

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

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

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur *In Vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan Agustus sampai Oktober 2018.

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

1. Alat :

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain timbangan analitik, *Hot Plate Magnetic Stirrer*, botol kultur, pH stik, pipet tetes, gelas ukur, erlenmeyer, jarum suntik, pinset, *Laminar Air Flow* (LAF), aluminium foil, *dissecting kits*, autoklaf, dan bunsen.

2. Bahan :

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah eksplan steril tunas Anggrek *Vanda tricolor* umur 8 bulan, medium VW (*Vacint and Went*), NDM (*New Doghasima Medium*), MS (*Murashige and Skoog*), BAP, NAA 0,5 mg/l.

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

Metode penelitian yang digunakan adalah metode percobaan laboratorium yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal dengan perlakuan yang diujikan adalah kombinasi dari medium NDM, VW, MS dan konsentrasi BAP yaitu 0 mg/l, 0,5 mg/l, dan 1 mg/l. Setiap perlakuan diulang 10 kali, sehingga diperoleh 90 unit perlakuan. Tiap perlakuan ditambahkan NAA 0,5 mg/l dan arang aktif 0,2g/l serta PPM (*plant preservative mixture*) 0,5 ml/l.

Kombinasi perlakuan yang diuji yaitu :

M1 = Medium NDM + BAP 0 mg/l

M2 = Medium NDM + BAP 0,5 mg/l

M3 = Medium NDM + BAP 1 mg/l

M4 = Medium VW + BAP 0 mg/l

M5 = Medium VW + BAP 0,5 mg/l

M6 = Medium VW + BAP 1 mg/l

M7 = Medium MS + BAP 0 mg/l

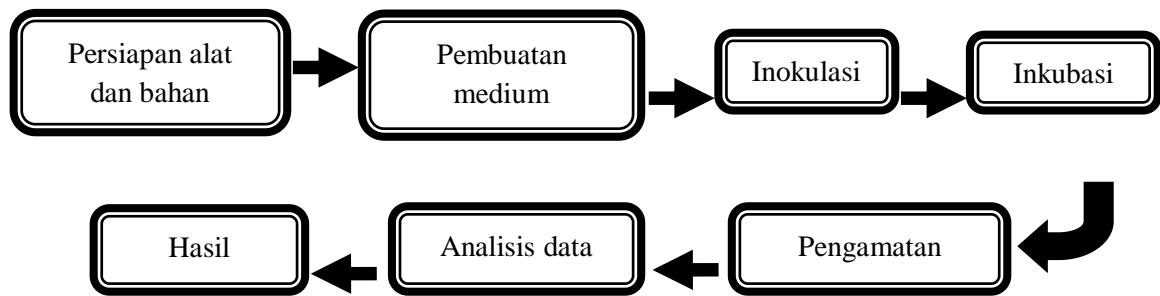
M8 = Medium MS + BAP 0,5 mg/l

M9 = Medium MS + BAP 1 mg/l

Semua perlakuan ditambah NAA 0,5 mg/l

#### **D. Cara Penelitian**

Tata laksana dalam penelitian ini mencakup beberapa tahap. Tahapan awal yang dilakukan adalah persiapan alat dan bahan untuk inokulasi eksplan. Tahap selanjutnya adalah pembuatan medium yang akan digunakan eksplan sebagai tempat tumbuh. Inokulasi eksplan dilakukan setelah medium dibuat. Eksplan diletakkan di tempat yang sesuai lingkungan tumbuh eksplan dan tahap ini adalah inkubasi. Pengamatan dilakukan selama inkubasi dan dilakukan pencatatan periodik agar mendapatkan data. Data dianalisa untuk diolah agar didapatkan hasil penelitian yang telah dilakukan



### 1. Persiapan alat dan bahan dan sterilisasi

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian disiapkan. Harus dipastikan bahwa semua alat dan bahan yang diperlukan telah tersedia, agar penelitian berjalan dengan lancar. Eksplan disiapkan dari PLB steril umur 8 bulan. Sterilisasi alat dilakukan dengan dua metode yaitu metode sterilisasi basah dan bakar. Sterilisasi basah dilakukan untuk botol kultur, gelas piala, petridish, erlemeyer, pinset, dan pipet. Alat-alat tersebut dibungkus dengan kertas payung kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf dengan tekanan 1 atm selama 30 menit. Sterilisasi bakar dilakukan dalam *Laminar Air Flow* (LAF) sebelum proses penanaman dengan memasukkan alat (skalpel, gunting, pinset) ke dalam alkohol 70% kemudian dibakar di atas lampu Bunsen.

### 2. Pembuatan medium

Medium yang digunakan sebagai tempat tumbuh eksplan PLB Anggrek pada kultur *in vitro* ini yaitu medium VW, NDM dan MS sebanyak 1800 ml dengan masing masing medium dibuat sebanyak 600 ml yang terbagi menjadi 9 perlakuan, setiap perlakuan sebanyak 200 ml, masing masing perlakuan digunakan 10 botol kultur. Setiap botol kultur diisi sebanyak 20 ml medium.

