

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari 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) 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, spektrofotometer (*Shimidzu UV 800*), tabung reaksi, rak tabung reaksi, timbangan analitik, tisu, *waterbatt*, dan kamera Canon Ixus 951S.

2. Bahan – bahan penelitian

Bahan–bahan yang digunakan adalah planlet *P. amabilis* steril dalam botol kultur umur 4 bulan yang diperoleh dari koleksi pribadi Ibu Dr. Endang Nurcahyani, asam salisilat yang diproduksi oleh Darmstadt Germany, alkohol 70 %, akuades, *Benzine Amino Purine* (BAP), *Indole-3-Acetic*

Acid (IAA), sukrosa, *Plant Preservative Mixture* (PPM), Kalium Hidroksida (KOH), Asam Chlorida (HCl) dan bahan kimia medium VW (*Vacint and 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 konsentrasi asam salisilat yang terdiri atas 5 taraf 0 ppm, 15 ppm, 30 ppm, 45 ppm, 60 ppm. Masing-masing konsentrasi dilakukan 5 kali ulangan dan setiap ulangan terdiri dari 2 eksplan *P. amabilis* dalam setiap botol kultur. Tata letak satuan percobaan seleksi planlet *P. amabilis* dengan AS secara *in vitro* disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Tata letak satuan percobaan

K₃U₁	K₁U₂	K₄U₃	K₂U₄	K₃U₅
K₄U₁	K₂U₂	K₅U₃	K₁U₄	K₅U₅
K₁U₁	K₃U₂	K₂U₃	K₅U₄	K₄U₅
K₅U₁	K₄U₂	K₁U₃	K₃U₄	K₂U₅
K₂U₁	K₅U₂	K₃U₃	K₄U₄	K₁U₅

Keterangan :

K₁ : Konsentrasi 0 ppm (kontrol)

