

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai dengan bulan Maret 2015 di Laboratorium Botani (ruang penelitian *in vitro*), Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat – alat Penelitian

Alat- alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah aluminium foil, *Autoclave*, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAF) merk ESCO, pinset, *scalpel*, mata pisau *scalpel*, kertas filter, Erlenmeyer berukuran 50 ml, cawan petri berdiameter 10 cm, corong, botol kultur berukuran 250 ml, gelas ukur bervolume 100 ml dan 500 ml, kertas label, mikroskop, mikropipet, pipet tip, spektrofotometri (Shimudzu UV 800), tabung reaksi, rak tabung reaksi, timbangan analitik Ohaus, tisu, waterbatt, dan kamera Canon Ixus 951S.

2. Bahan – bahan penelitian

Bahan–bahan yang digunakan adalah planlet angrek tanah (*Spathoglottis plicata* Blume.) steril dalam botol kultur umur 2 bulan yang diperoleh dari koleksi pribadi Ibu Dr. Endang Nurcahyani, M.Si, asam fusarat murni yang diproduksi oleh *Sigma chemical Co.* {*Fusaric acid* (5-butylpicolinic

acid) from *Giberella fujikuroi*}, alkohol 70 %, akuades, *Benzine Amino Purine* (BAP), *Indole-3-Acetic Acid* (IAA), sukrosa, *Plant Preservative Mixture* (PPM), Kalium Hidroksida (KOH), Asam Chlorida (HCl), Formalin Aseto Alkohol (FAA), dan bahan kimia medium VW (*Vacin & Went*) padat yang komposisinya disajikan dalam Lampiran 1.

C. Rancangan Percobaan

Rancangan Penelitian ini disusun dengan pola dasar Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan satu faktor yaitu konsentrasi asam fusarat yang terdiri atas 5 taraf yaitu: 0 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, dan 40 ppm. Masing-masing konsentrasi dilakukan 5 kali ulangan dan setiap ulangan terdiri dari 3 eksplan *S. plicata* dalam setiap botol kultur.

Tabel 1. Tata letak satuan percobaan

K ₅ U ₁	K ₄ U ₅	K ₃ U ₄	K ₁ U ₂	K ₂ U ₄
K ₄ U ₁	K ₅ U ₂	K ₂ U ₃	K ₁ U ₃	K ₁ U ₄
K ₃ U ₁	K ₄ U ₂	K ₅ U ₃	K ₃ U ₅	K ₂ U ₅
K ₂ U ₁	K ₃ U ₂	K ₄ U ₃	K ₅ U ₄	K ₁ U ₅
K ₁ U ₁	K ₂ U ₂	K ₃ U ₃	K ₄ U ₄	K ₅ U ₅

Keterangan :

K₁ : Konsentrasi 0 ppm (kontrol)

