

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan pada tanggal Januari 2011 – Maret 2011 yang berlokasi di Laboratorium Genetika dan Fisiologi Kultur Jaringan (*Genetic and Physiology Tissue Culture*) Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah: botol kultur, alat-alat diseksi (scalpel, pinset, gunting), *Laminair Air Flow Cabinet* (L AFC), timbangan analitik, mikropipet (1000  $\eta$ l), alat sterilisasi (oven, autoklaf, dan penyemprot alkohol (*hand sprayer*), pH meter, lemari pendingin (*freezer*), rak kultur, kertas label, hot plate dan strirrer, kertas tissue, korek, aluminium foil, backerglass (100 mL), dan gelas ukur (100 mL).

##### 3.2.2 Bahan

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah: stok  $\frac{1}{2}$  media MS yang diperoleh dari UPT. Dinas Pertanian Bedali Lawang Malang, 150 ml air kelapa, agar 6-7 gr, gula 30 gr, larutan stok zat pengatur tumbuh (ZPT) *Benzil Amino Purin* (BAP), alkohol 70%, Bahan buffer pH: NaOH 0,1 N dan HCl 0,1 N,

aquadest, dan jenis *Protocorm Like Body* (PLB) *Phalaeonopsis* sp. (var. *Marystripe*, dan *Snowtaeda*) dan *Dendrobium* sp. (var. *Spectabile* dan *Discolor*) yang diperoleh dari koleksi Handoyo Budi Orchid, Jalan Bondowoso Malang.

### 3.3 Prosedur Kerja

#### 3.3.1 Sterilisasi Alat

Disiapkan seluruh alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini, kemudian harus dilakukan sterilisasi seperti pinset, skalpel, petridish, tip mikropipet, dan plastik penutup botol dibungkus dulu dengan *aluminium foil* atau kertas sampul berwarna coklat. Untuk botol –botol kultur yang diperoleh dari lapang, lalu dilakukan pencucian, yaitu: botol- botol kultur direndam dalam bak yang berisi air penuh selama 24 jam, kemudian dilakukan pencucian dengan wipol sampai bersih dan direndam ke dalam air bersih, dan dicuci pada air kran yang mengalir sampai bersih. Botol- botol kultur dan alat-alat kultur yang lain tersebut, selanjutnya dioven sampai kering dengan suhu 50-52 °C ( $\pm 10-15$  menit). Setelah itu, alat- alat kultur dipindahkan ke dalam autoklave untuk dilakukan sterilisasi selama 60 menit dengan tekanan 15 atm.

#### 3.3.2 Pembuatan Media ½ MS

Media merupakan salah satu tingkat keberhasilan suatu penelitian kultur *in vitro*. Penelitian ini menggunakan ½ MS yang sudah jadi (siap pakai) dan diperoleh dari Dinas Pertanian UPT. Pengembangan Agribisnis dan Tanaman Hortikultura Bedali Lawang Malang. Kemudian, stok media MS dicampur dengan

bahan-bahan media yang lain, seperti agar, aquadest, air kelapa, hormon, dan dipanaskan. Ketika sudah selesai dimasukkan ke dalam botol kultur  $\pm$  20 ml.

### 3.3.2.1 Media Cair

Pada perlakuan hormon BAP (0 mg/l dan 0,5 mg/l), media yang digunakan adalah media cair. Adapun bahan yang digunakan meliputi: gula (30 gr), larutan stok zat pengatur tumbuh (ZPT) *Benzilaminopurin* (BAP), alkohol 70%, Bahan buffer pH: NaOH 0,1 N dan HCl 0,1 N, aquadest (210 mL) dan air kelapa (40 mL) sebagai pelarut (250 mL). Penggunaan media cair yaitu dikarenakan pada dasarnya pertumbuhan kultur cair biasanya lebih cepat dari pada kultur padat walaupun tingkat kontaminasinya lebih tinggi dibandingkan media padat. Penggunaan kultur cair memberikan pengendalian lingkungan tumbuh yang baik, karena kebanyakan sel yang akan dikelilingi oleh mediumnya dan secara morfologi, pertumbuhan sel lebih seragam (Margono, 2003: 16-17).

