

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 untuk seleksi planlet *Vanilla planifolia* Andrews secara *in vitro* adalah aluminium foil, *Autoklaf*, *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, tabung reaksi, rak tabung reaksi, timbangan analitik, tisu, *waterbatt*, dan kamera Canon Ixus 265 HS.

Alat-alat yang dipergunakan untuk analisis prolin dan klorofil: gunting, timbangan analitik, mikropipet, spektrofotometer, pisau silet, kuvet,

alat-alat gelas (pipet ukur, gelas ukur, pipet Pasteur, tabung reaksi), mortar dan penumbuk, rak tabung reaksi, kertas pH, corong.

2. Bahan – bahan penelitian

Bahan–bahan yang digunakan adalah planlet *Vanilla planifolia* Andrews steril dalam botol kultur umur 2 bulan yang diperoleh dari koleksi pribadi Ibu Dr. Endang Nurcahyani, M.Si., 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 Murashige & Skoog (MS) padat yang komposisinya disajikan dalam Lampiran 1.

Bahan untuk analisa prolin yaitu asam sufosalisilat 3% (MERCK), ninhydrin (MERCK), asam fosforat, asam asetat glacial, toluene, prolin (SIGMA-ALDRICH), akar tanaman vanili dan kertas saring Whatman no 1.

Bahan analisis klorofil yaitu daun ke-2 planlet vanili dan aseton 80%.

C. Rancangan Percobaan

Rancangan Penelitian ini disusun dengan pola dasar Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan faktor tunggal yaitu konsentrasi PEG (BM 6000) dengan 5 taraf konsentrasi yaitu 0%, 5%, 10%, 15%, dan 20%. Masing-masing konsentrasi dilakukan 5 kali ulangan dan setiap ulangan terdiri dari 2 eksplan *Vanilla*

planifolia Andrews dalam setiap botol kultur. Tata letak percobaan disajikan pada Tabel 1 berikut.

Tabel 1. Tata letak satuan percobaan

V_1S_3	V_2S_1	V_1S_5	V_3S_1	V_5S_4
V_3S_5	V_2S_2	V_4S_1	V_1S_4	V_5S_3
V_5S_1	V_2S_4	V_5S_5	V_3S_3	V_3S_2
V_3S_4	V_1S_1	V_1S_2	V_4S_2	V_4S_4
V_2S_5	V_4S_3	V_2S_3	V_4S_5	V_5S_2

Keterangan :

V_1 : Konsentrasi 0 % (kontrol)

