

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat Dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur *In vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta mulai bulan April 2019 sampai dengan bulan Juni 2019.

B. Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari: eksplan Anggrek hitam steril, pumpkin, air kelapa, akuades, klorox, spiritus, alkohol 70%, antiseptik, KOH, HCl, medium MS, dan pupuk daun (*Growmore*), Bakterisida (*Agrept*), Fungisida (*Dithane*), PPM, gula pasir, dan agar .

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Laminar Air Flow cabinet*, botol kultur, lampu bunsen, autoklaf, *dissecting kits*, plastik wrap, aluminium foil, pH stik, *glassware*, timbangan analitik, timer dan microwave, serta alat tulis.

C. Metode Penelitian

Penelitian dilaksanakan dengan metode percobaan laboratorium faktor tunggal 6 perlakuan. Masing-masing perlakuan diulang 3 kali dan setiap ulangan terdiri atas 3 sampel sehingga didapatkan 54 unit percobaan yang disusun menurut Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan yang dicobakan yaitu subkultur anggrek hitam pada media campuran pupuk daun, air kelapa, dan pumpkin pada berbagai konsentrasi.

Adapun perlakuan yang diberikan adalah:

1. Pupuk Daun 3 g/l + Air Kelapa 150 ml/l + Pumpkin 5 g/l
2. Pupuk Daun 3 g/l + Air Kelapa 150 ml/l + Pumpkin 10 g/l
3. Pupuk Daun 3 g/l + Air Kelapa 150 ml/l + Pumpkin 15 g/l
4. Pupuk Daun 3 g/l + Air Kelapa 150 ml/l + Pumpkin 20 g/l
5. Pupuk Daun 3 g/l + Air Kelapa 150 ml/l
6. MS + NAA 0,5 ppm + BAP 1 ppm

D. Cara Penelitian

Alur kerja yang akan dilaksanakan dalam penelitian ini terdiri dari sterilisasi, pembuatan media, inokulasi, inkubasi, dan pemeliharaan.

1. Sterilisasi alat

Sterilisasi alat dilakukan dengan metode sterilisasi basah, sterilisasi bakar dan ultra violet. Sterilisasi basah diawali dengan pencucian peralatan seperti pinset, scalpel, *glassware* pada air mengalir dan detergen atau sabun pencuci peralatan lainnya. Botol kultur bekas pakai yang akan digunakan pertama direbus dahulu hingga mendidih, selanjutnya dicuci menggunakan detergen atau sabun pencuci peralatan. Semua peralatan ditiriskan, kemudian peralatan yang sudah kering disterilisasi ke dalam autoklaf pada tekanan 1 atm dan suhu 121°C selama 1 jam. Setelah selesai diautoklaf, peralatan didinginkan terlebih dahulu, kemudian disimpan di ruang inkubasi. Peralatan yang disterilkan berupa : botol kultur, pinset, scalpel, *aluminium foil*, Erlenmeyer, gelas ukur, spatula, cawan petri dan botol jam. Sterilisasi bakar dilakukan dengan menggunakan lampu Bunsen didalam *Laminar Air Flow Cabine* (LAF). Sterilisasi LAF dilakukan sebelum sterilisasi bakar

dimulai, dengan menyalakan lampu UV selama 1 jam. Indikator capaian pada tahap ini adalah tersedia semua alat dan bahan yang steril.

2. Pembuatan Media

a. Pembuatan Larutan Stok

1). Larutan Stok Makro

Menimbang persenyawaan NH_4NO_3 16,5 g, KNO_3 19 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,7 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4,4 g, dan KH_2PO_4 1,7 g. Bahan yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam gelas piala bersih yang telah berisi akuadest hingga kira-kira 100 ml, kemudian diaduk rata. Menambahkan akuadest hingga volume larutan tepat 500 ml. Memberi label stok makro 50ml/l. Kebutuhan stok makro sebanyak 50 ml untuk pembuatan 1 liter media.

2). Larutan Stok Mikro

Menimbang persenyawaan $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,223 g, H_3BO 0,062 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,158 g, KI 0,0083 g, $\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,0025 g. Bahan yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam gelas piala bersih yang telah berisi akuadest kira-kira 50 ml, kemudian diaduk rata. Menambahkan akuadest hingga volume larutan tepat 100 ml. Memberi label 10 ml/l. Kebutuhan stok mikro sebanyak 10 ml untuk pembuatan 1 liter media.

