

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

A. LOKASI

Penelitian dilakukan di Laboratorium Khansa Orchid Cimanggis-Depok. Penelitian dilakukan dari bulan September 2007 hingga bulan April 2008.

B. BAHAN

2. Tanaman donor

Tanaman donor berasal dari hasil perkecambahan biji *Dendrobium antennatum* Lindl. secara *in vitro* dan berumur 26 bulan. Perkecambahan tersebut telah dilakukan oleh laboratorium Khansa Orchids Cimanggis-Depok. Tanaman donor yang digunakan adalah tanaman yang sehat dan tidak mengandung kontaminan.

3. Eksplan

Eksplan yang digunakan merupakan potongan daun tanaman donor. Potongan daun tersebut berukuran kurang lebih 8 mm x 5 mm dan diambil dari semua daun yang ada pada planlet. Jumlah potongan daun yang dikultur pada satu botol (diameter 4 cm) perlakuan berjumlah 25 potong daun. Setiap perlakuan memiliki 10 sampel.

4. Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah akuades; alkohol 70 %; spiritus; HCl 1 N; NaOH 1 N; NH_4NO_3 [Merck]; KNO_3 [Merck]; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [Merck]; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [Merck]; KH_2PO_4 [Merck]; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [Merck]; $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ [Merck]; H_3BO_3 [Merck]; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [Merck]; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [Merck]; KI [Merck]; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [Merck]; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [Merck]; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ [Merck]; NaH_2PO_4 [Merck]; *nicotinic acid* [Merck]; pyridoxine HCl [Merck]; tiamin HCl [Merck]; glisin [Merck]; mio-inositol [Merck]; agar [Dunia]; gula pasir, kertas pH [Merck]; thidiazuron [duchefa] dan benzylaminopurin [duchefa].

5. Media

Media yang digunakan dalam penelitian adalah media dasar Murashige-Skoog (1962) dengan konsentrasi makronutrien dan mikronutrientnya setengah kali konsentrasi. Media tersebut ditambahkan agar-agar berkonsentrasi 8 g l^{-1} ; gula 20 g l^{-1} ; zat pengatur tumbuh tunggal TDZ 1 mg l^{-1} atau kombinasi antara TDZ ($1,5 \text{ mg l}^{-1}$ dan 2 mg l^{-1}) dengan BAP ($7,5 \text{ mg l}^{-1}$ dan 10 mg l^{-1}) (Tabel 1).

C. PERALATAN

Alat yang digunakan adalah timbangan *digital* [Precisa], spatula, gelas ukur (plastik) [Plastic Brand], pipet tetes, Erlenmeyer 250 ml dan 100 ml [Schott], *magnetic stirrer-hot plate* [Schott], *magnetic bar*, pinset [Yamaco

stainless], pipet ukur [Pyrex], *bulb* [D & N], labu ukur [Pyrex], *microwave* [Cella], kompor gas [Rinnai], pencatat waktu [jam tangan], teko ukur, nampan atau baki, panci tekan [Continental], autoklaf, botol balsem berdiameter 4 cm [Cap Lang], skalpel [SMIC], *cutter*, botol selai, cawan petri [Petriq], pembakar bunsen, *laminar air flow cabinet*, dan botol semprot.

D. CARA KERJA

1. Pembuatan larutan stok

Bahan dasar media Murashige-Skoog (1962) disediakan dalam bentuk larutan stok seperti yang terlampir pada Tabel 2. Bahan stok dibuat menjadi 10 kali dari jumlah resep dasar media MS. Selanjutnya, setiap bahan stok dilarutkan hingga 100 ml dengan akuades, sehingga untuk membuat 1 liter media MS dibutuhkan larutan stok sebanyak 10 ml.

Thidiazuron dan benzylaminopurine disediakan dalam bentuk larutan stok dengan konsentrasi 0,5 mg/ml pelarut. Larutan stok TDZ dan BAP dibuat dengan cara berikut, yaitu dengan melarutkan sebanyak 25 mg TDZ atau BAP dengan akuades hingga 50 ml. TDZ dan BAP tidak dapat langsung larut dalam akuades, tetapi harus dilarutkan secara perlahan dengan HCl 1 M hingga larut (kurang lebih 2 ml).

