

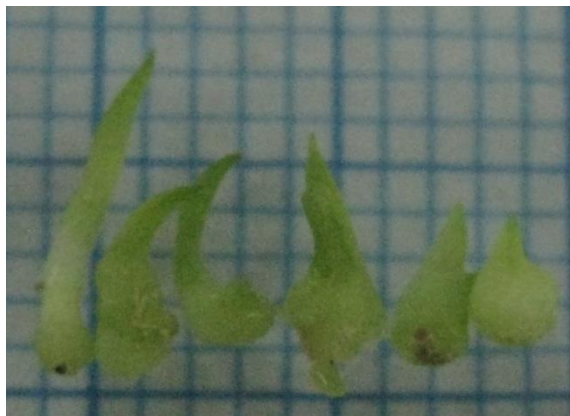
III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung mulai bulan Oktober 2011 hingga Maret 2012.

3.2 Bahan dan Alat

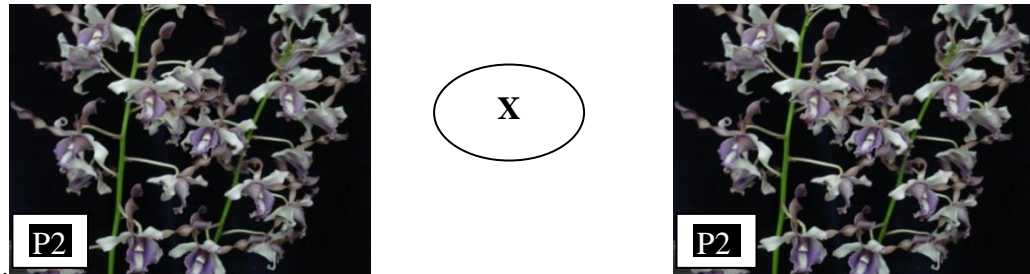
Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah protokorm anggrek *Dendrobium* yang telah dikecambahkan selama 2 – 3 bulan (Gambar 1).



Gambar 1: Ukuran protokorm sebagai bahan tanam yang digunakan

Tanaman tersebut berasal dari Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Pertanian Unila, dengan nomor silangan P₂ *selfing*, dari bentuk mahkota yang keriting anggrek P₂ *selfing* tergolong ke dalam anggrek jenis Spatulata (Kamemoto *et al.*, 2004).

Untuk pembesaran ini, protokorm disubkultur secara aseptik dengan menyendok 10 protokorm ke dalam botol kultur yang telah berisikan media.



Gambar 2: Gambar persilangan tetua anggrek yang dijadikan bahan perbanyakan tanaman.

Bahan lain yang digunakan yaitu spirtus, aquades, agar-agar, air kelapa, garam-garam makro dan mikro $\frac{1}{2}$ MS dan arang aktif. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *laminar air flow cabinet* (L AFC), pembakar bunsen, timbangan elektrik, pH meter, autoklaf, gelas ukur, erlenmeyer, alat-alat diseksi, alat-alat gelas, magnetic stirer, kereta dorong, dan alat tulis. Sementara alat yang digunakan saat tahap pemeliharaan yaitu rak kultur dengan ruangan bersuhu $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ dan lampu fluoresens (TL) berintensitas 1000 lux.

3.3 Metode Penelitian

Percobaan dilakukan menggunakan rancangan acak kelompok (RAL) dengan 8 perlakuan, masing-masing perlakuan memiliki 5 ulangan. Dalam 1 ulangan, setiap perlakuan terdiri dari 8 botol kultur, dan dalam 1 botol kultur terdapat 10 tanaman (protokorm).

Rancangan perlakuan yang digunakan adalah rancangan perlakuan faktorial 2 x 4. Faktor pertama adalah (tanpa arang aktif 2 g/l dan arang aktif 2 g/l). Faktor kedua penggunaan air kelapa (0, 50, 100, 200 ml/l). Homogenitas ragam antar perlakuan diuji dengan uji Barlett, sedangkan aditivitas diuji dengan uji Tukey. Bila kedua asumsi terpenuhi, maka analisis data dilanjutkan dengan sidikragam. Pemisahan nilai tengah dengan uji BNT pada taraf 5%.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan yaitu botol kultur, cawan petri, alat-alat diseksi seperti: gunting, pinset, spatula, gagang skapel, pisau bedah, dan alat-alat gelas lainnya. Peralatan tersebut dicuci terlebih dahulu dengan air yang mengalir dan diberi sabun lalu dibungkus dengan kertas dan dibalut dengan plastik setelah kering. Kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf selama 30 menit pada tekanan 1,2 kg/cm² dengan suhu 121 °C.