3). Larutan Stok Vitamin

Menimbang bahan-bahan kimia vitamin: Nicotinic-acid 0,005 g, Pyridoxine-HCL 0,005 g, Thiamine-HCL 0,001 g, Glysine 0,02 g, kemudian melarutkan bahan-bahan tersebut kedalam gelas beaker yang

berisi 50 ml akuadest steril dan diaduk dengan *Magnetik stirrer* sampai homogen. Menambahkan akuades pada larutan stok hingga volumenya menjadi 100 ml, memberikan label pada botol stok vitamin 10 ml/l, untuk membuat 1 liter medium diperlukan 10 ml larutan stok vitamin.

4). Larutan stok NAA

Menimbang persenyawaan NAA 0,01 g. Bahan yang telah ditimbang dimasukkan kedalam erlenmeyer. Tambahkan NaOH untuk melarutkan NAA, dan menambah akuadest hingga volume sampai tepat 100 ml kemudian memberi label 100 ppm = 10 ml/l, untuk membuat 1 liter medium dibutuhkan 10 ml stok NAA.

5). Larutan stok BAP

Menimbang persenyawaan BAP 0,01 g. Bahan yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam gelas piala bersih. Kemudian menambahkan beberapa tetes HCL 1 N. Lalu menambahkan akuadest kira-kira 25 ml dan diaduk rata. Menambahkan akuadest hingga volume larutan tepat 100 ml. Memberikan label stok BAP 100 ppm = 10 ml/l. Kebutuhan stok BAP sebanyak 10 ml untuk pembuatan 1 liter medium.

6). Mio-Inositol

Menimbang persenyawaan Mio-Inositol 1 g. Bahan yang telah ditimbang dimasukkan kedalam erlenmeyer. Tambahkan akuadest hingga volume sampai tepat 100 ml, kemudian memberi label pada botol stok Mio-Inositol 10 ml/l, untuk membuat 1 liter medium diperlukan 10 ml stok Mio-Inositol.

b. Pembuatan Media MS

Pembuatan media MS dilakukan dengan cara memasukan larutan stok hara makro, mikro, dan vitamin, dan zat pengatur tumbuh ke Erlenmeyer yang mengandung 25 ml aquadest, NAA 0,5 ppm (1 ml), BAP 1 ppm (2 ml), gula 6 g. Selanjutnya tambahkan aquadest steril hingga mencapai 200 ml dan menghomogenkan larutan. Setelah larutan homogen, dilakukan pengecekan pH larutan dengan anjuran pH yaitu 6-7. Kemudian tambahkan agar 1,6 g, homogenkan, kemudian rebus media tersebut dikompor hingga agar nya larut kurang lebih selama 1,5 jam kemudian larutan dituangkan ke dalam botol kultur, masing- masing botol berisi 20 ml lalu ditutupi dengan plastik. Selanjutnya dilakukan sterilisasi media dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 2 jam. Indikator capaian pada tahap ini adalah diperoleh medium perlakuan yang steril serta siap digunakan untuk inokulasi.

c. Pembuatan Media Pumpkin

Pembuatan media pumpkin dilakukan dengan cara memasukkan 0,6 g Growmore, air kelapa 30 ml, gula 6 g dan ekstrak pumpkin sesuai dengan perlakuan kedalam erlenmeyer. Selanjutnya tambahkan aquadest steril hingga mencapai 200 ml dan menghomogenkan larutan. Setelah larutan homogen, dilakukan pengecekan pH larutan dengan anjuran pH yaitu 6-7 setelah itu tambahkan agar 1,6 g, homogenkan, kemudian rebus media tersebut dikompor hingga agar larut kurang lebih selama 1,5 jam kemudian dituangkan ke dalam botol kultur, masing- masing botol berisi 20 ml media cair lalu ditutupi dengan

plastik. Selanjutnya dilakukan sterilisasi media dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 2 jam. Indikator capaian pada tahap ini adalah diperoleh medium perlakuan yang steril serta siap digunakan untuk inokulasi.

3. Inokulasi

Inokulasi dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). LAF disterilisasi terlebih dahulu dengan menyemprotkan alkohol 70% dan dikeringkan dengan tisu, kemudian disterilisasi lagi dengan Impu UV selama 1 jam sebelum penggunaan. Kemudian blower dinyalakan LAF dalam selama 10 menit setelah UV dimatikan. Peralatan yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu dengan disemprot alkohol 70%. Penanaman dilakukan dengan cara memindahkan eksplan anggrek hitam pada botol kultur sebelumnya ke media baru dalam botol kultur menggunakan pinset steril. Pindahan dilakukan dengan cara dipisahkan antar individu. Setiap satu botol diisi dengan satu eksplan anggrek hitam. Botol kultur yang telah ditanami eksplan kemudian ditutup dengan aluminium foil, dikencangkan dengan karet gelang, kemudian ditutup dengan plastik wrapt.

4. Inkubasi dan pengamatan data

Botol yang sudah diinokulasi dan ditutup rapat kemudian diletakkan dirak dalam ruang inkubasi. Ruang inkubasi menggunakan lampu neon 40 watt selama 24 jam adanya cahaya dibutuhkan untuk morfogenesis. Suhu pada ruangan berkisar antara 20-28° C. Pemeliharaan dilakukan selama 3 bulan terhitung setelah penanaman. Pengamatan data dilakukan dengan mencatat setiap variabel yang diamati dengan frekuensi masing-masing variabel pengamatan setiap 1 minggu sekali. Variabel yang diamati yaitu persentase eksplan hidup (%), persentase eksplan terkontaminasi (%), persentase eksplan *Browning* (%), tinggi tunas (cm), jumlah daun (helai), persentase eksplan berakar (%), saat eksplan berakar.

E. Variabel Pengamatan

Terdapat beberapa variabel yang diamati pada perbanyakan *In vitro* menggunakan media pumpkin, diantaranya:

1. Persentase eksplan hidup (%)

Persentase eksplan hidup adalah jumlah eksplan hidup dari jumlah total eksplan tiap perlakuan. Perlakuan dilakukan dengan cara melihat eksplan yang hidup (eksplan yang tidak terkontaminasi dan tidak mengalami pencoklatan atau *Browning* >80%) diamati seminggu sekali selama 8 minggu.

Persentase eksplan hidup dihitung diakhir pengamatan dengan rumus :

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

2. Persentase eksplan terkontaminasi (%)

Persentase eksplan terkontaminasi adalah jumlah eksplan terkontaminasi dari total eksplan tiap perlakuan. Eksplan terkontaminasi diamati setiap 1 minggu sekali selama 8 minggu. Eksplan dapat dikatakan terkontaminasi apabila terdapat jamur atau bakteri pada eksplan atau medium tersebut. Persentase eksplan terkontaminasi dihitung menggunakan rumus:

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

3. Persentase eksplan *Browning* (%)

Eksplan *Browning* atau yang mengalami pencoklatan diamati setiap minggu hingga akhir pengamatan yaitu pada minggu ke 8. Eksplan yang mengalami *Browning* ditunjukkan dengan warna coklat >50% pada eksplan. Eksplan yang mengalami pencoklatan dihitung menggunakan rumus :

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

4. Tinggi Tanaman (cm)

Pengamatan yang dilakukan dengan mengukur tinggi tunas mulai dari permukaan media sampai ujung daun dengan satuan cm. Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali dari tempat yang berbeda kemudian dirata-rata. Pengamatan dilakukan seminggu sekali selama 8 minggu.

5. Jumlah daun (helai)

Pengamatan jumlah daun dilakukan seminggu sekali selama 8 minggu dengan menghitung jumlah daun yang tumbuh pada masing-masing eksplan setiap botol pada masing-masing perlakuan.

6. Persentase eksplan berakar (%)

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

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

7. Saat eksplan berakar

Saat eksplan berakar adalah salah satu indikator untuk mengetahui kecepatan akar tumbuh. Saat muncul akar diamati setiap minggu. Penetunannya dengan menghitung dari minggu pertama (awal penanaman) hingga kemunculan akar pertama.

F. Analisis Data

Data hasil dari penelitian dianalisis menggunakan sidik ragam atau *analysis of variance* taraf α 5%. Apabila terdapat perbedaan nyata antar perlakuan yang diujikan maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan Duncan Multiple Range Test (DMRT).