

BAB III

METODE PENELITIAN

A. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen yang dilaksanakan dengan Rancangan Acak Lengkap Faktorial dua faktor yaitu faktor kombinasi larutan enzim dan lamanya waktu inkubasi. Kombinasi larutan enzim terdiri dari E1 (1,5 % Selulase + 0,2 % Pektinase), E2 (1% Selulase + 1 % Pektinase) dan E3 (1 % Selulase + 0,5 % Pektinase) dan lamanya waktu inkubasi terdiri dari 3, 5, 16 dan 21 jam. Setiap perlakuan merupakan kombinasi dari semua taraf faktor, sehingga terdapat dua belas perlakuan. Banyaknya pengulangan diperoleh dari hasil perhitungan menurut Gomez dan Gomez (1983) sebagai berikut:

$$(t) (r - 1) \geq 21$$

$$(12) (r - 1) \geq 21$$

$$12r \geq 33$$

$$r \geq 2$$

$$r = 3$$

Keterangan : t = banyak perlakuan

r = banyak pengulangan

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka banyaknya pengulangan untuk setiap perlakuan adalah tiga kali dan tiap ulangan akan diwakili oleh satu cawan petri.

B. POPULASI DAN SAMPEL

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh tanaman anggrek *Dendrobium* Thong Chai Golden dan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dari tanaman *juvenil Dendrobium* Thong Chai Golden.yang ditanam secara *in vitro*. Tanaman diperoleh dari Rumah Bunga Rizal, Maribaya, Bandung.

C. WAKTU DAN LOKASI PENELITIAN

Penelitian dimulai pada bulan Juni 2012 hingga Februari 2013. Isolasi dan kultur protoplas dilakukan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, sedangkan pengamatan protoplas dilakukan di Laboratorium Struktur Tumbuhan Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA UPI.

D. ALAT DAN BAHAN

Alat-alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terlampir pada Lampiran 1, sedangkan komposisi medium Murishage dan Skoog dengan setengah kekuatan (MS 0,5) terlampir pada Lampiran 2.

E. PROSEDUR KERJA

Prosedur kerja dalam penelitian ini dibagi kedalam beberapa tahap pelaksanaan yaitu tahap persiapan, tahap percobaan dan tahap pengamatan.

1. Tahap Persiapan

Tahap persiapan meliputi pembuatan larutan dan medium serta sterilisasi alat yang digunakan dalam penelitian.

a. Pembuatan Larutan dan Medium

1) Larutan Stok

Larutan stok terdiri dari makronutrien, mikronutrien, dan vitamin dan dibuat menjadi 7 kelompok larutan yaitu

- a) Larutan stok 1 : NH_4NO_3
- b) Larutan stok 2 : KNO_3
- c) Larutan stok 3 : $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- d) Larutan stok 4 : $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- e) Larutan stok 5 : KH_2PO_4 , KI, H_3BO_3 , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- f) Larutan stok 6 : $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- g) Larutan stok 7 : Inositol, Asam Nikotinat, HCL Piridoksin, HCL Tiamin, Glisin

Larutan stok 1 dan 2 dilarutkan dalam 200 ml aquades, sedangkan larutan stok 3-4 dalam 100 ml aquades. Untuk melarutkan bahan stok 6 ditambahkan sedikit demi sedikit HCl 1 N kedalam larutan. Stok zat pengatur tumbuh dibuat dengan melarutkan masing-masing NAA dan BAP dengan sedikit NaOH 1 N, kemudian ditambahkan aquades hingga volumenya mencapai 100 ml. Stok NAA dan BAP dibuat dengan konsentrasi 0,05 mg/ml.

2) Larutan Isolasi, Larutan Enzim, Larutan Cuci dan Medium Kultur

Komposisi zat yang terkandung dalam larutan isolasi, larutan enzim dan larutan cuci ditunjukkan pada Lampiran 2. Derajat keasamaan (pH) setiap larutan dan medium diatur hingga 5,8. Larutan enzim disterilisasi dengan filtrasi menggunakan filter selulosa asetat (pori 0,2 μ m), sedangkan larutan cuci dan medium kultur disterilisasi dengan autoklaf.

