

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

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

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur *in vitro* Fakultas Pertanian UMY, dimulai pada bulan Desember 2018 sampai Februari 2019.

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

Bahan yang digunakan adalah tunas Anggrek *Vanda tricolor* yang berumur 1 tahun, medium dasar *New Dogashima Medium* (NDM), cloorox 5%, 2,4-D, TDZ, arang aktif, PPM, sukrosa, KOH 1M, HCl 1M, iodine, dan aquadest (Lampiran VI).

Alat yang digunakan pinset, gelas ukur, erlenmeyer, petridish, pipet, pengaduk, karet, aluminium foil, kertas payung, plastik, syringe/jarum, botol sprayer, lampu spiritus, shaker, autoklaf, petridish, pH meter, timbangan analitik, dan Mikroskop Stereo SZM45 B2 + Opticlab advance (Lampiran V1).

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

Penelitian dilakukan menggunakan metode eksperimen yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal dengan 6 perlakuan yaitu kombinasi konsentrasi 2,4-D (0 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l) dan TDZ (0 mg/l, 0,5 mg/l) pada medium cair. Setiap perlakuan diulang 3 kali. Masing-masing perlakuan ditambahkan arang aktif 0,2 g/l serta PPM 0,1 ml/l:

- A. 0 mg/l 2,4-D + 0 mg/l TDZ (kontrol)
- B. 0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ
- C. 2 mg/l 2,4-D + 0 mg/l TDZ
- D. 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ

E. 4 mg/l 2,4-D + 0 mg/l TDZ

F. 4 mg/l 2,4-D + 0,5mg/l TDZ

Setiap ulangan terdiri dari 3 sampel. Setiap sampel botol terdiri dari satu eksplan.

Jadi, tunas anggrek yang dibutuhkan sebanyak 54 unit (*Lay out* pada Lampiran I).

## **D. Cara Penelitian**

### **1. Sterilisasi Alat**

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<sup>0</sup>C bertekanan 1 atm. Alat-alat yang di-sterilkan antara lain: botol-botol kultur, pinset, pengaduk, 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 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 15 menit sebelum LAF digunakan.

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

Medium NDM dibuat sebanyak 1200 ml yang dibagi menjadi 6 perlakuan. Setiap perlakuan sebanyak 200 ml, masing – masing perlakuan digunakan 10 erlenmeyer. Setiap erlenmeyer diisi sebanyak 20 ml medium NDM. Bahan – bahan yang dibutuhkan untuk 200 ml medium yaitu: medium NDM bubuk = 0,392 g; TDZ sesuai perlakuan, yaitu 0 (Tanpa TDZ); 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), dan 4 mg/l (8ml/200ml larutan); sukrosa = 6g; PPM = 0,1 ml; arang aktif 0,04 g; serta aquades (Lampiran VIb).

### 3. Persiapan TDZ

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.

Penggunaan konsentrasi TDZ sesuai dengan perlakuan, maka harus dilakukan pengenceran terlebih dahulu. Setelah diencerkan kemudian dihitung rumus kebutuhan untuk setiap ulangan sebagai berikut:

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

### 4. Persiapan 2,4-D

2,4-D merupakan auksin kuat yang mampu merangsang pertumbuhan kalus dengan cepat dibandingkan terjadinya *browning* pada eksplan sehingga eksplan dapat merespon zat pengatur tumbuh dan unsur hara yang terkandung dalam medium. 2,4-D merupakan jenis auksin sintetis yang sering digunakan dalam kultur jaringan (Abidin, 1982).

Penggunaan konsentrasi 2,4-D sesuai dengan perlakuan, maka harus dilakukan pengenceran terlebih dahulu. Setelah diencerkan kemudian menghitung rumus kebutuhan untuk setiap ulangan sebagai berikut:

$$\text{Kebutuhan 2,4 D} = \frac{\text{Total larutan setiap ulangan (ml)}}{1000 \text{ ml aquadest}} \times 2,4 \text{ D (ml)}$$

## 5. Perlakuan

Perlakuan untuk menentukan total bahan yang dibutuhkan dengan menghitung kebutuhan per ulangan. Satu erlenmeyer diisi dengan larutan sebanyak 200 ml yang telah berisi medium, sukrosa, arang aktif, ppm, TDZ, 2,4-D dan aquades. Larutan yang telah tercampur kemudian dimasukkan ke dalam botol, masing-masing botol berisi 20 ml larutan. Berikut merupakan perlakuan yang diujikan:

