

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan, Kaliurang, Yogyakarta. Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus – November 2002

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

- Alat-alat gelas : Gelas piala, gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri
- Alat- alat logam : Skalpel dan pinset
- “Laminar Air Flow Cabinet”
- Alat timbang : neraca analitik
- Pengaduk magnet
- Pipet dan pengaduk
- Alat sterilisasi : Autoklaf, lampu spiritus, oven, dan penyemprot alkohol
- Pengukur pH
- Lemari pendingin
- Botol kultur dan rak kultur

3.2.2. Bahan

- Bahan kimia : NaOH dan HCl 0.1 %, medium Vacin dan Went, akuades, alkohol 70%, agar, sukrosa, arang aktif, NAA, BAP,

- Bahan tanaman : Eksplan berasal dari daun plantlet *Vanda tricolor* Lindl. yang berumur \pm 6 bulan dalam botol kultur.
- Bahan habis pakai lainnya : kertas label, tissue, dan sabun, aluminium foil

3.3 Cara Kerja

3.3.1. Sterilisasi alat

Alat gelas dan alat tanam setelah dicuci bersih dengan air destil dibungkus dengan aluminium foil dan disterilkan menggunakan oven pada suhu 160-180°C selama 2-3 jam. Alat dari logam yang akan dipakai, disterilkan dengan alkohol 70% kemudian dilewatkan pada api bunsen.

3.3.2. Sterilisasi ruang tanam

Ruang tanam disterilisasi dengan penyemprotan alkohol 70% dan dengan radiasi sinar ultra violet untuk mensterilkan permukaan *laminar air flow* selama lebih kurang satu jam

3.3.3 Pembuatan media Vacin dan Went (VW)

Pembuatan media Vacin dan Went dilakukan dengan pembuatan stok larutan terlebih dahulu, berdasarkan pengelompokkan larutan dalam lampiran 4. Untuk membuat 1 L media VW diambil larutan stok berdasarkan lampiran 4 dan dicampur dalam 400 ml akuades steril. Setelah itu dimasukkan hormon NAA 1 ppm dan BAP 1 ppm. Kemudian ditambahkan air kelapa 150 ml dan sukrosa sebanyak 20 g. Setelah itu ditambahkan air sampai volume tepat 1000 ml.

Larutan kemudian dibagi menjadi 5 bagian. Empat bagian ditambahkan arang aktif masing-masing sebanyak 0.5 g/l, 1g/l, 1.5 g/l, dan 2g/l sedangkan 1 bagian sisanya diperlakukan sebagai kontrol. Kondisi pH medium diukur sekitar 5.6 – 5.8.

3.3.4. Sterilisasi media.

Media dalam botol kemudian ditutup dengan aluminium foil, disterilkan dengan autoklaf pada temperatur 121⁰C, tekanan 2 atm selama 20 menit.

3.3.5. Penanaman dan pemeliharaan eksplan.

Daun yang dibawa ke dalam ruang kultur, kemudian dipotong diatas petridish steril sebagai eksplan dengan ukuran 0.5-1cm x 0.3 – 0.5 cm. Setelah itu eksplan ditanam pada medium dan lalu diinkubasi dalam ruang kultur. Suhu inkubasi sekitar 24 – 26 °C, dan intensitas cahaya 1000 lux.

3.3.6. Pengamatan

Pengamatan pada penelitian ini dilakukan setiap hari. Setelah berlangsung selama tiga bulan pengamatan dihentikan.

3.4. Parameter

Parameter yang diamati adalah :

1. Persentase eksplan yang mengalami “browning” : pada tiap ulangan dalam lima perlakuan yang ada, masing – masing ulangan dibagi lagi menjadi 6 sub-pengulangan. Persentase eksplan yang mengalami browning kemudian dihitung dari 6 sub pengulangan tersebut. Persentase browning didapat dari perhitungan: $\frac{\text{jumlah eksplan yang mengalami browning}}{\text{total eksplan}} \times 100\%$
2. Berat basah tanaman : didapat dari selisih antara berat eksplan mula – mula dengan berat eksplan pada akhir penelitian
3. Berat kering tanaman : eksplan pada hari terakhir pengamatan dikeringkan dengan oven pada suhu 60 – 70°C selama 2 –3 hari sampai berat konstan.

3.5. Rancangan Penelitian

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap faktor tunggal dengan 5 taraf perlakuan yaitu (P0) penambahan arang aktif 0 g/l, (P1) penambahan arang aktif 0.5g/l, (P2) penambahan arang aktif 1g/l, (P3) penambahan arang aktif 1.5g/l, dan (P4) penambahan arang aktif 2 g/l. Masing-masing perlakuan diulang 3 kali.

3.6. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan ANOVA pada taraf uji 5%. Jika terdapat beda nyata dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf uji 5%.