### 3.3.2.2 Media Padat

Pada perlakuan hormon BAP (0 mg/l; 0,5 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l; dan 2 mg/l), media yang digunakan adalah media padat. Bahan yang dibutuhkan meliputi: agar (6-7 gr), gula (30 gr), larutan stok zat pengatur tumbuh (ZPT) *Benzil Amino Purin* (BAP), alkohol 70%, Bahan buffer pH: NaOH 0,1 N dan HCl 0,1 N, aquadest (850 mL) dan air kelapa (150 mL) sebagai pelarut (1000 mL).

### 3.3.3 Sterilisasi Media

Media dalam botol yang sudah ditutup dengan aluminium foil, kemudian dimasukkan ke dalam autoklave. Sterilisasi media, yaitu butuh 30 menit dengan

tekanan 15 atm. Media yang sudah dimasukkan ke dalam botol, kemudian tutup dengan plastik dan diikat dengan karet pentil lalu segera dilakukan sterilisasi dalam autoklave untuk menghindari terjadinya kontaminasi.

### **3.3.4 Sterilisasi Ruang Tanam**

Ruang tanam kultur *in vitro* merupakan lokasi yang dapat dijadikan sebagai ruang yang aseptik yaitu bebas dari bakteri. Penyemprotan ruang tanam yaitu *Laminar Air Flow Cabine* (L AFC) dengan menggunakan alkohol 70% sampai rata seluruh ruangan kultur. Selanjutnya ruang tanam disterilisasi dengan sinar UV selama 1 jam sebelum L AFC digunakan, ketika hendak L AFC digunakan, maka sinar UV harus dimatikan dan blower serta lampu dihidupkan. Kemudian setelah seluruh proses penanam selesai, L AFC dimatikan dengan menekan blower dan melepas skakel.

### **3.3.5 Penanaman dan Pemeliharaan PLB *Phalaeonopsis* sp. dan *Dendrobium* sp.**

Alat-alat sterilisasi, dan bunsen diletakkan dalam L AFC untuk PLB *Phalaeonopsis* sp. dan *Dendrobium* sp. Selain itu, disiapkan dalam L AFC alat-alat sterilisasi, alkohol 70%, dan korek. Jika semua sudah selesai, maka penanaman PLB *Phalaeonopsis* sp. dan *Dendrobium* sp. dimulai yaitu dengan cara; diambil bagian derivat proliferasi dari botol aslinya untuk ditanam ke dalam media botol kultur yang sudah diberi perlakuan oleh berbagai konsentrasi hormon. Kemudian dilanjut dengan pemeliharaan PLB *Phalaeonopsis* sp. dan *Dendrobium* sp.

### 3.4 Analisis Data

1. Pengamatan penelitian secara *Deskriptif kualitatif*, yaitu dengan mengamati proliferasi PLB *Phalaeonopsis* sp. dan *Dendrobium* sp. dengan mengamati morfologi, warna, tekstur, PLB anggrek *Phalaeonopsis* sp. dan *Dendrobium* sp. serta pengamatan secara *Deskriptif kuantitatif*, yaitu dengan mengamati ukuran dan persentase (%) tingkat keberhasilan PLB yang tumbuh.
2. Menghitung Persentase (%) terbentuknya PLB *Phalaeonopsis* sp. dan *Dendrobium* sp. yang mengalami proliferasi dalam media ½ MS padat diakhir pengamatan.
3. Rumus untuk menghitung jumlah PLB *Phalaeonopsis* sp. dan *Dendrobium* sp. yang berhasil hidup, tumbuh, dan berkembang (Fischer dan Maurer (1978), dengan mengamati pertumbuhan PLB *Phalaeonopsis* sp. dan *Dendrobium* sp. dihitung dengan rumus sebagai berikut:
  - a.  PLB *Phalaeonopsis* sp. dan *Dendrobium* sp. yang terbentuk

$$= \frac{\Sigma \text{ PLB anggrek yang hidup}}{\Sigma \text{ PLB anggrek yang ditanam}}$$

- b. % pertumbuhan PLB *Phalaeonopsis* sp. dan *Dendrobium* sp.

$$= \frac{\Sigma \text{ PLB anggrek yang hidup}}{\Sigma \text{ PLB anggrek yang ditanam}} \times 100$$

### 3.5 Teknik Pengambilan Data

Pengambilan data dari penelitian ini dengan mengamati morfologi proliferasi sampel awal pada media ½ MS cair sebagai tahap inisiasi pengaruh