K₂ : Konsentrasi 10 ppm

K₃ : Konsentrasi 20 ppm

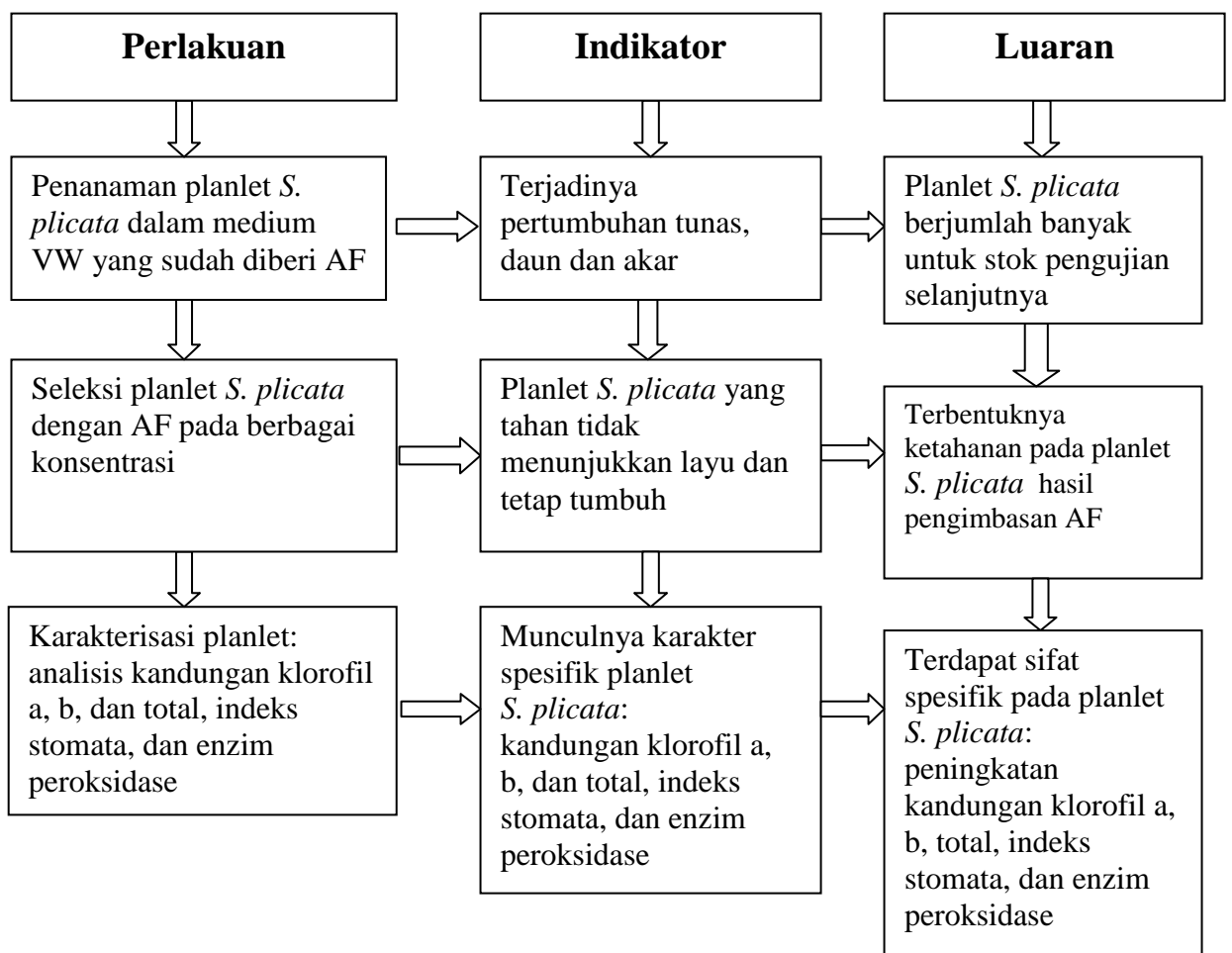
K₄ : Konsentrasi 30 ppm

K₅ : Konsentrasi 40ppm

U₁-U₅ : Ulangan 1 – ulangan 5

D. Bagan Alir Penelitian

Penelitian terdiri atas beberapa tahap, yaitu: 1) Penanaman planlet *S. plicata* umur 2 bulan ke dalam medium VW yang sudah ditambahkan AF sesuai konsentrasi; 2) Penentuan kisaran konsentrasi asam fusarat toleran untuk seleksi planlet *S. plicata* secara *in vitro*; 3) analisis karakter ekspresi yang spesifik pada planlet *S. plicata* meliputi persentase jumlah planlet yang hidup, visualisasi planlet, analisis kandungan klorofil a, klorofil b, dan klorofil total, serta analisis indeks stomata. Tahap penelitian ini disajikan dalam bentuk bagan alir seperti tercantum pada Gambar 3.



Gambar 5. Bagan alir penelitian

E. Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian meliputi beberapa tahap sebagai berikut.

1. Persiapan medium tanam

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Vacint & Went* (VW) padat. Pembuatan medium tanam VW sebanyak 1 liter adalah dengan cara memipet sejumlah larutan stok (Lampiran 1), kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 1 liter. Akuades ditambahkan sampai tanda (1 liter) dan pH diatur sampai 5,5. Untuk mendapatkan pH 5,5 dilakukan penambahan KOH 1 N atau HCl 1 N. Larutan tersebut kemudian dipindahkan ke dalam wadah yang lebih besar kemudian ditambahkan agar-agar sebanyak 7 g/l, sukrosa 30 g/l, dan PPM 0,5 ml/l. Larutan medium dipanaskan untuk melarutkan agar-agar (sambil diaduk) sampai mendidih. Penambahan ZPT dilakukan setelah larutan medium diangkat, kemudian dituangkan ke dalam botol kultur sebanyak 20 ml/botol. Sterilisasi medium dengan menggunakan autoklaf dengan tekanan 17,5 psi, 121 °C selama 15 menit.

2. Persiapan medium seleksi

Medium *Vacint & Went* (VW) ditambah asam fusarat (AF) dengan konsentrasi 0 ppm (kontrol), 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, dan 40 ppm. Asam fusarat sebelum digunakan, dilarutkan dengan akuades pada konsentrasi tertentu, kemudian disaring menggunakan *syringe filter* yang mempunyai diameter 0,45 µm sebanyak 2 kali, dilanjutkan filter berdiameter 0,22 µm satu kali. Penyaringan dilakukan dalam ruang steril didalam *LAF Cabinet*. Selanjutnya AF ditambahkan ke dalam medium VW. Sebelum digunakan,

medium diinkubasikan selama 7 hari pada suhu kamar (25 °C) untuk memastikan bahwa AF telah tersaring dengan baik. Apabila dalam waktu 7 hari tidak terjadi kontaminasi pada medium, maka medium dapat digunakan.

