

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

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

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium kultur *in vitro* Fakultas Pertanian UMY di Jl. Lingkar Selatan, Tamantirto, Kasihan, Bantul Daerah Istimewa Yogyakarta. Waktu penelitian dimulai pada bulan Desember 2018 sampai dengan Maret 2019.

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

Bahan yang digunakan adalah eksplan Tunas Anggrek *Vanda tricolor* dari *in vitro*. Medium yang digunakan yaitu medium New Dogashima Medium (NDM). Bahan lain yang digunakan adalah Zat pengatur tumnuh (2,4 D dan BAP), *Plant Preservatif Mixture* (PPM), arang aktif, *Phytigel*, sukrosa, alkohol, aluminium foil, kertas payung, karet, 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, *stirrer*, *millipore*, pipet tetes, pembagi media, sendok, bunsen, cawan timbang, autoklaf, *Laminar Air Flow*, Mikroskop.

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

Penelitian dilakukan menggunakan metode percobaan faktorial yang disusun dalam rancangan acak lengkap (RAL). Faktor pertama, konsentrasi ZPT 2,4 D yang terdiri dari 3 aras yaitu 0 mg/l (D1), 2 mg/l (D2), 4 mg/l (D3), Faktor kedua, konsentrasi BAP yang terdiri dari 0 mg/l (B1), 0,1 mg/l (B2) dan

0,5 mg/l (B3). Medium yang digunakan NDM, disertai dengan penambahan Arang aktif 0,2 g/l serta PPM (*Plant Preservative Mixture*) 0,5 ml/l.

Jumlah eksplan per botol sebanyak 1 buah eksplan. Setiap kombinasi perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Setiap ulangan terdiri dari 3 botol. Tunas angrek yang dibutuhkan sebanyak 81 buah (*Lay out* pada lampiran 1).

Kombinasi perlakuannya yang diujikan yaitu :

D1B1 = Tanpa 2,4 D + Tanpa BAP  
 D1B2 = Tanpa 2,4 D + BAP 0,1 mg/l  
 D1B3 = Tanpa 2,4 D + BAP 0,5 mg/l  
 D2B1 = 2,4 D 2 mg/l + Tanpa BAP  
 D2B2 = 2,4 D 2 mg/l + BAP 0,1 mg/l  
 D2B3 = 2,4 D 2 mg/l + BAP 0,5 mg/l  
 D3B1 = 2,4 D 4 mg/l + Tanpa BAP  
 D3B2 = 2,4 D 4 mg/l + BAP 0,1 mg/l  
 D3B3 = 2,4 D 4 mg/l + BAP 0,5 mg/l

#### **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 121<sup>0</sup>C tekanan 1 atm selama 1 jam. Sterilisasi basah dilakukan pada alat – alat seperti botol kultur, pinset, scalpel, aluminium foil, petridish, dan erlenmeyer. Selain itu, sterilisasi basah juga dilakukan untuk mensterilkan media yang sudah dibuat dan aquades yang telah disuling (Lampiran 6a).

Sedangkan 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 siprtus. 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 tissu kering, kemudian lampu UV dapat dinyalakan selama 15 menit sebelum LAF digunakan.

## 2. Pembuatan medium NDM

Media NDM dibuat sebanyak 1800 ml untuk 9 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 200 ml medium yaitu: media NDM bubuk=0,2g; sukrosa = 6g; Phytigel = 0,5 g; PPM = 0,1 ml; arang aktif 0,04 g; Aquades serta BAP sesuai perlakuan, yaitu 0 (Tanpa BAP); 0,1 mg/l (0,2 ml/200 ml larutan); 0,5 mg/l (1 ml/200 ml larutan); 2,4-D sesuai perlakuan yaitu 0 (tanpa 2,4-D), 2 mg/l (4 ml/200ml larutan), 4 mg/l (8 ml/200ml larutan) (Lampiran 6b).

## 3. Pembuatan medium Perlakuan

Kebutuhan bahan dihitung sesuai kebutuhan per ulangan. Setiap erlenmeyer diisi dengan larutan sebanyak 200 ml, yang telah berisi media NDM, sukrosa, vitamin, Phytigel, ppm, 2,4 D, BAP, arang aktif dan aquades. Larutan yang telah tercampur kemudian dimasukkan ke dalam botol, masing – masing botol berisi 20 ml larutan (Lampiran 6b). Berikut merupakan perlakuan yang akan dibuat :

## a. D1B1



Aquades 50 ml (untuk melarutkan) + media NDM + sukrosa, cek dan sesuaikan pH (pH normal = 6) + arang aktif + PPM + Phytigel + aquades hingga volume larutan menjadi 200 ml + 0 ml 2,4 D + 0 ml BAP. Dibagi ke dalam 10 botol.

## b. D1B2



Aquades 50 ml (untuk melarutkan) + media NDM + sukrosa, cek dan sesuaikan pH (pH normal = 6) + arang aktif + PPM + Phytigel + aquades hingga volume larutan menjadi 199,8 ml + 0,2 ml BAP + 0 ml 2,4 D. Dibagi ke dalam 10 botol.

## c. D1B3



Aquades 50 ml (untuk melarutkan) + media NDM + sukrosa, cek dan sesuaikan pH (pH normal = 6) + arang aktif + PPM + Phytigel + aquades hingga volume larutan menjadi 199 ml + 1 ml BAP + 0 ml 2,4 D. Dibagi ke dalam 10 botol.