V_2 : Konsentrasi 5 %

V_3 : Konsentrasi 10 %

V_4 : Konsentrasi 15 %

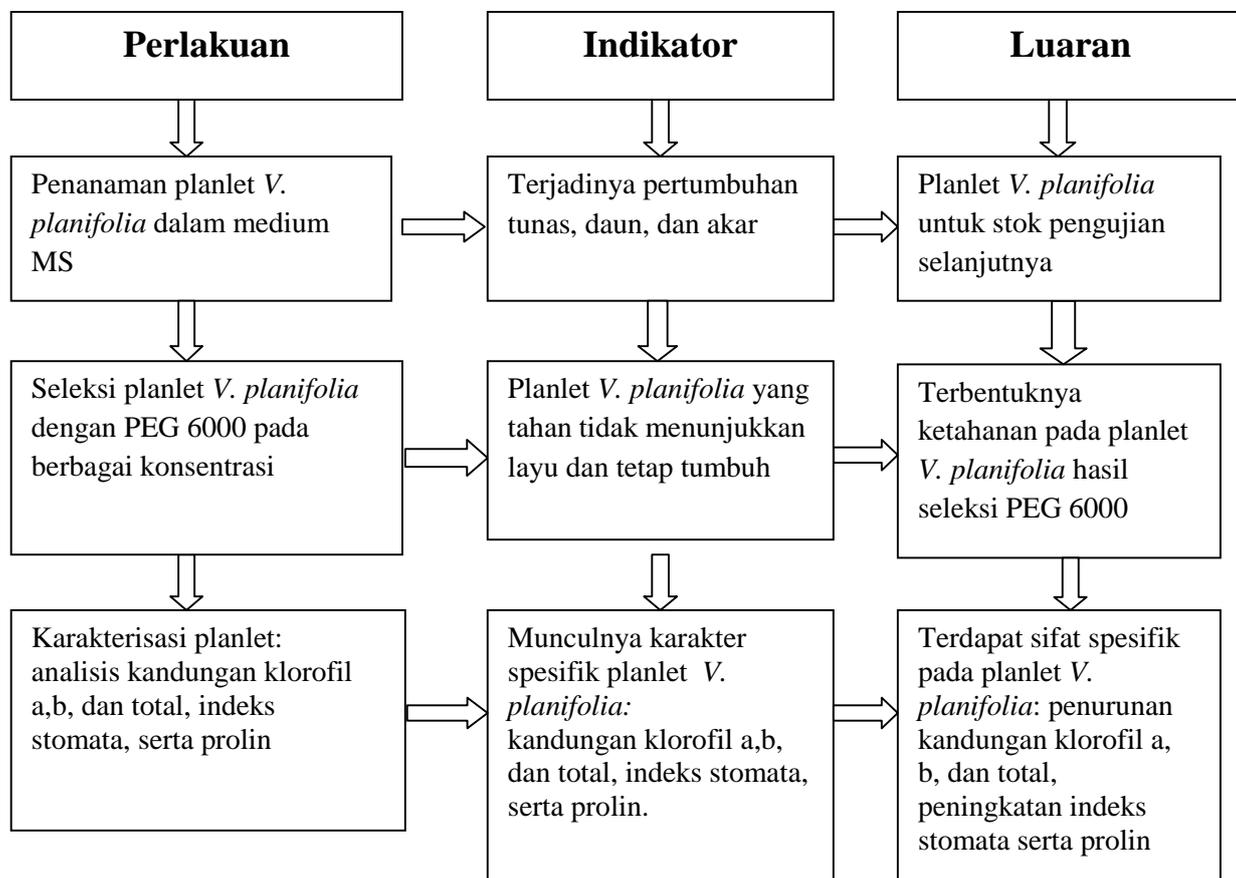
V_5 : Konsentrasi 20 %

S_1 - S_5 : Ulangan 1 – ulangan 5

D. Bagan Alir Penelitian

Penelitian terdiri atas beberapa tahap, yaitu: 1) Penanaman planlet *Vanilla planifolia* Andrews umur 2 bulan kedalam medium MS yang sudah ditambahkan PEG 6000 sesuai konsentrasi, 2) Penentuan kisaran konsentrasi PEG 6000 toleran untuk seleksi planlet *Vanilla planifolia* Andrews secara *in vitro*, 3) analisis karakter ekspresi yang spesifik pada planlet *Vanilla planifolia* Andrews resisten cekaman kekeringan meliputi persentase jumlah planlet yang hidup, visualisasi planlet, analisis kandungan klorofil a, klorofil b,

dan klorofil total, serta analisis kandungan prolin. Tahap penelitian disajikan dalam bentuk bagan alir seperti tercantum pada Gambar 3.



Gambar 3. Bagan alir penelitian

E. Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian meliputi beberapa langkah sebagai berikut.

1. Persiapan medium tanam

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Murashige & Skoog* (MS) padat. Pembuatan medium tanam MS 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 Murashige & Skoog (MS) padat ditambah PEG 6000 dengan konsentrasi 0% (kontrol), 5% , 10% , 15%, dan 20%. Sebelum digunakan, PEG 6000 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 PEG 6000 ditambahkan ke dalam medium MS. Sebelum digunakan, medium diinkubasikan selama 7 hari pada suhu kamar (25 °C) untuk memastikan bahwa PEG 6000 telah tersaring dengan baik. Apabila dalam waktu 7 hari tidak terjadi kontaminasi pada medium, maka medium dapat digunakan.

3. Penanaman planlet dalam medium seleksi PEG 6000

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-persatu, 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 2 eksplan *V. planifolia* dalam setiap botol kultur.

4. Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada akhir minggu ke-5 dan dievaluasi untuk mengetahui konsentrasi PEG 6000 yang toleran untuk seleksi planlet *V. planifolia* secara *in vitro*. Setelah 5 minggu inkubasi, planlet yang masih hidup di dalam botol kemudian dikarakterisasi dengan parameter sabagai berikut.

a. persentase jumlah planlet yang hidup

Penghitungan persentase jumlah planlet hidup vanili dengan menggunakan rumus:

$$= \frac{\text{Jumlah Planlet Hidup}}{\text{Jumlah Seluruh Planlet}} \times 100\%$$

(Nurcahyani, 2014)

b. visualisasi planlet

meliputi warna warna planlet setelah diseleksi PEG 6000 dengan klasifikasi sebagai berikut: hijau, hijau dengan bagian tertentu berwarna coklat, coklat.

c. Analisis kandungan klorofil

Bahan untuk analisis klorofil menggunakan daun planlet *V. planifolia* yang sudah diimbasi dengan PEG 6000, menggunakan metode Harbourn (1987) dengan spektrofotometer. Adapun langkah kerjanya sebagai berikut.

Daun planlet *V. planifolia* Andrews 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. Kadar klorofil dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

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

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

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

(Harbourn , 1987)

d. Analisis indeks stomata

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

Dibuat potongan-potongan segi empat dari daun planlet *V. planifolia* 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 kloralhidrat pada gelas benda. Permukaan yang ada stomatanya diletakkan disebelah atas, kemudian ditutup dengan gelas penutup. Preparat diamati pada 3 bagian daerah yang berlainan. Tiap sel epidermis (E) ditandai dengan (x), tiap stoma (S) ditandai dengan (O). Indeks stomata besarnya dihitung dengan rumus:

$\left\{ \frac{S}{E+S} \right\} \times 100$. Hasil akhir adalah rata-rata dari 5 buah pengamatan.

e. Analisis kandungan prolin

Daun planlet vanili diambil kemudian dibersihkan dan ditimbang sebanyak 0,1 gram (masing-masing perlakuan dilakukan 3 ulangan).

Daun ditumbuk dengan mortar di dalam larutan sulfosalisilat 3% sebanyak 2 ml kemudian disaring dengan kertas saring Whatman no. 1. Selanjutnya filtrat diambil sebanyak 0,4 ml, dimasukkan kedalam tabung reaksi, dan ditambah 0,4 ml asam ninhydrin. Asam ninhydrin dibuat dengan cara memanaskan 1,25 gram Ninhydrin dalam 30 ml asam asetat glasial dan 20 ml asam fosforat. Pemanasan dilakukan dalam waterbath pada suhu 100 °C hingga larut.

Filtrat dalam asam Ninhydrin ditambah 0,4 ml asam asetat glasial kemudian dipanaskan pada suhu 100 °C selama 1 jam, reaksi diakhiri dengan memasukkan tabung reaksi berisi filtrat kedalam gelas piala berisi es. Campuran filtrat, asam ninhydrin dan asam asetat glasial ditambah 0,8 ml toluen dan digojok dengan stirrer selama 15-20 detik sehingga terbentuk 2 lapisan cairan berwarna tidak sama. Toluena berwarna merah yang mengandung prolin diambil dengan pipet, dimasukkan kedalam kuvet, dan Optical Density (OD) dibaca pada panjang gelombang 520 nm (Bates,1973).

Kadar prolin dihitung dengan cara membuat larutan standar prolin terlebih dahulu yaitu 0,003 gram prolin standar dilarutkan dalam 10 ml asam sulfosalisilat 3 % dan diencerkan. Pengenceran dimaksudkan untuk mendapatkan variasi konsentrasi prolin. Selanjutnya larutan direaksikan dengan asam Ninhydrin dan asam asetat glasial, kemudian OD larutan dibaca pada panjang gelombang 520 nm.

Hasil absorbansi larutan standar dibuat persamaan regresi linier sehingga diperoleh persamaan: $Y = ax + b$. Nilai absorbansi sample selanjutnya dimasukkan sebagai nilai Y sehingga didapatkan nilai x (μ /mol).

$$\text{Kadar prolin} = \frac{(\mu/\text{mol prolin}/ \text{ml toluene})/ 115,13 \mu/\text{mol}}{\text{gram sample}/5}$$

$$= \mu \text{ mol prolin}/ \text{gram berat segar sample}$$

(Bates, 1973)

f. Analisis Data

Data yang diperoleh dari pertumbuhan planlet *V. planifolia* selama seleksi dengan PEG 6000 berupa data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif disajikan dalam bentuk deskriptif komparatif dan didukung foto. Data kuantitatif dari setiap parameter dianalisis dengan menggunakan Analisis Ragam. Analisis ragam dilakukan pada taraf nyata 5% dan uji lanjut dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) pada taraf nyata 5%.