3) Medium $\frac{1}{2}$ MS

Medium $\frac{1}{2}$ MS mengandung setengah konsentrasi dari makro dan mikronutrien. Untuk membuat 1 liter larutan MS, setiap larutan stok dimasukkan kedalam *beaker glass* sesuai volume yang telah dihitung. Aquades ditambahkan sebanyak 50 ml, kemudian aduk dengan *magnetic stirrer* diatas *hot plate*. Jika sudah homogen, sukrosa ditambahkan sebanyak 30 gr dan volume digenapkan menjadi 1 liter, selanjutnya pH medium diatur hingga 5,8 menggunakan pH meter. Medium disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit.

b. Sterilisasi Alat

Semua alat tanam seperti pinset, pisau bedah, cawan petri, tips makro dan mikropipet, *plastic mesh* 50 μ m, *centrifuge tube*, dan botol kultur disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit. Cawan petri diisi dengan kertas saring dan aluminium foil.

2. Tahap Percobaan

Tahap ini merupakan tahap inti dari penelitian, diawali dengan dilakukannya penentuan osmotikum sebagai tahap pra penelitian, selanjutnya tahap isolasi, purifikasi dan penanaman dalam medium kultur.

a. Penentuan Osmotikum Larutan dan Medium

Manitol digunakan sebagai agen osmotikum. Konsentrasi manitol yang diuji adalah 0,3 M, 0,4 M, 0,5 M, dan 0,6 M. Daun dipotong menjadi potongan kecil dan diinkubasi selama satu jam dalam 10 ml larutan manitol. Inkubasi dilakukan dalam keadaan gelap diatas *shaker* pada kecepatan 40 rpm. Plasmolisis sel diamati dibawah mikroskop cahaya. Persentasi sel yang plasmolisis dihitung mengikuti rumus sebagai berikut :

$$\text{Plasmolisis (\%)} = \frac{\text{jumlah sel plasmolisis} \times 100}{\text{jumlah sel yang dihitung}}$$

Konsentrasi manitol yang menyebabkan gejala *incipient plasmolysis* dipilih sebagai konsentrasi manitol untuk isolasi protoplas.

b. Isolasi Protoplas

Prosedur isolasi diadaptasi dari penelitian yang telah dilakukan oleh Rahmat (2002). Isolasi dilakukan secara steril didalam *laminar*. Tahapan isolasi diawali dengan tahap preplasmolisis. Sebanyak 1 g daun dipotong-potong menjadi bagian-bagian kecil dalam cawan petri, kemudian direndam dalam 5 ml larutan isolasi dan dibiarkan selama 30 menit. Sebanyak 1 ml larutan enzim dengan konsentrasi berbeda (E1, E2 dan E3) ditambahkan kedalam larutan potongan daun dan diinkubasi pada keadaan gelap diatas *shaker* pada kecepatan 50 rpm selama 3, 5, 16 dan 21 jam.

c. Purifikasi Protoplas

Campuran protoplas dan larutan enzim kemudian difilter melalui *plastic mesh* 60 µm untuk memisahkan protoplas dari jaringan daun yang tidak tercerna. Kedalam filtrat yang diperoleh ditambahkan 2 ml larutan cuci, kemudian

disentrifugasi pada kecepatan 750 rpm selama 10 menit. Supernatant dibuang dan pelet diresuspensikan dalam 5 ml larutan cuci yang selanjutnya disentrifugasi kembali selama 5 menit. Protoplas diresuspensikan dalam 6 ml larutan cuci untuk dihitung.

d. Perhitungan Jumlah Protoplas

Jumlah protoplas dihitung dengan *Improved Neubauer Haemocytometer*. Sebanyak 20 µl suspensi protoplas dipipet kedalam salah satu kamar hitung pada haemositometer. Jumlah protoplas dihitung berdasarkan keberadaannya pada empat bidang besar berukuran 0,1 mm disetiap sisi pada kamar hitung. Banyaknya protoplas ditetapkan sebagai protoplas hasil per gram berat basah jaringan. Jumlah protoplas dihitung mengikuti rumus pada penelitian sebelumnya (Ling *et al*, 2010) sebagai berikut :

$$\text{Jumlah Protoplas (Protoplas/gFW)} = \frac{\text{rata-rata jumlah sel} \times \text{suspensi protoplas (ml)}}{\text{berat basah jaringan (g)}}$$

