

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2018 sampai dengan Maret 2019 di Laboratorium Kultur *in Vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu eksplan tunas angrek *Vanda tricolor*. Medium tanam yang digunakan yaitu *New Dogashima Medium* (NDM) dan pupuk organik cair (POC). Bahan lain yang digunakan yakni zat pengatur tumbuh (ZPT) 2,4-D dan TDZ, sukrosa, *Plant Preservative Mixture* (PPM), arang aktif, agar, alkohol 70%, aquades, iodine, clorox dan spiritus.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu autoklaf untuk sterilisasi basah alat dan medium yang digunakan dalam penelitian, kertas payung untuk membungkus alat yang disterilisasi, timbangan analitik untuk menimbang bahan penelitian, pH stik untuk mengukur pH larutan medium, *timer* untuk mengukur waktu, *stirrer* untuk mengaduk larutan medium hingga homogen, *aluminium foil*; plastik wrap; karet gelang sebagai penutup botol kultur, pipet tetes untuk mengambil larutan dalam jumlah sedikit, *millipore* untuk menyaring larutan, *dissecting kits* untuk menanam eksplan, lampu bunsen untuk sterilisasi bakar pada saat penanaman eksplan, *Laminar Air Flow* (LAF) sebagai tempat melakukan kegiatan penanaman eksplan, mikroskop Stereo SZM45 B2 + Optilab *advance* untuk pengamatan morfogenesis eksplan, dan label untuk menandai perlakuan

pada masing-masing botol kultur. Peralatan gelas yang digunakan yaitu botol kultur sebagai tempat menumbuhkan eksplan, gelas ukur untuk mengukur banyaknya larutan yang dibutuhkan dalam pembuatan medium, *erlenmeyer* sebagai tempat dalam pembuatan larutan medium, dan *petridish* sebagai tempat untuk sterilisasi eksplan.

C. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan yaitu metode percobaan faktor tunggal dan disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan yang diujikan adalah penggunaan jenis medium (NDM dan POC) dengan berbagai taraf konsentrasi 2,4-D (0, 1, 3, 5 mg/l). TDZ sebanyak 0,5 mg/l ditambahkan ke dalam setiap perlakuan. Kombinasi perlakuan yang diujikan yaitu:

A = Medium NDM + 0 mg/l 2,4-D

B = Medium NDM + 1 mg/l 2,4-D

C = Medium NDM + 3 mg/l 2,4-D

D = Medium NDM + 5 mg/l 2,4-D

E = Medium POC + 0 mg/l 2,4-D

F = Medium POC + 1 mg/l 2,4-D

G = Medium POC + 3 mg/l 2,4-D

H = Medium POC + 5 mg/l 2,4-D

Setiap perlakuan terdiri dari 3 ulangan dan setiap ulangan terdiri dari 3 sampel, sehingga jumlah keseluruhan sebanyak 72 unit. Jumlah eksplan perbotol yaitu 1 buah eksplan (*layout* pada Lampiran 1).

D. Cara Penelitian

1. Sterilisasi

Sterilisasi dilakukan dengan dua cara, yaitu sterilisasi basah/uap air yang bertekanan dan sterilisasi bakar. Sterilisasi basah dilakukan dengan memasukkan alat-alat yang telah dibungkus dengan kertas payung ke dalam autoklaf pada suhu 121⁰C bertekanan 1 atm selama 1 jam. Alat-alat yang disterilkan antara lain botol kultur, pinset, *stirrer*, *aluminium foil*, *petridish*, botol ukur, dan *erlenmeyer*. Selain itu, sterilisasi basah juga dilakukan untuk mensterilkan media yang sudah dibuat dan aquades yang telah disuling (Lampiran 7.a).

Sterilisasi bakar dilakukan dengan menggunakan lampu bunsen. Sterilisasi dilakukan di dalam LAF (*Laminar Air Flow*). Cara yang digunakan yaitu dengan mencelupkan alat yang digunakan ke dalam alkohol 70%, kemudian dibakar pada lampu bunsen. Alat yang dibakar yaitu pinset yang digunakan untuk penanaman eksplan. Sebelum digunakan, LAF juga harus disterilisasi terlebih dahulu. Sterilisasi LAF dilakukan dengan menyemprotkan alkohol 70% ke seluruh permukaan, kemudian dilap hingga kering, dan lampu UV dapat dinyalakan selama 1 jam sebelum LAF digunakan.