K₂ : Konsentrasi 15 ppm

K₃ : Konsentrasi 30 ppm

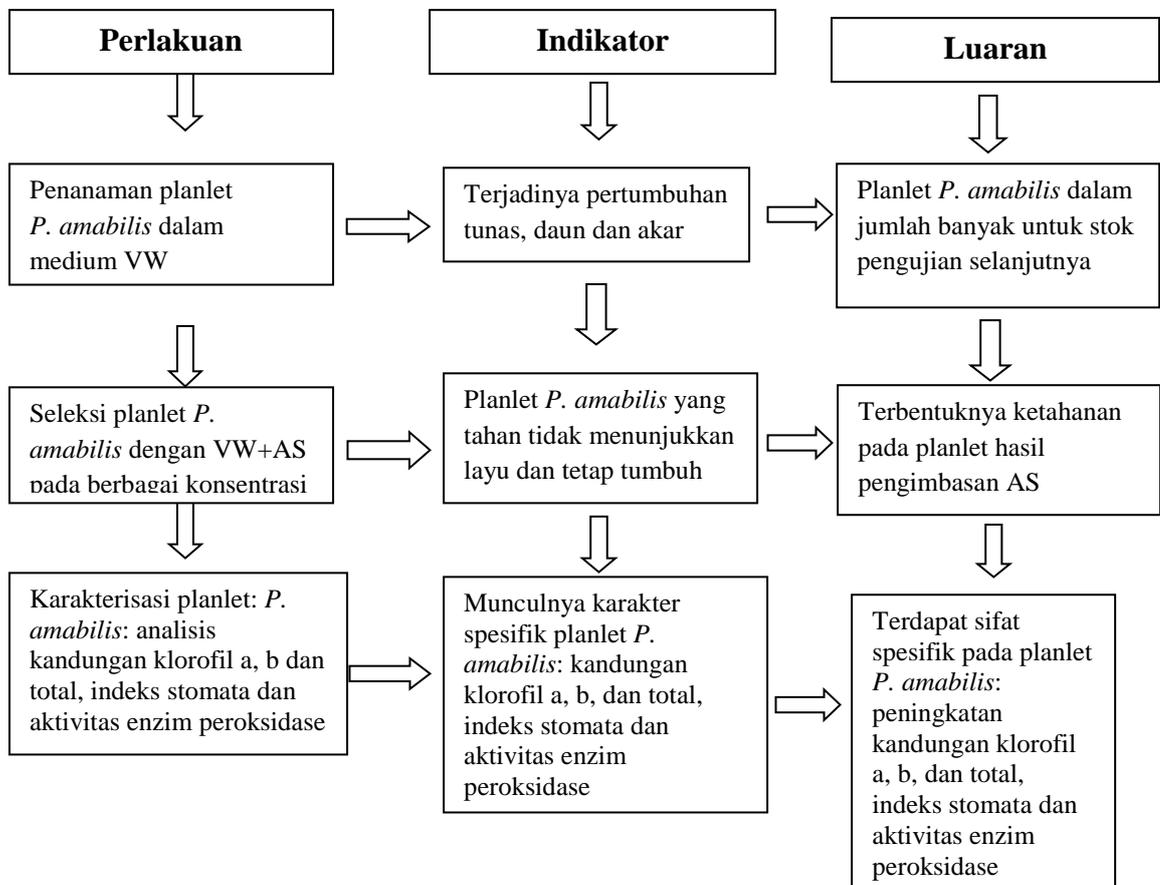
K₄ : Konsentrasi 45 ppm

K₅ : Konsentrasi 60ppm

U₁-U₅ : Ulangan 1 – ulangan 5

D. Bagan Alir Penelitian

Penelitian terdiri atas beberapa tahap, yaitu: 1) Penanaman planlet *P. amabilis* umur 4 bulan ke dalam medium VW yang sudah ditambahkan asam salisilat (AS) sesuai konsentrasi, 2) Penentuan kisaran konsentrasi AS toleran untuk seleksi planlet *P. amabilis* secara *in vitro*, 3) Analisis karakter ekspresi yang spesifik pada planlet *P. amabilis* meliputi persentase jumlah planlet yang hidup dan visualisasi planlet, analisis kandungan klorofil a, klorofil b, dan klorofil total, analisis aktivitas enzim peroksidase dan analisis indeks stomata. Tahap penelitian ini disajikan dalam bentuk bagan alir seperti tercantum pada Gambar 5.



Gambar 5. Bagan alir penelitian

E. Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian meliputi beberapa langkah sebagai berikut.

1. Persiapan Medium Tanam

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah VW padat.

Pembuatan medium tanam VW sebanyak 1 liter adalah dengan cara memipet sejumlah larutan stok (Lampiran 1), kemudian dimasukkan kedalam 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 autoclave dengan tekanan 17,5 psi, 121 °C selama 15 menit.

2. Persiapan Medium Seleksi

Medium VW ditambah AS dengan konsentrasi 0 ppm (kontrol), 15 ppm, 30 ppm, 45 ppm, 60 ppm. Sebelum digunakan, AS yang telah dilarutkan dengan akuades pada konsentrasi tertentu 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 AS ditambahkan ke dalam medium VW. Sebelum digunakan, medium diinkubasikan selama 7 hari pada suhu

kamar (25 °C) untuk memastikan bahwa AS 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 Salisilat

Eksplan yang digunakan berupa planlet steril. Planlet-planlet dari botol kultur dikeluarkan dengan pinset 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 terdiri dari 5 kali ulangan dan setiap ulangan terdiri dari 2 planlet *P. amabilis* dalam setiap botol kultur.

4. Pengamatan

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

a. Persentase Jumlah Planlet Hidup dan Visualisasi Planlet

Persentase jumlah planlet yang hidup merupakan jumlah planlet yang tahan atau toleran terhadap asam salisilat. Persentase jumlah planlet yang hidup diamati setiap satu minggu sekali. Persentase jumlah planlet yang hidup dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$\left[\frac{\text{Jumlah Planlet Hidup}}{\text{Jumlah Planlet Keseluruhan}} \right] \times 100$$

Visualisasi planlet meliputi warna tunas yang terbentuk dengan klasifikasi sebagai berikut: hijau, hijau dengan bagian tertentu berwarna coklat dan coklat. Data visualisasi planlet disajikan dalam bentuk persentase, yang dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$\left[\frac{\text{Jumlah Planlet Berwarna Hijau/ Hijau Cokelat/ Cokelat}}{\text{Jumlah Planlet Keseluruhan}} \right] \times 100$$

c. Analisis Kandungan Klorofil

Bahan untuk analisis kandungan klorofil menggunakan daun planlet *P. amabilis* yang sudah diimbas dengan AS, menggunakan metode Harbourne (1987) dengan spektrofotometer. Adapun langkah kerjanya sebagai berikut. Daun planlet *P. amabilis* 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 pada panjang gelombang (λ) 646 nm dan 663 nm, dengan ulangan tiap sampel sebanyak 3 kali. Kandungan klorofil dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\begin{aligned} \text{Klorofil total} &= 17,3 \lambda_{646} + 7,18 \lambda_{663} \text{ mg/l} \\ \text{Klorofil a} &= 12,21 \lambda_{663} - 2,81 \lambda_{646} \text{ mg/l} \\ \text{Klorofil b} &= 20,13 \lambda_{646} - 5,03 \lambda_{663} \text{ mg/l} \quad (\text{Harbourne , 1987}) \end{aligned}$$

d. Aktivitas Enzim Peroksidase

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

e. Analisis Indeks Stomata

Pembuatan preparat stomata dengan metode Ruzin (1999) sebagai berikut: Dibuat potongan-potongan segi empat dari daun planlet *P.amabilis* dengan sisi ± 5 mm dan dimasukkan ke dalam tabung berisi larutan kloralhidrat dalam air (5:1). Tabung dipanasi dalam *waterbath* selama $\pm 10-15$ 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

stomata (S) ditandai dengan (O). Indeks stomata dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$\left[\frac{S}{E+S} \right] \times 100$$

Hasil akhir adalah rata-rata dari 5 buah pengamatan (Ruzin, 1999).

f. Analisis Data

Data yang diperoleh dari pertumbuhan planlet *P. amabilis* selama seleksi dengan AS 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 *Analysis of Variance* dan uji lanjut dengan uji BNT pada taraf nyata 5%.