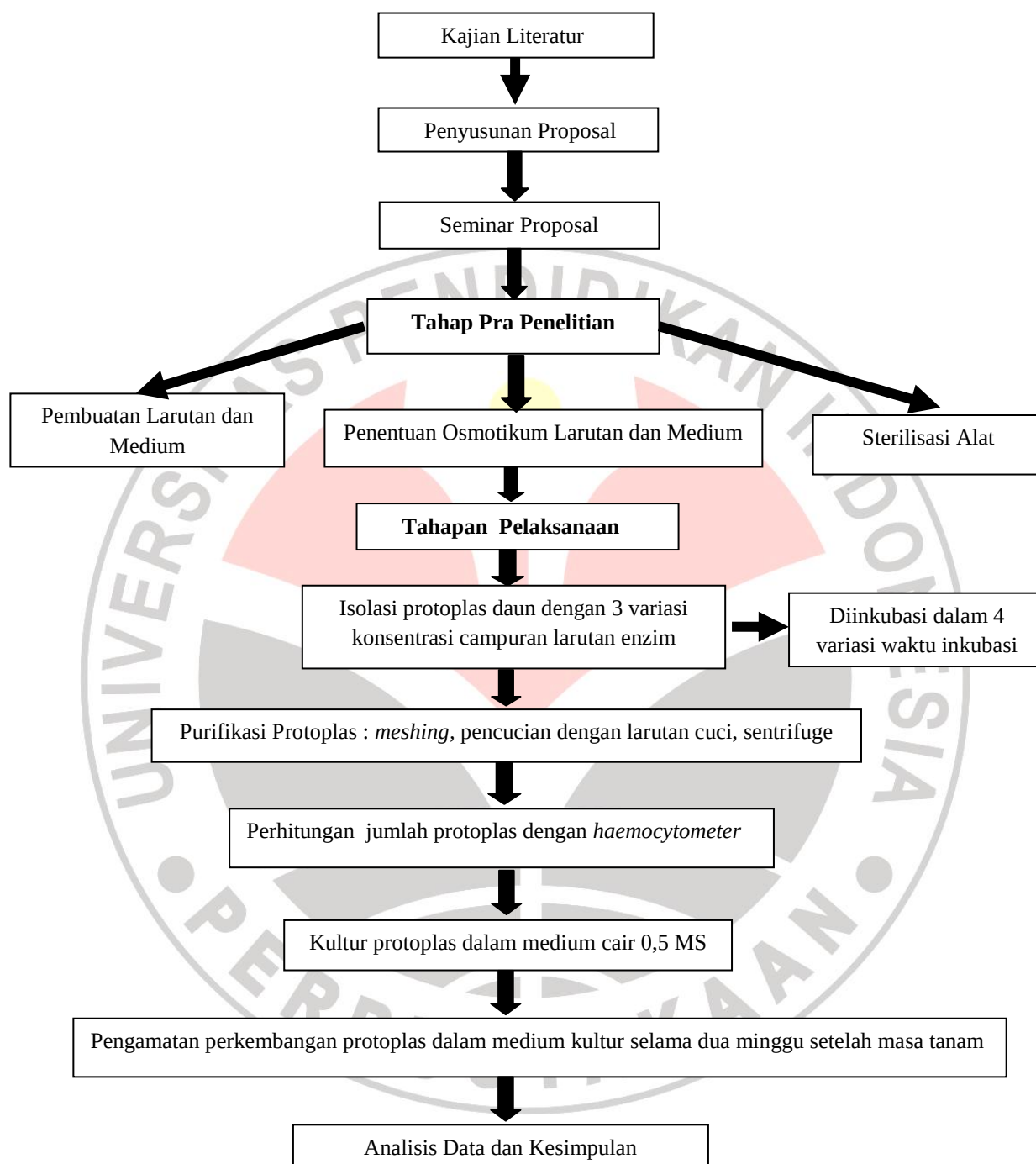
e. Kultur dan Pengamatan Protoplas

Protoplas dikultur dalam medium ½ MS cair. Sebanyak 2 ml dari suspensi protoplas dikultur kedalam 3 ml medium kultur. Cawan kultur disegel dengan *plastic wrap* dan disimpan dalam ruang kultur pada suhu kamar dan keadaan gelap. Pengamatan perkembangan protoplas dengan mikroskop inverter.

F. Analisis Data

Untuk membandingkan rerata antar kelompok perlakuan dengan antara kedua faktor yaitu kombinasi enzim dan waktu inkubasi terhadap perolehan jumlah protoplas hasil maka digunakan analisis statistik berupa *Two Way ANOVA* pada taraf kepercayaan 0,05 menggunakan program SPSS 19 *for windows*. *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dilakukan untuk mengetahui perlakuan terbaik terhadap perolehan protoplas hasil.

G. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian