

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian telah dilaksanakan dari bulan Juni sampai Agustus 2014 di Laboratorium Botani (ruang penelitian *in vitro*) dan Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

1. Alat – alat

Alat- alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah aluminium foil, Autoklaf, Laminar Air Flow Cabinet (LAF) merek 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, *sliding microtom*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, timbangan analitik, tisu, waterbatt, dan kamera Canon Ixus 951S.

2. Bahan – bahan

Bahan–bahan yang digunakan adalah benih tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill) berasal dari toko pertanian di Bandar Lampung, 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), Formalin Aseto Alkohol (FAA), safranin, anilin blue, dan bahan kimia medium *Murashige & Skoog* (MS) 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 salisilat yang terdiri atas 5 taraf 0 ppm, 15 ppm, 30 ppm, 45 ppm, dan 60 ppm. Masing-masing konsentrasi dilakukan 10 kali pengulangan dan setiap ulangan terdiri dari 3 eksplan tomat dalam setiap botol kultur.

Berikut di sajikan Tata letak satuan percobaan pada Tabel 2.

Tabel 2. Tata letak satuan percobaan

K ₁ U ₂	K ₂ U ₁	K ₁ U ₅	K ₃ U ₁	K ₃ U ₄
K ₂ U ₂	K ₁ U ₄	K ₄ U ₁	K ₁ U ₁	K ₅ U ₄
K ₄ U ₇	K ₃ U ₉	K ₅ U ₈	K ₅ U ₃	K ₂ U ₆
K ₂ U ₈	K ₄ U ₄	K ₁ U ₁₀	K ₂ U ₁₀	K ₄ U ₆
K ₅ U ₆	K ₅ U ₁	K ₂ U ₇	K ₄ U ₅	K ₁ U ₉
K ₃ U ₆	K ₁ U ₆	K ₃ U ₃	K ₃ U ₇	K ₅ U ₁₀
K ₁ U ₈	K ₄ U ₉	K ₅ U ₉	K ₄ U ₁₀	K ₃ U ₅
K ₄ U ₃	K ₂ U ₄	K ₁ U ₃	K ₁ U ₇	K ₂ U ₉
K ₂ U ₃	K ₃ U ₈	K ₄ U ₈	K ₅ U ₂	K ₅ U ₇
K ₃ U ₂	K ₂ U ₅	K ₃ U ₁₀	K ₄ U ₂	K ₅ U ₅

Keterangan :

K₁ : Konsentrasi 0 ppm (kontrol)