- a. D1T1 = Aquades 20 ml (untuk melarutkan) + medium NDM (0,392g) + sukrosa (6g) + tanpa 2,4-D + tanpa TDZ + PPM (0,1ml) + arang aktif (0,04g) + cek pH (pH normal = 6) + aquades hingga volume larutan menjadi 200 ml. Dibagi ke dalam 10 botol, masing-masing berisi 20 ml.
- b. D1T2 = Aquades 20 ml (untuk melarutkan) + medium NDM (0,392g) + sukrosa (6g) + tanpa 2,4-D + PPM (0,1ml) + arang aktif (0,04g) + cek pH (pH normal = 6) + aquades hingga volume larutan menjadi 200 ml + 1 ml TDZ (dilakukan dalam LAF). Dibagi ke dalam 10 botol, masing-masing berisi 20 ml.
- c. D2T1 = Aquades 20 ml (untuk melarutkan) + medium NDM (0,392g) + sukrosa (6g) + 4 ml 2,4-D + tanpa TDZ + PPM (0,1ml) + arang aktif (0,04g) + cek pH (pH normal = 6) + aquades hingga volume larutan menjadi 200 ml. Dibagi ke dalam 10 botol, masing-masing berisi 20 ml.

- d. D2T2 = Aquades 20 ml (untuk melarutkan) + medium NDM (0,392g) + sukrosa (6g) + 4 ml 2,4-D + PPM (0,1ml) + arang aktif (0,04g) + cek pH (pH normal = 6) + aquades hingga volume larutan menjadi 200 ml + 1 ml TDZ (dilakukan dalam LAF). Dibagi ke dalam 10 botol, masing-masing berisi 20 ml.
- e. D3T1 = Aquades 20 ml (untuk melarutkan) + medium NDM (0,392g) + sukrosa (6g) + 8 ml 2,4-D + tanpa TDZ + PPM (0,1ml) + arang aktif (0,04g) + cek pH (pH normal = 6) + aquades hingga volume larutan menjadi 200 ml. Dibagi ke dalam 10 botol, masing-masing berisi 20 ml.
- f. D3T2 = Aquades 20 ml (untuk melarutkan) + medium NDM (0,392g) + sukrosa (6g) + 8 ml 2,4-D + PPM (0,1ml) + arang aktif (0,04g) + cek pH (pH normal = 6) + aquades hingga volume larutan menjadi 200 ml + 1 ml TDZ (di lakukan dalam LAF). Dibagi ke dalam 10 botol, masing-masing berisi 20 ml.

## 6. Penanaman Eksplan

Eksplan yang digunakan berupa tunas Anggrek *Vanda tricolor* berumur 1 tahun. Penanaman eksplan dilakukan dalam *Laminar Air Flow Cabinet* dengan kondisi aseptik atau steril. Sebelum penanaman, eksplan tunas tersebut disubkulturkan ke dalam medium NDM 0 untuk menghomogenkan eksplan yang sebelumnya di inkubasi pada medium dengan penambahan ZPT. Setelah inkubasi dalam medium NDM selama 1 minggu, eksplan NDM siap ditanam.

Penanaman dilakukan dengan cara mengambil tunas dari botol semai yang tersedia, kemudian, eksplan ditanam ke dalam botol medium sesuai perlakuan dengan menggunakan pinset. Setiap botol berisi satu eksplan. Setelah selesai ditanam, botol kultur ditutup dengan aluminium foil, dikencangkan dengan karet gelang, dilapisi dengan menggunakan wrap, kemudian diberi label perlakuan dan tanggal penanaman. Selanjutnya erlenmeyer diletakkan pada shaker di ruang pemeliharaan/inkubasi (Lampiran VIc).

## **7. Inkubasi**

Pada proses inkubasi, erlenmeyer diletakkan pada shaker. Ruang inkubasi dilengkapi lampu neon (TL) 40 watt yang dinyalakan selama 24 jam. Suhu ruang inkubasi dilengkapi dengan AC dengan suhu rata-rata 20-28°C.

## **8. Pengamatan**

Pengamatan dilakukan dari awal penanaman sampai minggu ke-8 setelah tanam. Parameter pengamatan yang diamati meliputi: Persentase eksplan hidup (%), persentase eksplan terkontaminasi (%), persentase eksplan *browning* (%), persentase eksplan tervitifikasi (%), waktu terbentuknya kalus, persentase eksplan berkalus (%), tekstur kalus, persentase tunas (%), warna daun, jumlah daun, perkembangan pro embrio, waktu muncul pro embrio, perkembangan kalus dan fase embrio.

