

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Lampung pada bulan Desember 2011 hingga Maret 2012.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), botol kultur, gelas ukur, labu takar, bunsen, erlenmeyer, cawan petri, pinset, spatula, *hand sprayer*, neraca elektrik, pH meter, botol scotts, magnetic stirrer, karet gelang, plastik, plastik *wrapp*, milimeter blok, kamera dan alat tulis. Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah protokorm anggrek *Dendrobium* yang telah dikulturkan *in vitro* selama kurang lebih 10 minggu sejak penyemaian biji yang sudah mempunyai primordia daun dengan bobot rata-rata 0,1 gram (Gambar 1).



Gambar 1. Ukuran bahan tanam yang digunakan sebagai eksplan

Bahan tanam yang digunakan adalah protokorm hasil dari persilangan anggrek *Dendrobium* sp. dengan nomor persilangan P9 x P7.



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

Selain bahan tanam diatas, bahan-bahan lain yang digunakan yaitu pupuk Growmore (32:10:10), berbagai konsentrasi air kelapa (0, 50, 100, dan 200 ml/l), arang aktif 2 g/l, sukrosa, mio-inositol, vitamin MS, dan agar-agar. Bahan-bahan lain yang digunakan adalah spiritus, aquades, Bayclin, detergen, KOH 1 N, dan HCl 1 N.

3.3 Metode Penelitian

Percobaan dilakukan menggunakan rancangan teracak sempurna (RTS) dengan 8 perlakuan, masing-masing perlakuan memiliki 5 ulangan. Setiap ulangan terdiri dari 5 botol. Setiap satuan percobaan terdiri dari satu botol kultur yang berisi 10 protokorm yang sudah memiliki primordia daun dan akar, berumur kurang lebih 10 minggu sejak penyemaian biji anggrek secara aseptik dan *in vitro*.

Rancangan perlakuan yang digunakan adalah rancangan perlakuan faktorial 2x4. Faktor pertama adalah tanpa arang aktif dan dengan arang aktif (2 g/l) serta faktor kedua adalah berbagai konsentrasi air kelapa : 0, 50, 100, dan 200 ml/l. Homogenitas ragam antar perlakuan diuji dengan uji Barlett. Dari data yang diperoleh, dilakukan analisis ragam dan kemudian, dilanjutkan dengan pemisah nilai tengah menggunakan uji beda nyata terkecil (BNT) pada taraf nyata 5 %.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Sterilisasi Alat

Peralatan yang digunakan untuk menanam sebelumnya harus disterilisasi. Alat-alat tersebut yaitu berupa botol kultur, petridish, pinset, spatula, dan alat-alat gelas lainnya. Peralatan tersebut dicuci terlebih dahulu lalu disterilisasi menggunakan autoklaf selama 30 menit pada tekanan 1,2 atm dengan suhu 121⁰C.

3.4.2 Pembuatan Media kultur

Media dasar yang digunakan untuk perlakuan dalam penelitian ini adalah 2 g/l Growmore (32:10:10) dengan konsentrasi 2 g/l. Pada media dasar tersebut dimasukkan dengan masing-masing perlakuan konsentrasi air kelapa (0, 50, 100, dan 200 ml/l) dan dikombinasikan dengan dan tanpa arang aktif 2 g/l. Jenis air kelapa yang digunakan yaitu air kelapa muda yang belum terbentuk daging kelapa. Media Growmore dibuat dengan cara, pupuk Growmore biru dimasukkan sebanyak 2 g/l ke dalam gelas beaker, lalu diberi air hingga larut. Setelah itu masukkan sukrosa sebanyak 20 g/l, vitamin MS, dan mio-inositol lalu tera hingga satu liter (Tabel 2.). Setelah ditera, lalu diatur pH larutan hingga menjai 5,8 dengan menambahkan

KOH 1 N bila pH kurang dari 5,8 dan HCl 1N bila pH lebih dari 5,8. Pada media yang diberi 2 g/l arang aktif, waktu pemberiannya bersamaan saat mencampurkan 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 ikat dengan karet gelang. Botol-botol berisi media tersebut kemudian diautoklaf dengan tekanan 1,2 atm dengan suhu 121 °C selama 7 menit.

Tabel 2. Formulasi media dasar Growmore

No	Komponen media	Konsentrasi
1	Pupuk Growmore Biru (32:10:10)	2.000 mg/l
2	Vitamin MS	
	Asam nikotinat	0,5 mg/l
	Piridoksin-HCl	0,5 mg/l
	Tiamin-HCl	0,1 mg/l
	Glisin	2 mg/l
3	Sukrosa	20.000 mg/l
4	Agar-agar	7.000 mg/l
5	Mio-inositol	100 mg/l
6	Arang aktif	2.000 g/l (sesuai perlakuan)
7	Air kelapa	(0,50,100, dan 200 ml/l) (sesuai perlakuan)

3.4.3 Eksplan

Pada penelitian ini yang digunakan adalah protokorm anggrek *Dendrobium* hibrida berukuran 0,5-0,7 cm, yang berasal dari kultur steril *in vitro* hasil persilangan tetua P9 x P7. Protokorm yang ditanam di media perlakuan yaitu protokorm yang berprimordia daun dan umur 10 minggu sejak penyemaian biji *in vitro*.

3.4.4 Penanaman protokorm secara *in vitro*

Penanaman eksplan dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet*. Eksplan berupa protokorm diambil menggunakan spatula sebanyak 10 butir protokorm yang berprimordia daun, kemudian disebar pada media perlakuan. Setelah itu botol ditutup dengan plastik dan diikat dengan karet gelang, lalu botol dibungkus dengan plastik *wrapp*. Botol-botol yang telah berisi eksplan diletakkan pada rak-rak kultur di dalam ruang kultur bersuhu $24^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dengan penerangan lampu *fluorescence* berintensitas ± 1000 Lux. Kultur-kultur tersebut dipelihara selama 4 bulan atau 16 minggu tanpa adanya kegiatan subkultur.

3.4.5 Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada umur empat bulan setelah penanaman protokorm. Dalam perkembangannya, protokorm yang ditanam akan menjadi *seedling* atau bibit anggrek kecil yang sudah lengkap akar, batang semu, dan daun. Variabel yang diamati setelah 16 minggu masa petumbuhan protokorm adalah:

1. Tinggi tunas

Tinggi tunas diukur dari pangkal batang tanaman sampai 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

Panjang daun diukur dari pangkal akar hingga ujung daun terpanjang dengan menggunakan mistar dalam satuan senti meter (cm).

4. Panjang akar

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

5. Bobot basah

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

6. Foto

Pengambilan gambar dilakukan setiap kegiatan pengamatan.