3. Penanaman planlet dalam medium seleksi asam fusarat

Eksplan yang digunakan berupa planlet steril. Planlet-planlet dari botol kultur dikeluarkan dengan *scalpel* steril dan satu-persatu diletakkan di atas cawan petri berdiameter 10 cm, kemudian planlet dipilah satu-satu, setelah itu ditanam pada masing-masing botol kultur yang berisi medium perlakuan yang telah ditentukan seperti pada butir 2) di atas. Masing-masing konsentrasi dilakukan 5 kali ulangan dan setiap ulangan terdiri dari 3 eksplan *S. plicata* dalam setiap botol kultur.

4. Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada akhir minggu ke-4 dan dievaluasi untuk mengetahui konsentrasi AF yang toleran untuk seleksi planlet *S. plicata* secara *in vitro*. Setelah 4 minggu inkubasi, planlet yang masih hidup di dalam botol kemudian dikarakterisasi dengan parameter sabagai berikut.

a. Persentase jumlah planlet yang hidup

Rumus yang digunakan untuk menghitung jumlah planlet *S. plicata* yang hidup yaitu:

$$\frac{\text{Jumlah planlet hidup}}{\text{Jumlah seluruh planlet}} \times 100\%$$

(Nurcahyani, 2014)

b. **Visualisasi planlet**, meliputi warna tunas yang terbentuk dengan klasifikasi sebagai berikut: hijau, hijau dengan bagian tertentu berwarna coklat, coklat.

c. **Analisis kandungan klorofil**

Bahan untuk analisis klorofil menggunakan daun planlet *S. plicata* yang sudah diimbas dengan AF, menggunakan metode Harbourn (1987) dengan spektrofotometer. Adapun langkah kerjanya sebagai berikut.

Daun planlet *S. plicata* yang seragam sebanyak 0,1 g dihilangkan ibu tulang daunnya, kemudian digerus dengan mortar (*pestle*) dan ditambahkan 10 mL aseton 80%. Setelah itu larutan disaring dengan kertas *Whatmann* No. 1, dan dimasukkan ke dalam flakon serta ditutup rapat.

Larutan sampel dan larutan standar (aseton 80%) di ambil sebanyak 1 mL, kemudian dimasukkan dalam kuvet. Setelah itu dilakukan pembacaan serapan dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang (λ) 646 nm dan 663 nm, dengan ulangan tiap sampel sebanyak 3 kali. Kandungan klorofil dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{Klorofil total} = 17,3 \lambda_{646} + 7,18 \lambda_{663} \text{ mg/L}$$

$$\text{Klorofil a} = 12,21 \lambda_{663} - 2,81 \lambda_{646} \text{ mg/L}$$

$$\text{Klorofil b} = 20,13 \lambda_{646} - 5,03 \lambda_{663} \text{ mg/L}$$

d. Analisis aktivitas enzim peroksidase

Aktivitas enzim peroksidase dianalisis dengan metode dari Saravanan *et al.* (2004). Dibuat campuran 1,5 mL 0,05 M pirogalol, 0,5 mL ekstrak enzim dari daun planlet *Spathoglottis plicata*, dan 0,5 mL 1% H₂O₂. Campuran diendapkan dalam suhu kamar dan dimasukkan ke dalam kuvet berukuran 0,5 mL. Spektrofotometer (Shimudzu UV 800) diatur dengan panjang gelombang 420 nm dan dibaca dari nol. Aktivitas enzim dihitung dalam U/mg/min. Satu unit adalah aktivitas berubahnya *Optimal Density* (OD) 420 nm pada spektrofotometer per menit.

e. Analisis Stomata

Pembuatan preparat stomata dengan metode dari Ruzin (1999) sebagai berikut.

Dibuat potongan-potongan segi empat dari daun planlet *S. plicata* dengan sisi ± 5 mm dan dimasukkan ke dalam tabung berisi larutan kloralhidrat dalam air (5:1). Tabung dipanasi dalam waterbath selama ± 10-15 menit hingga potongan daun tersebut transparan. Potongan daun diletakkan dalam larutan khloralhidrat pada gelas benda. Permukaan yang ada stomatanya diletakkan disebelah atas, kemudian ditutup dengan gelas penutup. Preparat diamati pada 5 bagian daerah yang berlainan. Tiap sel epidermis (E) ditandai dengan (x), tiap stoma (S) ditandai dengan (O). Indeks stomata besarnya dihitung dengan rumus:

$$\text{Indeks stomata} = \frac{S}{E + S} \times 100$$

Hasil akhir adalah rata-rata dari 5 buah pengamatan.

F. Analisis Data

Data yang diperoleh dari pertumbuhan planlet *S. plicata* selama seleksi dengan AF berupa data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif disajikan dalam bentuk deskriptif komparatif dan di dukung foto. Data kuantitatif dari setiap parameter dianalisis dengan menggunakan Anova. Anova dilakukan pada taraf nyata 5% dan uji lanjut dengan uji BNT pada taraf nyata 5%.