

III. METODE PENELITIAN

Penelitian ini terdiri 4 percobaan yaitu :

- I. Persilangan dialel lengkap dua tetua anggrek *Phalaenopsis*.
- II. Pengaruh media dasar dan arang aktif terhadap pengecambahan biji anggrek *Phalaenopsis in vitro*
- III. Pengaruh beberapa jenis adenda terhadap pertumbuhan *seedling Phalaenopsis in vitro*, dan
- IV. Pengaruh BA atau GA terhadap pertumbuhan planlet *Phalaenopsis* pada saat aklimatisasi.

3.1 Percobaan 1. Persilangan dialel lengkap dua anggrek *Phalaenopsis*

Percobaan ini dilakukan dari bulan September 2009 sampai hingga bulan April 2011. Percobaan ini bertujuan untuk mempelajari kompatibilitas dua tetua anggrek *Phalaenopsis* yaitu *Phalaenopsis* putih lidah kuning (P1) dan *Phalaenopsis* ungu (P2) yang penampilan kuntum bunganya ungu polos dengan tetua jantan *Phalaenopsis* putih (Gambar 1). Persilangan dianggap berhasil jika didapatkan polong buah berbiji viabel. Pada kedua tetua dilakukan persilangan dialel lengkap, sebagaimana Tabel 1 sehingga terdapat empat persilangan yaitu P1 x P1, P1 x P2, P2 x P1 dan P2 x P2. Tetua yang disebutkan pertama adalah

tetua betina, sedangkan yang disebutkan berikutnya adalah tetua jantan. Untuk setiap pasangan tetua dilakukan persilangan sebanyak tiga kali sehingga seluruhnya terdapat 12 kali persilangan. Bunga *Phalaenopsis* putih lidah kuning dan *Phalaenopsis* ungu diperoleh dari pasar bunga di Bandar Lampung.

Tabel 3. Persilangan dialel lengkap dua tetua anggrek *Phalaenopsis*.

Tetua Persilangan	P1 (<i>Phalaenopsis</i> putih)	P2 (<i>Phalaenopsis</i> ungu)
P1 (<i>Phalaenopsis</i> putih)	P1 x P1 = P1 <i>selfing</i>	P1 x P2
P2 (<i>Phalaenopsis</i> ungu)	P2 x P1	P2 x P2 = P2 <i>selfing</i>



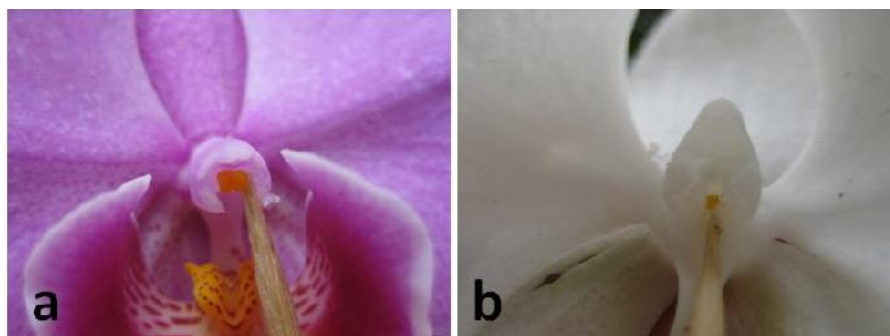
Gambar 2. Kuntum Bunga Tetua *Phalaenopsis*.

- a. Kuntum bunga tetua *Phalaenopsis* putih lidah kuning (P1)
- b. Kuntum bunga tetua *Phalaenopsis* ungu (P2).

Dari persilangan dialel lengkap tersebut diharapkan akan didapat polong buah yang berbiji viable, dan jika biji anggrek dikecambahkan secara in vitro akan didapatkan populasi tanaman hasil silangan. Waktu yang baik untuk penyerbukan adalah pada pagi hari.

Cara menyilangkan bunga *Phalaenopsis* adalah sebagai berikut.

1. Mula-mula ditentukan bunga yang akan digunakan sebagai induk jantan dan induk betina. Misalnya paada persilangan, P1 X P2, bunga tanaman P1 digunakan sebagai tetua betina sedangkan pollen diambil dari bunga tanaman P2.
2. Dengan sepotong lidi runcing atau tusuk gigi yang telah dibasahi atau ditempelkan ke putik supaya lengket, pollinia (serbuk sari) diambil dari kantong sari (*anther cap*) bunga tetua jantan. *Anther cap*” dicungkil” dan diusahakan agar serbuk sari berwarna kuning menempel diujung lidi.
3. Selanjutnya, pollinia ditempelkan ke lubang putik bunga pada tetua betina.(Gambar 3b).
4. Setelah penyerbukan, sebaiknya bibir bunga yang telah diserbuki dilepaskan supaya tidak menjadi landasan bagi serangga yang mungkin dapat menggugurkan serbuk sari atau membawa serbuk sari baru. Setiap bunga yang sudah diserbukkan diberi label pada tangkai bunga, bertuliskan tanggal penyerbukan dan kode atau nama tetua betina dan jantan.
5. Penyerbukan yang berhasil ditandai oleh membesarnya bakal buah dan layunya perhiasan bunga, beberapa hari setelah persilangan.



