

### III. BAHAN DAN METODE

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dilaksanakan mulai bulan Mei 2013 hingga Januari 2014.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah LAFC (*Laminar Air Flow Cabinet*), neraca analitik, pH meter, botol ukur, autoklaf, kompor listrik, gelas ukur, cawan petri, botol kultur, alat tanam (pinset dan skalpel), bunsen, pipet, sprayer, spidol, korek api, baki, rak kultur, lampu TL (Tube Lamp) 40 watt, pisau, jas laboratorium, masker, dan milimeter blok.

##### 3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah media padat  $\frac{1}{2}$  MS (Murashige and Skoog) dan NP (New Phalaenopsis), sukrosa, serbuk agar, 6-benzylaminopurine (BAP), 1-naphtylacetic acid (NAA), Streptomycin, bahan tanam berasal dari nodus tangkai bunga tanaman anggrek yang pertama kali berbunga spesies *P. amabilis*, HCl 1 N, NaOH 1 N, aquadest, alkohol 70 % dan 96 %, spiritus, kertas tisu, plastik, kertas bekas, karet gelang. Bahan untuk sterilisasi adalah deterjen, benlate, streptomycin, bayclin 5 % dan 10 %, selanjutnya untuk pembilasan menggunakan akuades steril.

#### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian menggunakan kombinasi dua media tanam dengan lima konsentrasi zat pengatur tumbuh BAP sehingga didapatkan sepuluh perlakuan dan di ulang sebanyak 3 kali. Kombinasi perlakuan dari kedua faktor disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan

Perlakuan	Media dan Konsentrasi BAP
P1	Media ½ MS + BAP 0 ppm
P2	Media ½ MS + BAP 0,5 ppm
P3	Media ½ MS + BAP 1,5 ppm
P4	Media ½ MS + BAP 2 ppm
P5	Media ½ MS + BAP 2,5 ppm
P6	Media NP + BAP 0 ppm
P7	Media NP + BAP 0,5 ppm
P8	Media NP + BAP 1,5 ppm
P9	Media NP + BAP 2 ppm
P10	Media NP + BAP 2,5 ppm

Setiap perlakuan terdiri dari dua botol kultur dan tiap botol kultur berisi satu eksplan yang kemudian diulang sebanyak tiga kali, sehingga terdapat 60 unit.

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1 Sterilisasi alat

Tahapan awal dari kultur jaringan adalah sterilisasi alat. Sterilisasi alat difungsikan untuk membunuh bakteri dan jamur yang mengakibatkan kontaminasi pada kultur jaringan oleh karena itu tahap ini perlu diperhatikan dengan baik. Sterilisasi yang paling awal adalah mencuci bersih semua botol kultur dengan sabun setelah itu direndam dengan larutan bayclin selama 1 x 24 jam. Kemudian dicuci kembali dengan sabun. Tahapan selanjutnya adalah sterilisasi kering dimana semua botol kultur dikeringkan menggunakan oven dengan suhu  $\pm 150^{\circ}\text{C}$  selama 1 hari. Setelah selesai botol-botol disimpan dalam ruang inkubasi dan siap untuk digunakan. Sedangkan untuk sterilisasi petridis, petridis dibungkus dengan kertas. Setelah itu dimasukkan dalam autoklaf, sterilisasi ini butuh waktu 30 menit dengan tekanan 1,5 psi.

Sterilisasi LAFC yang pertama adalah menyalakan lampu UV selama 1 jam. Kemudian disemprot dengan alkohol 70% menggunakan sprayer ke seluruh permukaan dalam laminar dan dikeringkan menggunakan tisu. Semua peralatan yang akan dimasukkan dalam laminar terlebih dahulu semprot dengan alkohol 70

%. Untuk alat tanam (scalpel dan pinset) terlebih dahulu disterilisasi ke dalam alkohol 96 % kemudian dibakar dengan bunsen. LAFC yang sudah digunakan disterilisasi lagi dengan menyalakan lampu UV selama 1 jam.

#### 3.4.2 Pembuatan larutan stok

Tahapan awal membuat media MS adalah media stok. Komposisi media stok untuk kultur jaringan anggrek terdiri dari unsur hara makro, mikro, vitamin, Fe, dan beberapa bahan tambahan seperti sukrosa, agar dan arang aktif.

