

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Riau. Penelitian ini dilaksanakan selama 4 bulan, dimulai dari bulan Desember 2008 sampai dengan bulan April 2009.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah planlet anggrek (*Dendrobium bifalce*) umur 2 bulan yang masih berada di dalam botol kultur, media Murashige dan Skoog, sukrosa, agar, aquades, alkohol 70% dan 96%, HCl 1 N, NaOH 1 N, formalin 0,04%, *aluminium foil*, *plastic wrap*, kertas tisu, dan kertas label.

Alat-alat yang digunakan adalah timbangan analitik, *hot plate and magnetic stirrer*, pH meter, oven, *autoclave*, *Laminar Air Flow Cabinet* (L AFC), botol kultur, *erlenmeyer*, *petridish*, lampu bunsen, *hand scalpel*, pinset, *sterile blade*, gelas ukur, pipet tetes, dan lampu neon 20 watt.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan secara eksperimen dengan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 taraf perlakuan pemberian sukrosa. Adapun perlakuan sukrosa yang diberikan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

S₀ = Tanpa pemberian sukrosa

S₁ = Pemberian sukrosa dengan konsentrasi 10 g/l

S₂ = Pemberian sukrosa dengan konsentrasi 20 g/l

S₃ = Pemberian sukrosa dengan konsentrasi 30 g/l

S₄ = Pemberian sukrosa dengan konsentrasi 40 g/l

Tiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali sehingga diperoleh 15 unit percobaan, setiap unit percobaan terdiri dari 4 planlet, sehingga total keseluruhan planlet adalah 60.

Data hasil pengamatan dianalisa secara statistik dengan menggunakan sidik ragam, dengan model linier sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + S_i + \epsilon_{ij}$$

Dimana:

Y_{ij} = Hasil pengamatan dari taraf perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ = Efek rata-rata umum

S_i = Efek rata-rata dari taraf perlakuan ke-i

ϵ_{ij} = Galat percobaan dari perlakuan ke-i terhadap ulangan ke-j

Data percobaan yang telah dianalisis dengan sidik ragam dilanjutkan dengan uji *Duncan's New Multiple Range Test* (DNMRT) pada taraf 5%.

3.4. Pelaksanaan Penelitian

3.4.1. Sterilisasi alat

Alat-alat seperti botol-botol kultur, *petridish*, pinset dan *hand scalpel* dicuci dengan menggunakan deterjen dan dibilas sampai bersih. Setelah dicuci, botol dikeringkan dengan kertas tisu dan ditutup dengan menggunakan *aluminium foil*, sedangkan *petridish*, tangkai *scalpel* dan pinset dibungkus dengan kertas. Alat-alat tersebut kemudian disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* dengan suhu 121° C dan tekanan 15 psi selama 15 menit. Bersamaan dengan sterilisasi alat-alat tersebut, dapat juga dilakukan sterilisasi aquades. Alat-alat yang telah disterilisasi disimpan ke dalam oven sampai ketika akan digunakan.

3.4.2. Pembuatan media

Bahan-bahan dan jumlah bahan yang dibutuhkan untuk pembuatan larutan stok dapat dilihat pada Lampiran 1, sedangkan cara pembuatan larutan stok dapat dilihat pada Lampiran 2. Untuk membuat 1 liter media MS (Lampiran 3), masing-masing larutan stok dipipet sesuai dengan ketentuan ke dalam gelas piala ukuran 1 liter, kemudian ditambahkan agar sebanyak 8 g dan sukrosa yang jumlahnya sesuai dengan masing-masing perlakuan, lalu volumenya dicukupkan menjadi 900 ml dengan menambahkan aquades. Setelah itu pH larutan diukur dengan pH meter dan diatur agar mencapai 5,8 dengan cara menambahkan NaOH 1 N jika pH larutan kurang dari 5,8 dan menambahkan HCl 1 N jika pH

larutan lebih dari 5,8. Kemudian volume larutan dicukupkan menjadi 1 liter dengan menambahkan aquades. Selanjutnya media dipanaskan sampai gula dan agar larut sempurna, setelah itu media dimasukkan ke dalam botol-botol kultur sebanyak 20 ml/botol, lalu botol ditutup dengan menggunakan *aluminium foil* dan diberi label sesuai perlakuan, setelah itu media disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada tekanan 15 psi dan suhu 121 °C selama 10 menit dan diinkubasi selama 1 minggu sebelum digunakan.

