatif dianalisis menggunakan sidik ragam atau *analysis of variance* (Annova) . Hasil penelitian dari berbagai perlakuan disajikan dalam bentuk grafik dan histogram.