Tabel 2. Komposisi Medium dasar (Murashige dan skoog, 1962; Islam *et al.*, 1998)

Unsur Hara	Senyawa	Media MS (mg L <sup>-1</sup> )	Media NP (mg L <sup>-1</sup> )
Makro	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	424,6
	KNO <sub>3</sub>	1900	637,6
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	-
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	32
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	-
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	462,7
	Ca(NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	-	256,4
	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	-	-
Mikro	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3	11,5
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	4,3
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	3,1
	KI	0,83	0,125
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,0125
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,0125
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,25	-
Fe	NaEDTA.2H <sub>2</sub> O	37,3	37,3
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8
Vitamin	Glycine	2	2
	Myo Inositol	100	100
	Thiamine	0,1	0,1
	Pyridoxine	0,5	0,5
	Nicotinic acid	0,5	0,5
Tambahan	Sukrosa	30000	20000
	Agar	6000	6000

Pembuatan larutan stok secara umum adalah menimbang masing-masing bahan kimia sesuai kebutuhan, melarutkannya ke dalam 500 ml aquadest dan di aduk hingga homogen. Setelah itu, dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer, ditambahkan aquadest hingga 1000 ml dan dikembalikan lagi ke dalam botol

duran. Larutan stok yang telah jadi diberi label berisikan nama larutan stok, tanggal pembuatan dan kebutuhan tiap satu liter media. Larutan stok dapat disimpan di lemari es untuk mempertahankan kualitas dan memperpanjang masa simpan. Masa simpan larutan stok lebih baik tidak lebih dari dua bulan.

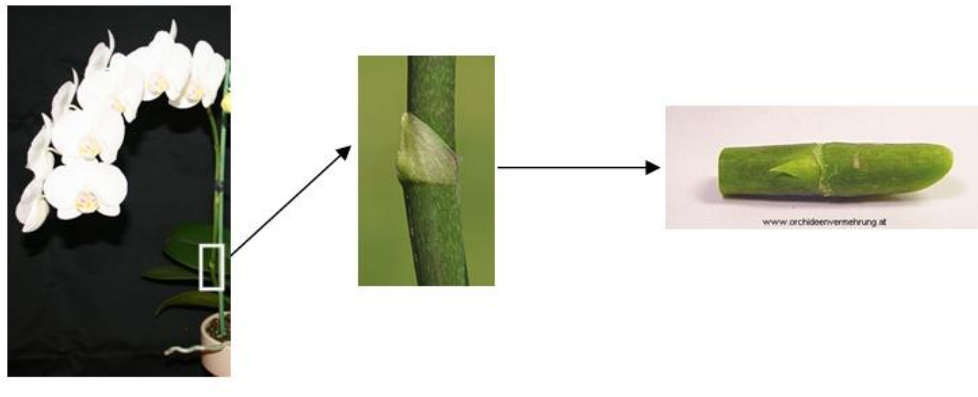
Pada Tabel 2 disajikan komposisi media yang digunakan yaitu MS dan NP. Takaran unsur hara makro, mikro dan sukrosa berbeda antara kedua media. Media  $\frac{1}{2}$  MS memiliki takaran yang lebih banyak dibandingkan dengan media NP.

### 3.4.3 Pembuatan Media

Pembuatan media dilakukan dengan menyiapkan semua alat dan bahan yang dibutuhkan, selanjutnya mengambil larutan stok sesuai kebutuhan masing-masing jenis media dan dimasukkan ke dalam gelas ukur kapasitas 1000 ml. Kebutuhan media untuk perlakuan  $\frac{1}{2}$  MS sebanyak 500 ml begitu juga dengan media NP. Langkah selanjutnya adalah sukrosa ditambahkan ke dalam gelas ukur sesuai dengan kebutuhan masing-masing media, vitamin C 50 ppm, dan unsur hara makro, mikro, Fe, vitamin sesuai takaran masing-masing media. Langkah berikutnya menambahkan aquades hingga 250 ml. Larutan diaduk hingga homogen dan setelah homogen media ( $\frac{1}{2}$  MS dan NP) dibagi menjadi 5 perlakuan. Takaran setiap perlakuan adalah 50 ml. Pemberian ZPT NAA untuk semua perlakuan sama yaitu 0,1 ppm sedangkan untuk BAP sesuai dengan perlakuan. Larutan selanjutnya dihomogenkan dan ditambahkan aquadest hingga 100 ml. Pengukuran pH larutan menggunakan pH meter, pH diukur hingga mencapai angka 5,8 dan apabila yang diinginkan belum tercapai bisa ditambahkan NaOH 1 N untuk menaikkan pH sedangkan HCl 1 N untuk menurunkan pH. Larutan dimasak menggunakan kompor listrik selama 15 menit. Media dimasukkan dalam botol kultur dan diisi tiap botol kurang lebih 25 ml. Selanjutnya botol kultur yang terisi media diberi label sesuai perlakuan dan di autoklaf pada tekanan 15 psi dalam suhu  $121^{\circ}$  C selama 30 menit untuk menghilangkan kontaminan. Terakhir media diinkubasi selama 3 hari untuk mengetahui keberhasilan sterilisasi.