2. Pembuatan Medium

Pembuatan medium dilakukan sesuai dengan jenis medium yang akan dibuat. Proses pembuatan medium dilakukan dengan mengambil stok makro dan mikro masing-masing sesuai dengan takaran yang dibutuhkan, kemudian ditambahkan sukrosa, 2,4-D, PPM, dan arang aktif sesuai takaran yang diperlukan. Selanjutnya pH diukur sehingga menunjukkan pH 6 yang

dibutuhkan oleh tanaman, jika $\text{pH} < 6$ maka ditambahkan KOH 1 M beberapa tetes dan jika $\text{pH} > 6$ maka ditambahkan HCl 1 N beberapa tetes. Aquades steril dan agar dimasukkan ke dalam *erlenmeyer*, diaduk supaya homogen, lalu dipanaskan hingga mendidih. Setelah mendidih, larutan ditutup dengan plastik dan ditunggu hingga padat. Selanjutnya, larutan media tersebut disterilkan di dalam autoklaf dengan suhu 121°C atau tekanan 1 atm. Setelah selesai, media dibawa ke dalam LAF untuk ditambahkan TDZ menggunakan *millipore*, diaduk hingga homogen, kemudian dituang ke dalam botol kultur masing-masing 20 ml (Lampiran 7.b).

a. Medium NDM

Medium NDM dibuat sebanyak 800 ml yang dibagi untuk 4 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 medium NDM (medium satu perlakuan) yaitu: 0,392 g NDM; 6 g sukrosa; 0,1 ml PPM; 0,04 g arang aktif; 1,4 g agar; 0,5 mg/l TDZ (1 ml/200 ml larutan); aquades serta 2,4-D sesuai perlakuan yaitu 0 (tanpa 2,4-D), 1 mg/l (1 ml/200 ml larutan), 3 mg/l (3 ml/200 ml larutan), 5 mg/l (5 ml/200 ml larutan). Pemberian TDZ dilakukan di dalam LAF menggunakan *millipore* steril untuk mencegah terjadinya kontaminasi.

b. Medium POC

Medium POC dibuat sebanyak 800 ml yang dibagi untuk 4 perlakuan, setiap perlakuan sebanyak 200 ml, masing-masing perlakuan digunakan 10

botol kultur. Setiap botol kultur diisi sebanyak 20 ml larutan medium POC.

Bahan-bahan yang dibutuhkan untuk membuat 200 ml medium POC (medium satu perlakuan) yaitu: 0,6 ml pupuk organik cair DIGrow; 6 g sukrosa; 0,1 ml PPM; 0,04 g arang aktif; 1,4 g agar; 1 mg/l vitamin MS (2 ml/200 ml larutan); 1 mg/l mioinositol (2 ml/200 ml larutan); 0,5 mg/l TDZ (1 ml/200 ml larutan); aquades serta 2,4-D sesuai perlakuan yaitu 0 (tanpa 2,4-D), 1 mg/l (1 ml/200 ml larutan), 3 mg/l (3 ml/200 ml larutan), 5 mg/l (5 ml/200 ml larutan). Pemberian TDZ dilakukan di dalam LAF menggunakan *millipore* steril untuk mencegah terjadinya kontaminasi.

3. Perlakuan

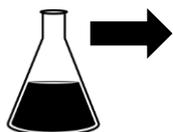
Perlakuan untuk menentukan total bahan yang dibutuhkan dilakukan dengan menghitung kebutuhan bahan pada setiap ulangan. Setiap perlakuan dibutuhkan satu erlenmeyer dengan larutan sebanyak 200 ml yang telah berisi media, sukrosa, vitamin, 2,4-D, TDZ, PPM, arang aktif, agar dan aquades. Larutan yang telah tercampur kemudian dimasukkan ke dalam botol, masing-masing botol berisi 20 ml larutan. Berikut merupakan medium perlakuan yang dibuat :

a. Medium NDM + 0 mg/l 2,4-D



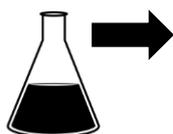
50 ml aquades (untuk melarutkan) + 0,392 g NDM + 6 g sukrosa + 0,1 ml PPM + 0,04 g arang aktif, cek dan sesuaikan pH + aquades hingga volume 199 ml + 1,4 g agar, rebus dan autoklaf, masuk ke LAF + 1 ml TDZ, bagi ke dalam 10 botol kultur.