K₂ : Konsentrasi 15 ppm

K₃ : Konsentrasi 30 ppm

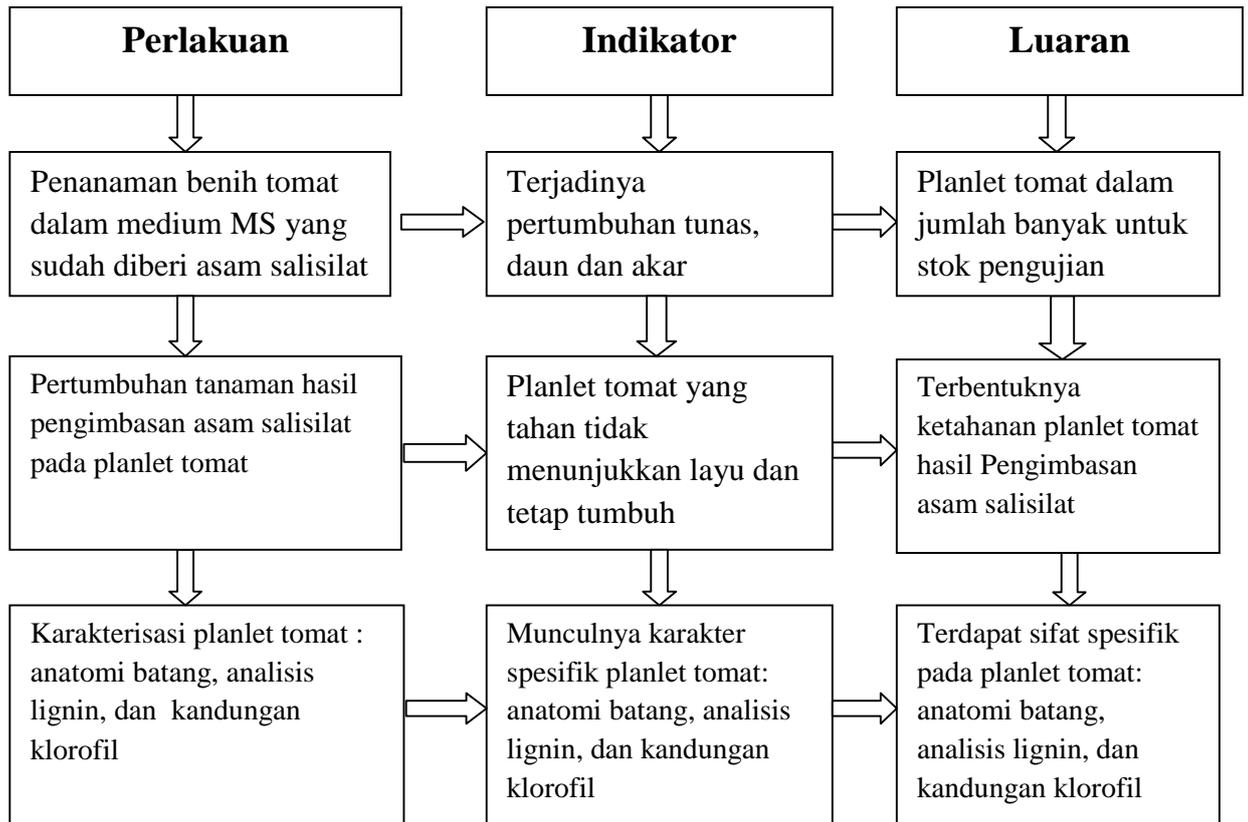
K₄ : Konsentrasi 45 ppm

K₅ : Konsentrasi 60 ppm

U₁-U₁₀ : Ulangan 1 – ulangan 10

D. Bagan Alir Penelitian

Penelitian terdiri atas beberapa tahap, yaitu: 1) Penanaman benih tomat kedalam medium MS yang sudah ditambahkan asam salisilat, 2) Penentuan konsentrasi asam salisilat toleran untuk seleksi planlet tomat secara *in vitro*; 3) analisis karakter ekspresi yang spesifik pada planlet tomat meliputi anatomi batang, analisis lignin, analisis kandungan klorofil a, klorofil b, dan klorofil total. Tahap penelitian ini disajikan dalam bentuk bagan alir seperti tercantum pada Gambar 2.



Gambar 2. 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) ditambah asam salisilat dengan konsentrasi 0 ppm (kontrol), 15 ppm, 30 ppm, 45 ppm, dan 60 ppm. Sebelum digunakan, asam salisilat 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 asam salisilat ditambahkan ke dalam medium MS. Sebelum digunakan, medium ini diinkubasikan selama 7 hari pada suhu kamar (25 °C) untuk memastikan bahwa asam salisilat telah tersaring dengan baik. Apabila dalam waktu 7 hari tidak terjadi kontaminasi pada medium, maka medium dapat digunakan.

3. Sterilisasi dan Penanaman benih dalam medium seleksi

Benih direndam dalam akuades, lalu dimasukkan ke dalam larutan *chlorox* 10% dikocok selama 10 menit. Benih dibilas dengan akuades, pembilasan dilakukan dua kali dan dikocok masing-masing 3 dan 2 menit. Setelah itu dipindahkan ke dalam cawan petri yang berisi *betadine* (bahan aktif: *Povidone iodine* 10%) ditambah akuades dan dibiarkan selama 30 menit,

kemudian benih dibilas dengan akuades steril, selanjutnya benih ditanam pada medium seleksi dengan penambahan ZPT. Penanaman benih dilakukan di dalam LAF *Cabinet*. Setiap botol kultur ditanami 3 benih, sehingga total benih yang ditanam sebanyak 150 dalam 50 botol kultur. Benih-benih tomat tersebut di tumbuhkan hingga menjadi planlet pada medium MS dengan penambahan asam salisilat. Inkubasi kultur dilakukan pada ruangan dengan penyinaran ± 1000 lux, 24 jam/hari dan suhu ± 20 °C.

4. Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada akhir minggu ke-8 dan dievaluasi untuk mengetahui konsentrasi asam salisilat yang toleran untuk seleksi planlet tomat secara *in vitro*. Setelah 8 minggu inkubasi, planlet yang masih hidup di dalam botol kemudian dikarakterisasi dengan parameter sabagai berikut.

a. Analisis lignin

Pengamatan lignifikasi pada irisan melintang batang planlet tomat yang telah dilakukan pengimbasan dengan asam salisilat menggunakan metode dari Ruzin (1999). Langkah kerja dilakukan sebagai berikut.

Planlet tomat dicabut kemudian batangnya dibersihkan dari sisa agar.

Batang yang sudah bersih difiksasi dengan cara direndam dalam FAA dan disimpan selama 24 jam. Batang selanjutnya dijepit dibagian tengah gabus, dan diiris dengan *sliding microtom* secara melintang dengan ketebalan 5-10 μm . Potongan irisan melintang direndam dalam safranin encer (1% w/v) selama 1,5 jam, kemudian dibilas dengan akuades.

Potongan batang yang telah dibilas direndam dalam larutan alkohol konsentrasi 70% selama 2-5 menit kemudian direndam dalam safranin dan dikering-anginkan. Sesudah kering, potongan batang diletakkan di atas gelas preparat dan ditutup dengan gelas penutup. Selanjutnya gelas preparat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Jaringan batang yang terlignifikasi akan tampak berwarna merah muda. Pengaruh asam salisilat, selanjutnya dideteksi efeknya antara lain melalui pengukuran ketebalan lignin pada dinding xilem. Pengukuran ketebalan lignin dengan menggunakan mikrometer okuler.

b. Analisis klorofil

Bahan untuk analisis klorofil menggunakan daun planlet tomat yang sudah diimbasi dengan asam salisilat, menggunakan metode Arnon (1949) dengan spektrofotometer. Adapun langkah kerjanya sebagai berikut. Daun planlet tomat yang seragam sebanyak 0,0120 g, kemudian ditambahkan larutan alkohol 70% sebanyak 5-15 ml. Kemudian dilakukan destruksi selama 15 menit hingga larutan klorofil yang tersisa di dalam Erlenmeyer sebanyak 5 ml. Setelah itu larutan yang didapat disentrifus selama 15 menit, filtrat yang didapat kemudian dimasukkan kedalam kuvet. Setelah itu dilakukan pembacaan serapan dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang (λ) 645 nm, 663 nm, dan 683 nm dengan ulangan tiap sampel sebanyak 6 kali. Kandungan klorofil dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\begin{aligned} \text{Klorofil total} &= [20,2(D645) + 8,02 (D663)] \times \frac{V}{1000x w} \\ \text{Klorofil a} &= [12,7(D683) - 2,69 (D645)] \times \frac{V}{1000x w} \\ \text{Klorofil b} &= [22,9(D645) - 4,68 (D663)] \times \frac{V}{1000x w} \end{aligned}$$

c. Analisis anatomi jaringan batang

Pembuatan preparat awetan penampang melintang batang planlet tomat menurut Ruzin (1999) sebagai berikut.

Batang planlet tomat difiksasi menggunakan larutan alkohol 70%. Setelah itu dilakukan pengirisan melintang batang dengan menggunakan *sliding microtom*, ketebalan 20-30 mikrometer. Irisan ditampung dalam *Petridish* yang diberi alkohol 70%. Lalu dilanjutkan pewarnaan dengan safranin 1% dan di bilas menggunakan akuades, kemudian ditambahkan anilin blue dalam alkohol 70% selama 24 jam. Kemudian preparat diletakkan di atas gelas benda, ditutup dengan gelas penutup yang sebelumnya diberi balsam kanada. Preparat dikeringkan di atas *hot plate* dengan suhu 45 °C hingga balsam kanada mengering. Terakhir dilakukan pemberian nama disebelah kiri gelas penutup dengan melekatkan etiket yang diberi keterangan nama spesies.

F. Analisis Data

Data yang diperoleh dari pertumbuhan planlet tomat 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 Analisis Ragam (*Analysis of*

Variance) atau Anova. Analisis ragam atau anova dilakukan pada taraf nyata 5% dan uji lanjut dengan uji BNT pada taraf nyata 5%.