## d. D2B1



Aquades 50 ml (untuk melarutkan) + media NDM + sukrosa, cek dan sesuaikan pH (pH normal = 6) + arang aktif + PPM + Phytigel + aquades hingga volume larutan menjadi 196 ml + 4 ml 2,4 D + 0 ml BAP. Dibagi ke dalam 10 botol.

e. D2B2



Aquades 50 ml (untuk melarutkan) + media NDM + sukrosa, cek dan sesuaikan pH (pH normal = 6) + arang aktif + PPM + Phytigel + aquades hingga volume larutan menjadi 195,8 ml + 4 ml 2,4 D + 0,2 ml BAP. Dibagi ke dalam 10 botol.

f. D2B3



Aquades 50 ml (untuk melarutkan) + media NDM + sukrosa + cek dan sesuaikan pH (pH normal = 6) + arang aktif + PPM ++ Phytigel aquades hingga volume larutan menjadi 195 ml + 4 ml 2,4D + 1 ml BAP. Dibagi ke dalam 10 botol.

g. D3B1



Aquades 50 ml (untuk melarutkan) + media NDM + sukrosa , cek dan sesuaikan pH (pH normal = 6) + arang aktif + PPM + Phytigel + aquades hingga volume larutan menjadi 192 ml + 8 ml 2,4D + 0 ml BAP. Dibagi ke dalam 10 botol.

h. D3B2



Aquades 50 ml (untuk melarutkan) + media NDM + sukrosa, cek dan sesuaikan pH (pH normal = 6) + arang aktif + PPM + Phytigel + aquades hingga volume larutan menjadi 191,8 ml + 8 ml 2,4D + 0,2 ml BAP. Dibagi ke dalam 10 botol.

## i. D3B3



Aquades 50 ml (untuk melarutkan) + media NDM + sukrosa , cek dan sesuaikan pH (pH normal = 6) + arang aktif + PPM + Phytigel + aquades hingga volume larutan menjadi 191 ml + 8 ml 2,4D + 1 ml BAP. Dibagi ke dalam 10 botol.

## 4. Penyiapan Eksplan

Eksplan Tunas Anggrek *vanda tricolor* disubkultur ke dalam media NDM 0 dahulu yang berfungsi untuk menghomogenkan eksplan. Setelah inkubasi dalam media NDM selama 2 minggu eksplan Tunas siap digunakan untuk penanaman.

## 5. Penanaman Eksplan

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 tunas dari botol semai, kemudian ditanam pada medium kultur yang telah dipersiapkan menggunakan pinset steril. Setiap satu botol diisi dengan satu buah tunas anggrek. Botol yang sudah ditanami eksplan selanjutnya ditutup dengan aluminium foil, dikencangkan menggunakan karet gelang, dan dilapisi kembali dengan *plastic wrap* (Lampiran 6c).

## 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<sup>0</sup>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: Persentase eksplan hidup (%), Persentase eksplan terkontaminasi (%), Persentase eksplan *browning* (%), Persentase eksplan vitrifikasi (%), Pertambahan Tinggi Tanaman (cm), Pertambahan Jumlah Daun (helai), Warna Daun, Jumlah Akar, Jumlah Pro-embrio, Persentase Eksplan Berkalus (%), Tekstur Kalus, dan Pengamatan Mikroskop.

### 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 setiap 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 setiap 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 setiap seminggu sekali selama 8 minggu, kriteria eksplan *browning* apabila pencoklatan pada eksplan lebih dari separuh eksplan. Persentase eksplan *browning* dapat dihitung dengan rumus :

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

## 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.

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

## 5. Pertambahan Tinggi Tanaman (cm)

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



#### 6. Pertambahan Jumlah Daun (Helai)

Pengamatan dilakukan pada tiap botol dengan menghitung banyaknya daun yang terbentuk. Pengamatan dilakukan setiap minggu sekali selama 8 minggu, kriteria daun yang dihitung adalah daun yang sudah membuka.

#### 7. 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*).

#### 8. Jumlah Akar

Jumlah akar diamati setiap seminggu sekali selama 8 minggu. Jumlah akar yang tumbuh dihitung pada akhir pengamatan (8 MST) .

#### 9. Jumlah Pro-embrio

Jumlah pro-embrio diamati setiap minggu selama 8 minggu. Bulatan Pro-embrio yang muncul pada eksplan tunas dapat diduga menjadi calon tunas, calon akar dan calon embrio.

#### 10. Persentase Eksplan Berkalus (%)

Kalus yang tumbuh (kalus yang tidak terkontaminasi dan tidak mengalami pencoklatan (*browning*) lebih dari separuh eksplan) diamati setiap seminggu sekali selama 8 minggu. Persentase embrio tumbuh dihitung diakhir pengamatan dengan rumus :

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

#### 11. Tekstur Kalus

Tekstur kalus adalah salah satu penanda yang digunakan untuk menilai kualitas kalus. Pengamatan tekstur kalus dilakukan pada 8 MST dengan mengamati tekstur kalus yang terbentuk.

#### 12. Pengamatan Mikroskop

Pengamatan mikroskop menggunakan Mikroskop Stereo SZM45 B2 + Optilab advance. Pengamatan mikroskop bertujuan untuk mengetahui perkembangan kalus dan fase embrio secara detail menggunakan mikroskop apabila terbentuk fase globular, heart, torpedo, dan kotiledon. Pengamatan ini dilakukan pada minggu ke-4 dan minggu ke-8 setelah tanam.

### **F. Analisis Data**

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