b. Medium NDM + 1 mg/l 2,4-D



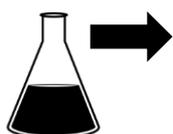
50 ml aquades (untuk melarutkan) + 0,392 g NDM + 6 g sukrosa + 1 ml 2,4-D + 0,1 ml PPM + 0,04 g arang aktif, cek dan sesuaikan pH + aquades hingga volume 199 ml + 1,4 g agar, rebus dan autoklaf, masuk ke LAF + 1 ml TDZ, bagi ke dalam 10 botol kultur.

c. Medium NDM + 3 mg/l 2,4-D



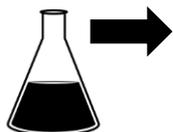
50 ml aquades (untuk melarutkan) + 0,392 g NDM + 6 g sukrosa + 3 ml 2,4-D + 0,1 ml PPM + 0,04 g arang aktif, cek dan sesuaikan pH + aquades hingga volume 199 ml + 1,4 g agar, rebus dan autoklaf, masuk ke LAF + 1 ml TDZ, bagi ke dalam 10 botol kultur.

d. Medium NDM + 5 mg/l 2,4-D



50 ml aquades (untuk melarutkan) + 0,392 g NDM + 6 g sukrosa + 5 ml 2,4-D + 0,1 ml PPM + 0,04 g arang aktif, cek dan sesuaikan pH + aquades hingga volume 199 ml + 1,4 g agar, rebus dan autoklaf, masuk ke LAF + 1 ml TDZ, bagi ke dalam 10 botol kultur.

e. Medium POC + 0 mg/l 2,4-D



50 ml aquades (untuk melarutkan) + 0,6 ml POC + 6 g sukrosa + 2 ml vitamin MS + 2 ml myo-inositol + 0,1 ml PPM + 0,04 g arang aktif, cek dan sesuaikan pH + aquades hingga volume 199 ml + 1,4 g agar, rebus dan autoklaf, masuk LAF + 1 ml TDZ, bagi ke dalam 10 botol kultur.

f. Medium POC + 1 mg/l 2,4-D



50 ml aquades (untuk melarutkan) + 0,6 ml POC + 6 g sukrosa + 2 ml vitamin MS + 2 ml myo-inositol + 1 ml 2,4-D + 0,1 ml PPM + 0,04 g arang aktif, cek dan sesuaikan pH + aquades hingga volume 199 ml + 1,4 g agar, rebus dan autoklaf, masuk LAF + 1 ml TDZ, bagi ke dalam 10 botol kultur.

g. Medium POC + 3 mg/l 2,4-D



50 ml aquades (untuk melarutkan) + 0,6 ml POC + 6 g sukrosa + 2 ml vitamin MS + 2 ml myo-inositol + 3 ml 2,4-D + 0,1 ml PPM + 0,04 g arang aktif, cek dan sesuaikan pH + aquades hingga volume 199 ml + 1,4 g agar, rebus dan autoklaf, masuk LAF + 1 ml TDZ, bagi ke dalam 10 botol kultur.

h. Medium POC + 5 mg/l 2,4-D



50 ml aquades (untuk melarutkan) + 0,6 ml POC + 6 g sukrosa + 2 ml vitamin MS + 2 ml myo-inositol + 5 ml 2,4-D + 0,1 ml PPM + 0,04 g arang aktif, cek dan sesuaikan pH + aquades hingga volume 199 ml + 1,4 g agar, rebus dan autoklaf, masuk LAF + 1 ml TDZ, bagi ke dalam 10 botol kultur.

4. Penyiapan Eksplan

Eksplan yang digunakan berupa tunas anggrek *Vanda tricolor* umur 13 bulan. Eksplan diambil dari koleksi Laboratorium Kultur *in Vitro* Fakultas

Pertanian UMY. Eksplan tunas anggrek *Vanda tricolor* yang digunakan berasal dari medium dengan penambahan ZPT yang berbeda, sehingga perlu disubkulturkan terlebih dahulu ke dalam medium NDM 0 yang berfungsi untuk menghomogenkan eksplan. Hal ini bertujuan agar eksplan tidak terpengaruh oleh bahan-bahan yang terkandung dalam medium sebelumnya. Setelah inkubasi dalam medium NDM 0 selama minimal 1 minggu, eksplan tunas anggrek *Vanda tricolor* siap digunakan untuk penanaman.