#### 3.4.4 Penyiapan eksplan

Eksplan adalah bagian tanaman yang akan ditanam pada media kultur jaringan. Tanaman anggrek bulan yang digunakan adalah saat berbunga pertama kali karena jaringan yang terdapat pada tangkai bunga masih aktif membelah. Bahan eksplan yang digunakan berasal dari nodus tangkai bunga anggrek *P. amabilis*. Setiap tangkai bunga diambil 3 mata nodus. Nodus yang digunakan berukuran sekitar 3 cm kemudian disterilisasi. Gambaran eksplan yang digunakan disajikan pada gambar 2.



Gambar 2. Eksplan berasal dari nodus tangkai bunga anggrek *P. amabilis* (Anonym, 2013)

Tahapan sterilisasi nodus tangkai bunga anggrek *P. amabilis* adalah:

1. Nodus tangkai bunga dibersihkan dengan air mengalir dan digojog dengan deterjen selama 10 menit.
2. Nodus tangkai bunga digojog dengan larutan benlate 3 ppm selama 30 menit.
3. Nodus tangkai bunga digojog dengan larutan bayclin 10 % selama 15 menit.
4. Selaput yang masih melindungi mata nodus dikelupas hingga bersih dan digojog lagi dalam larutan bayclin 5 % selama 5 menit.
5. Sterilisasi selanjutnya dilakukan di dalam LAFC. Eksplan dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali sambil digojog kurang lebih 1 menit untuk menghilangkan larutan bayclin yang masih tersisa.
6. Nodus tangkai bunga digojog dengan larutan streptomycin 300 ppm selama 10 menit untuk menghilangkan bakteri yang ada pada eksplan.
7. Nodus siap ditanam dalam media pertumbuhan.

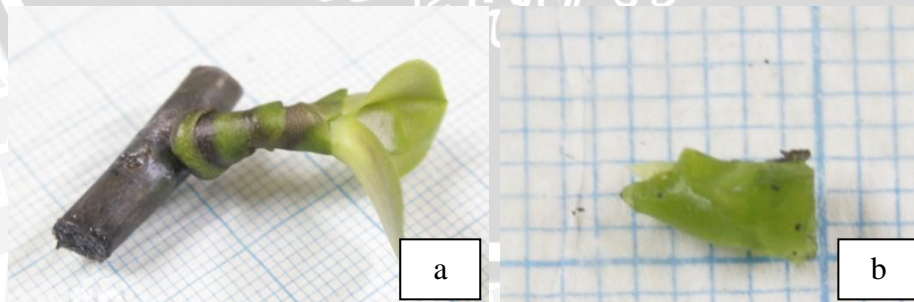
### 3.4.5 Induksi tunas

Induksi tunas dilakukan untuk menghasilkan tunas yang tumbuh dari mata nodus dan selanjutnya digunakan dalam perlakuan. Tahapan awal adalah eksplan steril diletakkan dalam petridisih steril yang telah dilapisi kertas tisu atau kertas serap steril guna menyerap sisa larutan streptomycin. Setelah larutan terserap eksplan ditanam dalam media induksi tunas. Media yang digunakan adalah  $\frac{1}{2}$  MS padat dengan diperkaya BAP 5 ppm dan NAA 0,5 ppm. Penanaman satu eksplan untuk satu botol, selanjutnya bibir botol dibakar di atas bunsen dengan cara diputar ( $\pm 3$  putaran) dan tutup plastik botok di keringanginkan di atas nyala api bunsen, botol ditutup dengan karet gelang hingga rapat. Tiap botol kultur diberi label sesuai perlakuan dan tanggal penanaman.