3.4.2 Media Perlakuan

Media dasar yang digunakan untuk perlakuan dalam penelitian ini adalah media ½ MS (Murashige dan Skoog, 1962). Media dasar tersebut ditambahkan dengan air kelapa dengan konsentrasi 0, 50, 100 dan 200 ml sesuai dengan perlakuan dan dikombinasikan dengan atau tanpa 2 g/l arang aktif.

Media ½ MS (Murashige dan Skoog, 1962) dibuat dengan cara memasukan larutan stok makro dan CaCl₂, dengan jumlah takaran setengah dari formulasi (Murashige dan Skoog, 1962) yaitu stok makro (10 x) diambil 50 ml/l dan CaCl₂ (100 x) diambil 5 ml/l, sedangkan untuk stok mikro A dan B (100 x = 10 ml/l), Fe

(100 x = 10 ml/l), vitamin (100 x= 10 ml/l) dan myo inositol (10 x = 100 ml/l) tetap dengan formulasi utuh ke dalam akuades, kemudian ditambahkan air kelapa sebanyak 0, 50, 100, 200 ml/l air kelapa pada masing-masing perlakuan dan ditambahkan gula sebanyak 20 g/l, lalu ditera hingga 1 liter.

Setelah larutan media dibuat, diatur pH-nya hingga 5,8 dengan menambahkan KOH 1 N bila pH kurang dari 5,8 dan HCl 1 N bila pH lebih dari 5,8. Untuk media yang diberi 2 g/l arang aktif, waktu pemberiannya bersamaan saat menyampurkan agar-agar sebanyak 7 g/l, lalu media dimasak hingga mendidih selama 10 menit. Setelah mendidih, larutan media dimasukkan ke dalam botol-botol kultur sebanyak 20 ml/botol, lalu tutup dengan plastik dan diikat dengan karet gelang. Botol-botol berisi media tersebut kemudian diautoklaf dengan tekanan 1,2 kg/cm² dengan suhu 121⁰C selama 15 menit.

3.4.3 Bahan Tanam

Tanaman yang digunakan adalah protokorm anggrek *Dendrobium* yang berasal dari pengecambahan protokorm dari persilangan P₂ *selfing* atau tergolong anggrek jenis *Spatulata* (Kamemoto *et al.*, 2004). Penanaman protokorm tersebut dilakukan seperti metode subkultur, dengan cara mengambil dari media sebelumnya secara aseptik di dalam *laminar air flow cabinet* lalu menanamnya pada media perlakuan. Protokorm yang digunakan dengan memiliki bobot awal 10 protokorm yaitu 0,023 g.

3.4.4 Pemeliharaan Kultur

Semua kultur pada percobaan dipelihara di rak-rak kultur di dalam ruang kultur bersuhu 25° ± 2 °C dengan menggunakan lampu fluorescence (TL) berintensitas ±

1000 Lux. Kultur dipelihara selama 4 bulan tanpa di subkultur, lalu dilakukan pengamatan setiap bulannya dengan pengambilan gambar menggunakan kamera digital terhadap tanaman pada masing-masing perlakuan.

3.4.5 Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada kultur berumur empat bulan atau sekitar 16 minggu setelah tanam dan sudah dikeluarkan dari botol kultur.

Variable yang diamati yaitu:

1. Tinggi tanaman

Tinggi tanaman diukur dari pangkal daun tanaman sampai ujung daun terpanjang dengan menggunakan mistar lalu dirata-rata dalam satuan senti meter (cm).

2. Jumlah daun

Penghitungan jumlah daun dilakukan dengan menghitung jumlah daun tanaman yang membuka sempurna dalam satuan helai.

3. Panjang daun

Pengamatan panjang daun dilakukan dengan menghitung panjang daun tanaman anggrek *Dendrobium* sp. Penghitungan panjang akar dilakukan pada akhir pengamatan dalam satuan helai daun terpanjang.

4. Panjang akar

Panjang akar diukur dari pangkal akar sampai ujung akar dengan menggunakan mistar lalu dirata-rata dalam satuan senti meter (cm).

Pengukuran panjang akar dilakukan dengan mengukur tiga akar terpanjang dan dirata-ratakan.

5. Bobot basah

Pengukuran bobot basah tanaman dilakukan dengan cara menimbang tanaman tersebut dalam satuan gram (g).

6. Foto

Pengambilan gambar dilakukan setiap 1 bulan sekali untuk mengetahui pertumbuhan tanaman.