5. Inokulasi

Inokulasi dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) yang telah disterilkan terlebih dahulu dengan menyemprotkan alkohol 70% dan dikeringkan menggunakan tisu, kemudian LAF disterilisasi kembali dengan lampu UV yang dinyalakan 1 jam sebelum digunakan. Peralatan tanam yang akan digunakan juga disemprot terlebih dahulu menggunakan alkohol 70%, termasuk botol medium. Inokulasi dilakukan dengan cara mengambil eksplan tunas dari botol semai yang tersedia, kemudian ditanam pada medium kultur yang telah dipersiapkan menggunakan pinset steril. Sebelum ditanam, eksplan disterilkan dengan iodine selama beberapa menit. Setiap botol kultur diisi dengan satu buah eksplan. Botol yang sudah ditanami eksplan, selanjutnya ditutup dengan *aluminium foil*, dikencangkan menggunakan karet gelang, dan dilapisi kembali dengan plastik wrap dan diberi label (Lampiran 7.c).

6. Inkubasi

Botol-botol yang sudah diinokulasi dan ditutup rapat dengan *aluminium foil* diletakkan di rak-rak dalam ruang inkubasi. Ruang inkubasi menggunakan cahaya lampu neon (TL) sebagai pengganti sinar matahari dengan kekuatan 40

watt yang dinyalakan selama 24 jam. Suhu di dalam ruangan inkubasi diatur menggunakan AC yang bersuhu 20 - 28⁰C. Pemeliharaan dilakukan selama 2 bulan terhitung setelah penanaman (inokulasi). Rak-rak yang berada di ruang inkubasi dibersihkan dengan menyemprotkan alkohol 70% (Lampiran 7.d).

7. Pengamatan

Pengamatan dilakukan selama 8 minggu dengan variabel pengamatan pertumbuhan yaitu persentase eksplan hidup, persentase eksplan *browning*, persentase eksplan terkontaminasi, persentase eksplan vitrifikasi, waktu muncul pro-embrio, jumlah pro-embrio, persentase eksplan berkalus, waktu muncul kalus, diameter kalus, tekstur kalus, tinggi eksplan, jumlah daun, warna daun, dan pengamatan mikroskop (Lampiran 7.d).

E. Parameter yang Diamati

1. Persentase eksplan hidup (%)

Persentase eksplan hidup diamati seminggu sekali selama 8 minggu untuk melihat tingkat adaptasi eksplan terhadap medium yang diberikan. Eksplan dinyatakan hidup apabila berwarna hijau, tidak terkontaminasi, dan *browning* kurang dari separuh (<50%). Rumus persentase eksplan hidup:

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

2. Persentase eksplan *browning* (%)

Persentase eksplan *browning* diamati seminggu sekali selama 8 minggu. Eksplan dinyatakan *browning* apabila mengalami pencoklatan lebih dari separuh (>50%). Rumus persentase eksplan *browning*:

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

3. Persentase eksplan terkontaminasi (%)

Persentase eksplan terkontaminasi diamati seminggu sekali selama 8 minggu. Eksplan dinyatakan terkontaminasi apabila ada jamur atau bakteri pada eksplan dan medium kultur. Rumus persentase eksplan terkontaminasi:

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

4. Persentase eksplan vitrifikasi (%)

Persentase eksplan vitrifikasi diamati seminggu sekali selama 8 minggu. Eksplan yang mengalami vitrifikasi ditandai dengan adanya perubahan warna pada eksplan dari hijau menjadi putih bening. Rumus persentase eksplan vitrifikasi:

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

5. Waktu muncul pro-embrio (minggu)

Waktu muncul pro-embrio diamati seminggu sekali selama 8 minggu. Penentuannya dengan menghitung dari minggu pertama sejak awal penanaman hingga muncul pro-embrio pertama. Waktu muncul pro-embrio merupakan salah satu indikator pertumbuhan yang memperlihatkan sejauh mana eksplan responsif terhadap perlakuan yang diberikan.

6. Jumlah pro-embrio

Jumlah pro-embrio diamati seminggu sekali selama 8 minggu. Pengamatan jumlah pro-embrio dicatat apabila terdapat pro-embrio baru yang muncul pada eksplan. Pro-embrio dapat terlihat di bagian pangkal batang, bagian tengah batang, maupun bagian atas batang. Pro-embrio dapat berkembang menjadi akar dan tunas.