Botol-botol kultur yang telah berisi eksplan ditempatkan dalam ruangan dengan suhu  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  dan kelembapan ruangan 80 %. Untuk periode terang selama 16 jam dan periode gelap 8 jam. Induksi tunas dilakukan hingga didapatkan tunas setinggi  $\pm 2$  cm untuk perlakuan dan dibutuhkan waktu sekitar 3 bulan.

### 3.4.5 Penanaman eksplan

Tunas yang telah tumbuh diambil bagian titik tumbuhnya untuk digunakan sebagai perlakuan. Ukuran eksplan yang akan disubkultur adalah  $\pm 5$  mm. Eksplan yang akan digunakan disajikan pada gambar 3. Eksplan kemudian ditanam dalam media perlakuan. Botol-botol kultur yang telah berisi eksplan ditempatkan dalam ruangan dengan suhu  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  dan kelembapan ruangan 80 %. Untuk periode terang selama 16 jam dan periode gelap 8 jam.



Gambar 3. Bahan tanam (a) Tunas tumbuh dari mata nodus, (b) Eksplan untuk perlakuan (Sumber: Dokumentasi pribadi).

### 3.4.6 Subkultur

Subkultur adalah pemindahan eksplan dari media sebelumnya ke media yang baru. Subkultur dilakukan setiap 1 bulan sekali untuk memperbarui nutrisi bagi pertumbuhan eksplan. Proses subkultur adalah mengambil eksplan dari media sebelumnya kemudian meletakkannya di atas petridish. Selanjutnya, eksplan dibersihkan dari jaringan-jaringan yang mati atau mengalami pencoklatan. Eksplan yang telah dibersihkan ditanam dalam media baru.

## 3.5 Variabel Pengamatan

Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah:

### 1. Presentase eksplan hidup, mati dan terkontaminasi (%)

Pengamatan dilakukan setiap hari setelah tanam.

$$\% \text{ Eksplan hidup} = \frac{\text{jumlah eksplan yang hidup}}{\text{jumlah seluruh eksplan}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Eksplan mati} = \frac{\text{jumlah eksplan yang mati}}{\text{jumlah seluruh eksplan}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Eksplan terkontaminasi} = \frac{\text{jumlah eksplan yang terkontaminasi}}{\text{jumlah seluruh eksplan}} \times 100$$

### 2. Persentase eksplan membentuk PLB (%)

Pengamatan dilakukan setiap hari hingga akhir pengamatan.

$$\% \text{ Eksplan membentuk PLB} = \frac{\text{jumlah eksplan membentuk PLB}}{\text{jumlah seluruh eksplan}} \times 100 \%$$

### 3. Waktu muncul PLB (MST)

Pengamatan dilakukan setiap hari, munculnya PLB pada eksplan ditandai dengan adanya pembengkakan atau munculnya jaringan berwarna putih bening pada permukaan eksplan yang kemudian berkembang menjadi bulatan-bulatan kecil yang jelas. Dinyatakan dalam MST (Minggu Setelah Tanam).

### 4. Jumlah PLB tiap eksplan

Pengamatan dengan menghitung PLB yang tumbuh pada tiap eksplan, dilakukan setiap hari setelah tanam.

### 5. Waktu muncul tunas (MST)

Pengamatan waktu muncul tunas dilakukan dengan menghitung jumlah hari sejak tanam sampai terbentuknya tunas. Setelah itu diakumulasikan setiap minggu setelah tanam (MST).

6. Jumlah tunas tiap eksplan (buah)

Pengamatan jumlah tunas dilakukan setiap minggu setelah tanam (MST).

7. Tinggi tunas (cm)

Tinggi tunas diukur menggunakan kertas milimeter. Pengukuran dilakukan pada akhir pengamatan.

8. Waktu muncul daun (MST)

Pengamatan waktu muncul daun dilakukan dengan menghitung jumlah hari sejak tanam sampai terbentuknya daun. Setelah itu diakumulasikan setiap minggu setelah tanam (MST).

9. Jumlah daun (helai)

Jumlah daun diamati dengan cara menghitung total daun dalam setiap eksplan yang tumbuh, dilakukan setiap minggu setelah tanam (MST).

### 3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif.

