

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur *In vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, pada Bulan November 2015 hingga Bulan April 2016.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah eksplan anggrek tebu (*Grammatophyllum speciosum*) dalam botol kultur berusia kurang lebih 12 bulan, MS (Murashige and Skoog), air leri, NAA, BAP, alkohol 70%, spirtus, *betadine* dan aquades. Sementara, alat-alat yang digunakan adalah timbangan analitik, pH stik, timer, alumunium foil, karet, plastik, sprayer, kertas payung, label, *dissecting kits*, autoklaf, petridish, botol kultur, gelas ukur, erlenmeyer, pipet tetes, pinset, pengaduk kaca, *Laminar Air Flow* (LAF), bunsen, penggaris dan *Munsell Color Chart*.

C. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode percobaan di laboratorium, menggunakan rancangan penelitian yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap faktor tunggal dengan 10 perlakuan dan 10 ulangan, sehingga total unit perlakuan adalah 100 botol. Perlakuan yang diujikan adalah konsentrasi air leri dan BAP:

A = aquadest + 0,5 mg/l BAP	F = aquadest + 1 mg/l BAP
B = 25% air leri + 0,5 mg/l BAP	G = 25% air leri + 1 mg/l BAP
C = 50% air leri + 0,5 mg/l BAP	H = 50% air leri + 1 mg/l BAP
D = 75% air leri + 0,5 mg/l BAP	I = 75% air leri + 1 mg/l BAP
E = 100% air leri + 0,5 mg/l BAP	J = 100% air leri + 1 mg/l BAP

Semua perlakuan menggunakan medium $\frac{1}{2}$ MS dan ditambahkan 0,1 mg/l NAA (Livi, dkk., 2014).

D. Cara Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi persiapan alat dan bahan, pembuatan medium, inokulasi, inkubasi, pengamatan dan analisis.

a. Persiapan alat dan bahan

Persiapan alat dan bahan dilakukan dengan mempersiapkan alat-alat dan bahan-bahan yang digunakan. Persiapan alat meliputi sterilisasi alat menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 30 menit. Sebelum dimasukkan ke autoklaf, alat-alat yang akan disterilisasi dibungkus terlebih dahulu dengan kertas payung. Persiapan bahan dilakukan dengan mempersiapkan eksplan dan bahan-bahan lainnya. Eksplan yang digunakan berupa tunas angrek tebu dari penelitian Livi, dkk (2014).

b. Pembuatan medium

- Penyiapan air leri

Untuk membuat air leri, beras dicuci dengan aquadest sesuai takaran yang telah ditentukan, yaitu 0,25 kg/l untuk konsentrasi 25% air leri, 0,50 kg/l untuk

50% air leri, 0,75 kg/l untuk 75% air leri dan 1 kg/l untuk 100% air leri. Selanjutnya air leri disaring dengan kertas saring menggunakan corong yang diletakkan di atas gelas ukur atau erlenmeyer. Setelah didapatkan air leri, selanjutnya dilakukan pembuatan larutan medium.

- Pembuatan medium perlakuan

Pembuatan medium dilakukan menggunakan medium $\frac{1}{2}$ MS dengan air leri sebagai pelarutnya pada berbagai macam konsentrasi. Bahan-bahan yang telah disiapkan kemudian ditimbang sesuai dengan kebutuhan medium. Untuk membuat 200 ml medium $\frac{1}{2}$ MS takaran yang digunakan adalah sebagai berikut: MS 0,4 g, stok mikro 2 ml (10 ml/l), Fe 2 ml (10 ml/l), vitamin MS 2 ml (10 ml/l), mio inositol 0,02 g, ppm 0,04 ml, sukrosa 6 g dan gellan gum 0,8 g. Bagan pembuatan terlampir pada lampiran 2.

MS, sukrosa, Fe, vitamin MS dan mio inositol dimasukkan ke erlenmeyer steril. Kemudian air leri dimasukkan ke erlenmeyer tersebut sesuai konsentrasi yang ditentukan dan dihomogenkan dengan menggoyangkan erlenmeyer tersebut. Selanjutnya pH diukur dengan pH stik, jika $\text{pH} < 6$ maka ditambahkan NaOH 1 N beberapa tetes dan jika $\text{pH} > 6$ maka ditambahkan HCl 1 N beberapa tetes. Gellan gum dimasukkan dengan menggoyangkan erlenmeyer dan diaduk supaya homogen. Selanjutnya, larutan tersebut dipanaskan hingga mendidih di dalam *microwave*. Sebelum dituang ke botol, medium ditambahkan PPM dan diaduk hingga rata. PPM atau *Plant Preservative Mixture* merupakan bahan pengawet/biosida spektrum luas yang sangat efektif untuk mencegah atau menurunkan tingkat kontaminasi mikroba pada kultur jaringan tumbuhan. Selain

menghambat kontaminasi dari udara, air dan kontak manusia, ppm juga dapat digunakan untuk mengurangi kontaminasi endogen. Larutan dituang ke botol sebanyak 20 ml tiap botol kemudian ditutup dengan plastik dan diikat dengan karet. Selanjutnya disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 20 menit. Setelah itu, medium disimpan di ruang inkubasi.