2. Pembuatan media (100 ml media)

Untuk membuat media kultur 100 ml, akuades sebanyak kurang lebih 50 ml dimasukkan pada Erlenmeyer yang berada di atas *hot plate-stirrer* dan berisi *magnetic bar* untuk dipanaskan. Larutan stok A, larutan stok B, larutan stok C, larutan stok D, larutan stok E, larutan stok mikro I, dan larutan stok mikro II masing-masing sebanyak sebanyak 0,5 ml dimasukkan ke dalam Erlenmeyer tersebut. Setelah itu larutan stok vitamin sebanyak 1 ml, larutan stok glisin sebanyak 1 ml, larutan stok pepton 1 ml, mio-inositol 0,01 mg dan larutan stok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang sama. Larutan zat pengatur tumbuh dimasukkan sebanyak masing-masing perlakuan. Gula sebanyak 2 gram dimasukan ke dalam Erlenmeyer, kemudian pH diukur dan diatur hingga berkisar 5,6--5,8 menggunakan HCl atau NaOH 1M. Agar sebanyak 0,8 gram dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan kemudian ditambahkan air hingga 100 ml. Media dimasak di dalam *micro wave* hingga homogen. Media yang telah homogen dimasukkan ke dalam 10 botol balsem berdiameter ± 4 cm [Cap Lang] secara merata. Kemudian media disterilkan menggunakan panci tekan atau autoklaf selama 20 menit.

3. Sterilisasi alat

Cawan petri, botol selai, botol balsem berdiameter ± 4 cm [Cap Lang], pinset, dan skalpel disterilkan dengan *pressure cooker* selama 20 menit.

Bagian dalam *Laminar Flow Cabinet* (LFC) disterilkan dengan cara menyemprotkan alkohol 70 %. *Laminar Flow Cabinet* disterilkan lagi dengan cara menyalakan lampu *Ultra Violet* (UV) selama 1 jam sebelum digunakan.

4. Penanaman eksplan

Daun yang akan digunakan sebagai eksplan berasal dari tunas yang masih berada di dalam botol kultur kecambah (botol saus), sehingga kondisinya steril. Tunas tersebut diambil menggunakan pinset dan diletakkan di cawan petri. Daun-daun dipotong dan dipisahkan dari tunas. Daun dipotong-potong dengan ukuran kurang lebih 8 mm x 5 mm, kemudian dua puluh lima potongan daun dimasukkan ke dalam satu botol kultur. Masing-masing perlakuan terdiri dari 10 botol kultur. Tunas-tunas yang sudah diambil daunnya dimasukkan ke dalam media baru sebagai stok kultur. Hasil kultur diberikan label tanggal penanaman dan kode perlakuan.

5. Pemeliharaan kultur

Kultur diletakkan pada rak-rak di ruang kultur. Suhu ruang kultur sekitar 25 °C. Kultur diberi penyinaran selama kira-kira 12 jam setiap harinya, dengan lampu TL. Botol kultur disemprot dengan alkohol 70 % satu minggu sekali.

6. Pengamatan

b. Parameter kuantitatif

Parameter kuantitatif yang diamati dalam penelitian ini ialah jumlah *protocorm like bodies* (plb), tunas, dan plb-tunas yang tumbuh pada setiap botol sampel. Pengamatan dilakukan secara makroskopis dengan bantuan kaca pembesar. Pengamatan dan penghitungan dilakukan pada hari ke-60 setelah penanaman. Data pengamatan disusun pada tabel pengamatan (Lampiran 2a--2e).

c. Parameter kualitatif

Parameter kualitatif yang diamati dalam penelitian ini ialah terjadi atau tidak pembengkakan ekplan sebelum menjadi plb atau tunas; terbentuk atau tidak plb dan tunas; dan plb saling berlekatan atau tidak. Pengamatan dilakukan secara makroskopis dengan bantuan kaca pembesar. Pengamatan dan penghitungan dilakukan pada hari ke-60 setelah penanaman. Hasil pengamatan disusun pada tabel pengamatan (Lampiran 3a--3e) dan didukung dengan gambar.

7. Analisis data

Data dihitung rerata dan standar deviasinya, kemudian dianalisis secara deskriptif. Analisis dilakukan berdasarkan parameter kuantitatif dan kualitatif.