Bahan-bahan yang dibutuhkan untuk 200 ml ; medium NDM 0,392 g ; medium VW 0,334 g ; medium MS 0,866 g ; Phytigel 0,5 g ; sukrosa 6 g ; PPM

0,1 ml ; Arang aktif 0,2 g/l dan Zat Pengatur Tumbuh dengan konsentrasi BAP 0 mg/l yaitu 0 ml ; BAP 0,5 mg/l yaitu 1 ml ; dan BAP 1 mg/l yaitu 2 ml.

Larutan stok terlebih dahulu dibuat untuk mempermudah dalam pembuatan medium. Pembuatan larutan stok bertujuan agar tidak perlu dilakukan penimbangan kembali setiap membuat medium dan menghindari kesalahan penimbangan jika bahan yang ditimbang sedikit. Pembuatan stok ZPT dengan cara menimbang ZPT sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 100 ml aquades steril dan ZPT dilarutkan, BAP dilarutkan dengan HCL dan NAA dilarutkan dengan KOH serta diberi pelabelan pada botol stok 1 mg ZPT sama dengan 10 ml.

### 3. Penanaman eksplan

#### a. Persiapan Eksplan

Eksplan yang digunakan berasal PLB steril tanaman anggrek *Vanda Tricolor* umur 8 bulan. Eksplan yang akan digunakan terlebih dulu diseleksi guna memilih eksplan yang sehat dan terhindar dari bakteri dan jamur.

#### b. Sterilisasi Eksplan

Eksplan anggrek direndam dalam betadine sebanyak tiga tetes selama tiga menit. Setelah itu, eksplan dibilas dengan aquadest steril sebanyak tiga kali sampai bersih. Pencelupan ke bakterisida dan fungisida diperlukan agar eksplan tidak terkontaminasi bakteri dan jamur pada saat proses kultur *in vitro* berlangsung.

#### c. Sterilisasi *Laminar Air Flow* (LAF)

*Laminar Air Flow* disterilkan dengan disemprot alkohol 70% dan diterangi lampu UV selama satu jam sebelum digunakan. Menyalakan

blower lima menit sebelum pelaksanaan penanaman dan memasukkan alat-alat penanaman seperti pinset, skalpel, gelas ukur, gunting, dan botol kultur berisi medium tanam steril, lampu spiritus, petridis ke dalam *Laminar Air Flow* (LAF).

d. Inokulasi Eksplan

Multiplikasi dilakukan dengan cara memindahkan eksplan menggunakan pinset dari medium lama ke medium perlakuan secara aseptik di dalam *Laminar Air Flow* (LAF).

4. Inkubasi

Proses inkubasi dimulai dengan mensterilkan rak-rak inkubasi dengan menyemprotkan alkohol 70% dan dilap dengan kain bersih. Suhu ruang inkubasi kultur antara 24-27 °C dan kelembaban berkisar 70% serta intensitas cahaya 1000 lux selama 24 jam setiap harinya. Botol-botol diletakkan secara acak kemudian diamati pertumbuhannya sesuai dengan parameter pengamatan yang telah ditentukan.

### **E. Parameter Yang Diamati**

Variabel yang diamati pada penelitian ini antara lain, persentase eksplan hidup, persentase eksplan *browning*, persentase eksplan terkontaminasi, waktu eksplan *browning*, waktu eksplan terkontaminasi, jumlah tunas tiap perlakuan, dan tinggi tunas eksplan.

1. 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 diakhir pengamatan dengan rumus :

Rumus :

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

2. Presentase 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 :

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

3. 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 ekplan terkontaminasi

Rumus :

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

4. Waktu muncul tunas

Waktu muncul tunas merupakan salah satu indikator pertumbuhan yang memperlihatkan kecepatan tumbuh eksplan. Waktu muncul tunas diamati

setiap minggu. Penentuannya dengan menghitung dari minggu pertama (awal penanaman) hingga muncul tunas pertama

5. Jumlah tunas tiap perlakuan

Jumlah tunas merupakan faktor terpenting dalam multiplikasi tanaman pada kultur *in vitro*. Perhitungan jumlah tunas dilakukan pada keseluruhan tunas yang muncul pada eksplan baik itu tunas yang berasal dari pemanjangan mata tunas maupun tunas adventif (bukan berasal dari mata tunas). Jumlah tunas yang terbentuk diamati pada masing-masing botol, pengamatan dilakukan setiap minggu sekali selama 8 minggu.

6. Persentase eksplan bertunas

Pengamatan dilakukan dengan melihat tunas yang terbentuk pada setiap perlakuan. Dilakukan setiap minggu sekali selama 8 minggu dan dinyatakan dalam persen (%).

Rumus:

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

7. Tinggi tunas

Tinggi tunas diukur mulai pangkal sampai pucuk tiap minggu sekali selama 8 minggu dengan satuan milimeter (mm). Tunas yang diukur adalah tunas yang paling tinggi.

8. Jumlah daun

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.

## 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).