Gambar 3. Cara Menyilangkan a. Pollinia diambil dari tetua jantan, dan b. pollinia diletakkan atau dimasukkan dengan tusuk gigi ke putik tetua betina.

Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada 4 bulan setelah penyerbukan, untuk mengevaluasi pasangan persilangan *resiprocal* dan/atau *selfing* mana saja dari kedua tetua yang mengalami pembuahan dan fertilisasi, yang ditandai dengan perkembangan polong buah setelah penyerbukan bunga. Variabel yang diamati adalah keberhasilan penyerbukan (jadi atau tidaknya polong buah). Setelah berumur 4 bulan sejak persilangan, polong buah dipanen dan siap untuk dikecambahkan dilaboratorium pada media yang telah ditentukan (Percobaan 2).

3.2.Percobaan. 2. Pengaruh media dasar dan arang aktif terhadap pengecambahan biji angrek *Phalaenopsis in vitro*.

Tujuan percobaan ini adalah untuk memperoleh komposisi media kultur yang optimal untuk pengecambahan *Phalaenopsis in vitro* dengan kualitas protokorm dan seedling yang baik. Percobaan ini dilaksanakan mulai bulan Januari 2010 sampai dengan bulan Oktober 2010 di Laboratorium Ilmu Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

3.2.1 Bahan tanaman

Untuk bahan tanaman percobaan 2, dua tetua anggrek yaitu *Phalaenopsis* berbunga merah bertotol disilangkan dengan *Phalaenopsis* berbunga putih (Gambar 4) dan pada umur 4 bulan 2 minggu setelah penyerbukan di hasilkan polong buah yang bijinya siap ditanaman (Gambar 5).



Gambar 4. Polong buah *Phalaenopsis* yang dipanen pada umur 4 bulan 2 minggu.

3.2.2 Media Kultur untuk Pengecambahan Biji

Media kultur yang digunakan dalam percobaan ini adalah dari formulasi Murashige dan Skoog dan pupuk Growmore, dengan atau tanpa penambahan arang aktif. Kedua formulasi media tersebut mengandung 20 g/l sukrosa, vitamin-vitamin MS, yaitu Formulasi media MS mengandung hara-hara makro (N, P, K, Ca, Mg, dan S), hara-hara mikro (Cu, Co, Mo, Mn, Zn, B, Fe), energi dalam bentuk sukrosa, gula alkohol (mio-inositol) dan beberapa vitamin (thiamin, piridoksin, asam nikotinat, dan bahan organik dan 150 mg/l air kelapa muda. Formulasi media MS dan Growmore yang digunakan di sajikan pada tabel 2 dan tabel 3 semua media diatur pH-nya menjadi 5,8 sebelum diberi pematat media

yaitu 7 g/l bubuk agar-agar. Sterilisasi media dilakukan dengan autoklaf pada suhu 121⁰ C dan tekanan 1,5 kg/cm² selama 15 menit.

3.2.3 Disain Percobaan

Percobaan dilaksanakan dengan rancangan acak lengkap dengan tiga ulangan.

Perlakuan yang dicobakan adalah M1= media MS, M2= media MS + 2 g/l arang aktif, M3= media GrowMore, dan M4 = media Growmore + 2 g/l arang aktif.

Setiap satuan percobaan terdiri dari satu botol kultur berisi masing-masing media perlakuan, yang di atas permukaannya ditaburkan biji angrek *Phalaenopsis* dengan jumlah yang diusahakan sama, yaitu ditakar dengan ujung spatula steril.

Pengamatan dilakukan mulai dari umur 1 minggu hingga 8 minggu (2 bulan) setelah tanam. Variabel yang diamati adalah jumlah protokorm perbotol dan biji yang berkecambah menjadi protokorm *Phalaenopsis*.

3.2.4 Sterilisasi Polong, Penanaman Biji dan Kondisi Ruang Kultur

Sebelum disterilkan, polong buah *Phalaenopsis* dicuci dibawah air keran yang mengalir setelah diberi dengan detergen di permukaannya. Sterilisasi polong buah angrek dilakukan didalam laminar air-flow cabinet (L AFC). Mula-mula polong buah direndam dan dikocok dalam larutan Bayclin 30% selama 15 menit lalu dibilas air steril 3 kali. Setelah itu polong buah dicelup ke dalam spritus dengan cepat dan dibakar sampai nyala api di permukaan buah hilang. Pembakaran dilakukan dua kali. Setelah itu, polong diletakkan di atas cawan petri steril dan

dipotong bagian ujung dan pangkalnya dan dibelah dikedua sisinya sehingga biji-biji seperti debu tampak.

Penanaman biji dilakukan dengan menaburkan sejumlah biji yang volumenya diusahakan sama menggunakan ujung spatula keatas permukaan media perlakuan. Setelah biji ditabur, botol ditutup kembali dan diikat dengan karet.

Kemudian diletakkan dirak-rak diruang kultur yang suhunya 24-28⁰C dengan pencahayaan lampu fluoresens ± 1000 lux.