7. Persentase eksplan berkalus (%)

Persentase eksplan berkalus diamati seminggu sekali selama 8 minggu. Pengamatan dilakukan apabila ada kalus yang terbentuk pada eksplan (kalus tidak terkontaminasi dan tidak mengalami pencoklatan/*browning*). Kalus dapat tumbuh pada permukaan batang eksplan maupun pada permukaan daun eksplan. Rumus persentase eksplan berkalus:

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

8. Waktu muncul kalus (hari)

Waktu muncul kalus diamati 2 hari sekali selama 8 minggu. Waktu muncul kalus merupakan salah satu indikator pertumbuhan yang memperlihatkan sejauh mana eksplan responsif terhadap perlakuan yang diberikan. Penentuannya dengan menghitung dari minggu pertama sejak awal penanaman hingga muncul kalus pertama.

9. Diameter kalus (mm)

Diameter kalus diamati seminggu sekali selama 8 minggu. Diameter kalus dihitung dengan mengukur lebar diameter kalus dengan satuan yang digunakan milimeter (mm). Pengukuran dilakukan dengan menggunakan penggaris yang ditempelkan pada luar botol dan menghitung lebar diameter kalus yang terbentuk pada eksplan.

10. Tekstur kalus

Tekstur kalus diamati seminggu sekali selama 8 minggu. Pengamatan dilakukan pada eksplan yang terbentuk kalus. Macam tekstur kalus yakni *spongy* (kapas), *compact* (padat) dan *friable* (remah). Tekstur kalus yang

embriogenik adalah tekstur yang *friable* (remah) karena lebih mudah untuk dipisahkan antara sel satu dengan lainnya.

11. Tinggi eksplan (mm)

Tinggi eksplan diamati seminggu sekali selama 8 minggu. Pengamatan tinggi eksplan diukur dalam satuan milimeter (mm) dengan menggunakan penggaris yang ditempelkan pada luar botol dan mengukur tinggi eksplan dari permukaan medium kultur sampai daun tertinggi eksplan. Pengamatan tinggi eksplan bertujuan untuk mengetahui adanya pertumbuhan pada eksplan dari awal penanaman hingga akhir pengamatan.

12. Jumlah daun (helai)

Jumlah daun diamati seminggu sekali selama 8 minggu. Pengamatan jumlah daun dicatat apabila terdapat kemunculan daun baru pada eksplan. Pengamatan jumlah daun bertujuan untuk mengetahui adanya penambahan jumlah daun dari awal penanaman hingga akhir pengamatan yang menunjukkan pertumbuhan eksplan.

13. Warna daun

Warna daun diamati seminggu sekali selama 8 minggu. Pengamatan warna daun dilakukan dengan menggunakan *Munsell Plant Tissue Colour Chart*. Pengamatan warna daun bertujuan untuk mengetahui adanya perubahan warna daun pada eksplan. Setiap perubahan warna daun diamati dan dicatat pada saat melakukan pengamatan. Hasil pengamatan warna daun dinyatakan dalam bentuk skoring. Semakin hijau warna daun maka nilai tingkatan skoring semakin besar (Tabel 1).

Tabel 1. Skoring Warna Daun

Tingkatan	Warna	Gambar
4 (++++)	5 GY 7/4 – 7/8	
3 (+++)	2,5 GY 8/2 – 8/12	
2 (++)	5 Y 8/2 – 8/12	
1 (+)	2,5 Y 8/2 – 8/10	

14. Pengamatan mikroskop

Pengamatan mikroskop dilakukan pada minggu ke-4 dan minggu ke-8 setelah tanam. Pengamatan mikroskop bertujuan untuk mengetahui perkembangan kalus dan fase embrio pada eksplan secara detail menggunakan mikroskop Stereo SZM45 B2 + Optilab *advance* pada perbesaran 0,7 dan perbesaran 0,8 apabila terbentuk fase globular, heart, torpedo, dan kotiledon.

F. Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan sidik ragam atau *Analysis of variance* (Annova) pada taraf kesalahan α 5%. Uji lanjut dilakukan dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) apabila terdapat beda nyata antar perlakuan pada taraf kesalahan α 5%. Hasil penelitian dari berbagai perlakuan disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.