## E. Parameter yang Diamati

### 1. Keberhasilan Teknik Kultur *In vitro*

#### a. 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:

Rumus :

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

#### b. 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 :

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

#### c. Persentase 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 :

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

#### **d. Persentase Eksplan Vitrifikasi (%)**

Eksplan yang mengalami Vitrifikasi diamati seminggu sekali selama 8 minggu, kriteria eksplan yang tervitrifikasi ditandai dengan berubahnya warna eksplan menjadi putih, apabila warna putih pada eksplan lebih dari separuh eksplan. Persentase eksplan Vitrifikasi dapat dihitung dengan

Rumus :

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

## **2. Pertumbuhan Kalus**

### **a. Tekstur Kalus**

Tekstur kalus merupakan salah satu indikator pertumbuhan kalus. Terdapat 3 tekstur kalus yaitu spongy, kompak, dan remah. Tekstur kalus embriogenik adalah tekstur yang remah (*friable*), karena tekstur yang remah lebih mudah untuk dipisah-pisahkan antara sel satu dengan lainnya. Pengamatan tekstur kalus dimulai dari minggu ke -1 sampai minggu ke -8.

### **b. Waktu Terbentuknya Kalus (hari)**

Pertumbuhan kalus diamati setiap dua hari sekali selama 8 minggu, kriteria kalus yang terbentuk yaitu kalus yang nampak putih di ujung dan tepi eksplan. Penentuannya dengan cara menghitung dari minggu pertama sejak awal penanaman hingga muncul kalus pertama. Tujuan pengamatan ini yaitu untuk mengetahui sejauh mana eksplan responsif terhadap perlakuan yang diberikan.

### c. Persentase Eksplan Berkalus (%)

Data jumlah eksplan berkalus digunakan untuk menghitung persentase eksplan yang membentuk kalus. Persentase eksplan yang membentuk kalus dapat dihitung dengan:

$$\text{Persentase eksplan berkalus (\%)} = \frac{\sum \text{eksplan membentuk kalus}}{\sum \text{seluruh eksplan}} \times 100 \%$$

## 3. Pertumbuhan Tunas

### a. Persentase Eksplan Bertunas (%)

Eksplan bertunas diamati setiap minggu selama 8 minggu, kriteria tunas yang terbentuk ditandai dengan munculnya tunas di nodus batang. Tujuan pengamatan ini yaitu untuk mengetahui sejauh mana eksplan responsif terhadap perlakuan yang diberikan.

### b. Jumlah Daun

Pengamatan jumlah daun dilakukan setiap minggu selama 8 minggu. Kriteria daun yang diamati yaitu daun yang telah berkembang sempurna.

### c. Warna Daun

Pengamatan warna daun dilakukan setiap minggu selama 8 minggu. Cara pengamatannya yaitu dengan menggunakan alat yang disebut *Munshell Color Chart*. Kriteria daun yang diamati yaitu daun yang telah berkembang setelah itu dilakukan skoring yang terdapat pada Tabel 1.

Tabel 1. Skoring Warna Daun

Warna	Tingkatan	Gambar
5 Y 8/2-5Y 8/4	1	
5 Y 8/6-5Y 8/8	2	
5Y 8/10-5Y 8/12	3	
2,5 GY 8/2- 2,5 GY 8/4	4	
2,5 GY 8/6- 2,5 GY 8/8	5	
2,5 GY 8/10- 2,5 GY 8/12	6	
5 GY 7/4-5 GY 7/6	7	
5 GY 7/8-5 GY 7/10	8	

$$\text{Warna daun} = \frac{N \times V}{Z \times n} \times 100 \%$$

Ket:

N = Jumlah sampel yang memiliki warna sama

V = Nilai skor yang menunjukkan tingkat warna

Z = Nilai skor tertinggi

n = Jumlah sampel

(Zainal, 2011)

#### 4. Perkembangan Pro-embrio

##### a. Waktu Muncul Pro-embrio

Waktu munculnya pro-embrio diamati setiap minggu selama 8 minggu, Penentuannya dengan cara menghitung dari minggu pertama sejak awal penanaman hingga muncul bulatan pertama. Tujuan pengamatan ini yaitu untuk mengetahui sejauh mana eksplan responsif terhadap perlakuan yang diberikan.

### **b. Perkembangan Kalus dan Fase Embrio**

Perkembangan fase embrio diamati setiap 1 bulan dengan cara mengamati eksplan di bawah Mikroskop Stereo SZM45 B2 + Opticlab advance dengan perbesaran 0,7x-0,8x jika terbentuk fase globular heart, torpedo dan kotiledon. Tujuan pengamatan ini yaitu untuk mengetahui sejauh mana eksplan responsif terhadap perlakuan yang diberikan.

### **F. Analisis Data**

Hasil pengamatan kuantitatif dianalisis menggunakan sidik ragam atau *Analysis of Variance* (Annova) taraf 5%. Apabila ada pengaruh beda nyata antar perlakuan yang diujikan maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan *Duncan's Range Test* (DMRT) pada taraf 5%. Hasil penelitian disajikan dalam bentuk grafik dan histogram.