3.2.5 Pengamatan

Pengamatan dilakukan mulai dari umur 1 minggu hingga 8 minggu setelah tanam. Variabel yang diamati persentase protokorm dan bobot 100 protokorm setelah tanaman berkecambah.

Pengamatan dilakukan pada tiga bulan setelah tanam biji dengan menghitung persentase biji yang berkecambah. Caranya, protokorm pada perlakuan yang tampaknya semua bijinya berkecambah dihitung dan jumlah tersebut dianggap biji berkecambah 100%. Kemudian protokorm pada perlakuan lainnya dihitung dan jumlahnya dibandingkan dengan yang jumlah protokorm terbanyak tadi lalu dikalikan 100%.

Percobaan 3. Pengaruh beberapa macam adenda terhadap pertumbuhan seedling *Phalaenopsis in vitro*.

3.3. Disain Percobaan

Percobaan ini dilaksanakan dengan rancangan kelompok teracak lengkap dengan 3 kelompok dan empat perlakuan. Perlakuan yang dicobakan adalah empat macam adenda yaitu A1= air kelapa, A2= bubur pisang, A3= ekstrak tomat dan A4 = ekstrak kentang. Setiap perlakuan diulang tiga kali. Setiap satuan percobaan terdiri dari satu botol kultur berisi sekitar 20 protokorm *Phalaenopsis* umur 3 bulan (yang pengecambahan bijinya pada perlakuan yang sama).

3.3.1 Kondisi Ruang Kultur

Kultur protokorm pada semua media yang dicobakan diletakkan di rak-rak di ruang kultur yang suhunya 24-28⁰C dengan pencahayaan lampu fluoresens ±1000 lux.

3.3.2 Pengamatan

Pengamatan dilakukan dengan mengukur tinggi tanaman, jumlah daun dan jumlah akar pada seedling *Phalaenopsis* serta bobot segar 5 tanaman setelah protokorm dikulturkan selama 4 bulan. Perbedaan nilai variabel yang diukur dianalisis ragamnya dan jika nyata dilanjutkan menggunakan uji BNT pada taraf 5%.

Percobaan 4. Pengaruh BA atau GA terhadap pertumbuhan planlet *Phalaenopsis* pada saat aklimatisasi.

Percobaan ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh penyemprotan larutan BA atau GA terhadap pertumbuhan planlet *Phalaenopsis* pada saat aklimatisasi.

3.4.1 Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan dalam percobaan ini adalah planlet *Phalaenopsis* dari tiga spesies yang didapatkan dari laboratorium Kebun Raya Bogor, yaitu *P. amabilis*, *P. cornucervi* dan *P. violaceae*. Ukuran dan umur planlet dari ke tiga spesies *Phalaenopsis* tersebut kurang lebih sama (Gambar 4).



Gambar 5. Planlet *Phalaenopsis* yang akan diaklimatisasi.

3.4.2. Disain Percobaan

Percobaan ini dilaksanakan dengan rancangan kelompok teracak lengkap.

Percobaan ini terdiri dari tiga kelompok (tiga spesies *Phalaenopsis* yaitu *P. amabilis*, *P. cornucervi* dan *P. violaceae*.) yang diaklimatisasi dalam kompot (*community pot*) dan diperlakukan dengan pupuk sebagai kontrol (K); pupuk + larutan BA 20 mg/l dan pupuk + larutan GA 20 mg/l. Setiap satuan percobaan

terdiri dari satu pot berisi 10 planlet dengan media cacahan pakis dan serat sabut kelapa.

3.4.3. Cara Aklimatisasi planlet

Aklimatisasi planlet dilakukan dengan urutan sebagai berikut:

1. Mula-mula botol berisi planlet diberi air, lalu dikocok untuk memudahkan pengambilan planlet dari media agar-agar.
2. Planlet dicuci bersih, terutama dibagian akar dengan hati-hati agar akar tidak rusak, tetapi bersih dari media agar yang menempel.
3. Planlet direndam dalam larutan fungisida antracol 2g/l selama sekitar 30 menit lalu ditiriskan diatas kertas koran.
4. Media tanam sudah disiapkan, yaitu cacahan batang pakis dan serat sabut kelapa.
5. Penanaman planlet dilakukan dengan cara menggulung longgar akar planlet, lalu menanam dimedia berisi cacahan pakis. Penanaman dilakukan secara kompot, yaitu 5 planlet ditanam bersamaan dalam satu pot.
6. Kompot diletakkan dimeja rumah kaca bernaungan paranet ($\pm 40\%$ dari cahaya penuh).
7. Penyiraman dilakukan secara rutin setiap hari sekali.
8. Perlakuan larutan BA atau GA diberikan dengan menyemprot planlet dimulai pada umur 1 bulan hingga 4 bulan setelah bibit dikeluarkan dari botol.

3.4.4. Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada empat bulan setelah bibit dikeluarkan dari botol.

Variabel yang diamati adalah:

1. Jumlah daun.
2. Diameter daun.
3. Jumlah akar.
4. Bobot segar tanaman (g).