3.4.3. Penanaman planlet

Penanaman dilakukan di dalam *Laminar Air Flow Cabinet (L AFC)* yang berada di ruang tanam. Planlet yang masih berada di dalam botol dikeluarkan dan diletakkan di atas *petridish* steril lalu dipisahkan satu per satu, dibersihkan dari media yang menempel, kemudian dipilih planlet dengan tinggi 2 cm, jumlah daun 2 helai, dan memiliki 2 akar. Selanjutnya planlet direndam di dalam larutan klorox 1% selama 5 menit dan dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali, selanjutnya dilakukan penanaman. Botol kultur dipegang dengan tangan kiri, kemudian dibuka tutupnya, lalu diputar sambil membakar mulut botol di atas lampu bunsen. Dengan menggunakan pinset steril, planlet diambil dan ditanam pada media, kemudian mulut botol dibakar sambil diputar lagi, lalu botol ditutup kembali dengan *aluminium foil*. Selanjutnya, bagian samping botol kultur dililit dengan *plastic wrap* kemudian diberi label tanggal penanaman, lalu disusun menurut bagan penelitian di ruang inkubasi (Lampiran 4), dan dilakukan pemeliharaan.

3.4.4. Pemeliharaan

Pemeliharaan meliputi pengaturan suhu ruangan antara 21-25 °C, pemberian cahaya dengan lampu neon 20 watt yang berjarak 40 cm diatas botol kultur, serta menjaga kondisi ruangan agar tetap steril dengan menyemprotkan formalin 0,04% setiap akan keluar dari ruang inkubasi, dan mengeluarkan botol kultur jika ada planlet atau media yang telah terkontaminasi.

3.5. Pengamatan

3.5.1. Pertambahan tinggi planlet

Pertambahan tinggi planlet adalah selisih tinggi planlet pada saat awal penelitian dengan pada saat akhir penelitian. Data tinggi planlet diperoleh dengan cara mengukur panjang planlet dari pangkal batang sampai ujung titik tumbuh

menggunakan penggaris. Pengukuran tinggi awal dilakukan dari luar botol kultur setelah penanaman dilakukan untuk mencegah kontaminasi, sedangkan pengukuran tinggi akhir dilakukan saat akhir penelitian dengan mengeluarkan planlet dari botol kultur.

3.5.2. Pertambahan panjang daun planlet

Pertambahan panjang daun adalah selisih panjang daun pada saat awal penelitian dengan pada saat akhir penelitian. Pengukuran panjang daun sama seperti pengukuran tinggi planlet, daun yang diukur adalah daun yang telah membuka sempurna.

3.5.3. Pertambahan jumlah akar

Pertambahan jumlah akar adalah selisih jumlah akar pada saat awal penelitian dengan pada saat akhir penelitian.

3.5.4. Berat kering planlet

Pengukuran berat kering planlet dilakukan pada akhir penelitian, yaitu dengan mengambil satu tanaman sampel dari tiap unit percobaan, kemudian dibersihkan dengan air lalu dikeringanginkan. Setelah itu, planlet dimasukkan ke dalam amplop kertas dan dioven selama 48 jam pada suhu 70° C, kemudian ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik.

3.5.5. Pengamatan secara visual

Pengamatan secara visual dilakukan dengan mengamati keadaan planlet secara umum seperti bentuk, warna dan pertumbuhannya. Data ditampilkan dalam bentuk foto.