c. Inokulasi

1. Inokulasi untuk homogenisasi eksplan

Eksplan tunas anggrek tebu yang telah disiapkan kemudian dihomogenkan dengan cara ditanam pada medium MS0. Hal ini dilakukan supaya eksplan anggrek tidak terpengaruh oleh bahan-bahan dari medium sebelumnya dan diharapkan hanya dipengaruhi oleh medium yang diujikan. Inokulasi untuk homogenisasi dilakukan pada awal penelitian, kemudian setelah eksplan tumbuh di medium MS0 dilakukan inokulasi tahap kedua untuk multiplikasi eksplan di medium perlakuan.

2. Inokulasi untuk multiplikasi eksplan

Penanaman dilakukan dengan mengeluarkan eksplan yang ada di dalam botol pada medium MS0 menggunakan pinset. Eksplan yang digunakan pada penelitian ini adalah tunas anggrek tebu. Eksplan kemudian dipotong dari pangkal bawah batang hingga batang bagian tengah dengan ukuran ± 2 cm. Eksplan dipotong di dalam petridish yang berisi aquadest dan beberapa tetes betadin. Selanjutnya eksplan ditanam pada medium sesuai dengan perlakuan. Pada setiap botol ditanam satu eksplan tunas.

d. Inkubasi

Botol kultur yang telah ditanami kemudian diletakkan di rak inkubasi dan diatur sesuai rancangan perlakuan yang ada. Suhu ruang inkubasi kultur antara 24-27 °C dan kelembaban berkisar 70% serta intensitas cahaya 1000 lux selama 24 jam setiap harinya (Zulkarnain, 2009).

E. Parameter yang Diamati

Parameter yang diamati untuk mengetahui pengaruh penambahan air leri terhadap multiplikasi eksplan anggrek tebu, yaitu:

a. Persentase eksplan hidup (%)

Persentase eksplan hidup dihitung setelah selesai pengamatan. Perhitungan dilakukan dengan melihat jumlah eksplan yang hidup pada hari terakhir pengamatan dan dinyatakan dalam persen untuk melihat tingkat adaptasi dari eksplan terhadap medium yang diberikan, dengan rumus:

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

b. Persentase eksplan kontaminasi (%)

Persentase eksplan kontaminasi dilakukan dengan mengamati medium atau eksplan yang terkontaminasi dan diamati setiap hari berdasarkan penyebab kontaminasi baik berupa jamur ataupun bakteri dan dinyatakan dalam persen, dengan menggunakan rumus:

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

c. Persentase eksplan *browning* (%)

Persentase eksplan dihitung setelah selesai pengamatan. Perhitungan dilakukan dengan melihat jumlah eksplan yang mengalami pencoklatan pada bagian eksplan hingga mencakup 50% dari bagian eksplan selama pengamatan per minggu dan dinyatakan dengan persen untuk melihat pengaruh dari medium terhadap eksplan yang diinokulasi.

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

d. Persentase eksplan bertunas (%)

Persentase eksplan bertunas dihitung setelah selesai 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:

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

e. Tinggi tunas

Tinggi tunas diukur setiap minggu untuk seluruh eksplan menggunakan penggaris dengan satuan centimeter (cm). Hal ini dilakukan untuk melihat pengaruh dari medium terhadap pertambahan tinggi tunas.

f. Jumlah tunas

Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung jumlah tunas baru setiap minggunya, mulai dari hari penanaman eksplan hingga minggu ke-8 setelah tanam untuk melihat pertambahan tunas baru pada eksplan.

g. 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:

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

h. Jumlah akar

Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung jumlah akar baru per minggu, dari awal penanaman hingga minggu ke-8 setelah tanam untuk melihat pengaruh medium terhadap pertumbuhan dan perkembangan akar.

F. Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis menggunakan sidik ragam *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan taraf nyata $\alpha=5\%$. Apabila terdapat pengaruh yang signifikan dari perlakuan yang dicobakan, maka dilakukan uji lanjutan menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan taraf $\alpha=5\%$. Hasil analisis ditampilkan dalam bentuk grafik atau histogram.