

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) secara faktorial, dengan faktor I varietas kedelai dan faktor II tingkat ketersediaan air. Varietas kedelai yang digunakan adalah Tanggamus (V1), Wilis (V2) dan Burangrang (V3) yang berturut-turut merupakan kedelai toleran, moderat, dan peka terhadap kekeringan. Tingkat ketersediaan air terdiri dari 4 taraf yaitu: 100% (A1), 75% (A2), 50% (A3) dan 25% (A4) dari kebutuhan air per hari tanaman kedelai. Perhitungan perlakuan tingkat ketersediaan air dapat dilihat pada lampiran 1. Masing-masing perlakuan diulang empat kali. Dan kombinasi dari dua faktor tersebut adalah, sebagai berikut:

V1A1	V2A1	V3A1
V1A2	V2A2	V3A2
V1A3	V2A3	V3A3
V1A4	V2A4	V3A4

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di *Green house* dan Laboratorium Optik Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Dilaksanakan pada bulan Agustus 2009-April 2010.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Varibel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah varetas kedelai: Tanggamus (V1), Wilis (V2), Burangrang (V3) dan simulasi untuk cekaman kekeringan atau tingkat ketersediaan air yaitu 100% (A1), 75% (A2), 50% (A3), 25% (A4) kebutuhan air tanaman kedelai per hari.

3.3.2 Variabel Terikat

Varibel terikat dalam penelitian ini merupakan varibel yang diamati dari ketiga varietas kedelai pada cekaman kekeringan yaitu tampilan anatomi daun dari beberapa kedelai meliputi: tebal mesofil, tebal kutikula, lebar celah stomata, kerapatan stomata, indeks stomata, dan kerapatan trikomata.

3.4 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain polibag, skrop, mikroskop komputer CX 31, mikroskop komputer Nikon SMZ 1500, pipet tetes, kaca benda, kaca penutup, kuas kecil, gelas ukur, safranin, isolasi bening, kutek, beaker glass, pisau silet, timbangan analitik, hand counter, *sliding microtome*, kantong plastik, kertas label, timbangan, alat tulis.

3.5 Prosedur Kerja

3.5.1 Perlakuan Cekaman Kekeringan

Kedelai ditanam dalam tanah seberat 5 kg yang ditempatkan di polibag. Berat tanah 5 kg ini ditetapkan berdasarkan asumsi bahwa berat tanah lapisan olah dalam satu hektar adalah 2 juta kg (Harsono 2005) dan populasi optimal kedelai dalam satu hektar adalah 400 ribu tanaman (Irwan, 2006). Tiap polibag ditanam 3-4 benih kedelai. Sebelum ditanami, lubang tanam ditaburi furadan 3GR. Pemupukan 0,5 g urea, 1,0 g TSP dan 1,0 g KCL diberikan setelah bibit berumur satu minggu setelah tanam agar tanaman tidak kekurangan nutrisi. Pada umur 2 minggu setelah tanam dilakukan penjarangan sehingga pada tiap pot hanya terdapat satu tanaman sehat.

Benih yang telah ditanam diberi perlakuan cekaman kekeringan dengan empat tingkat ketersediaan air, yaitu 100%, 75%, 50% dan 25% kebutuhan air tanaman per hari. Tingkat ketersediaan air 100% adalah kontrol dan merupakan kebutuhan air per hari tanaman kedelai. Tanaman lain diberi perlakuan dengan kadar air 75%, 50%, 25%. Pada saat tanam sampai tanaman memasuki stadium kecambah akhir semua pot diberi air dengan kadar 100% kebutuhan air per hari. Hal ini dilakukan untuk menunjang perkecambahan dan pertumbuhan awal tanaman. Perlakuan cekaman dilakukan setelah stadium kecambah akhir atau memasuki fase vegetatif, yaitu saat tanaman memiliki 3 buku di batang utamanya dan selama masa pertumbuhan. Tanaman mulai diamati pada saat tanaman memasuki stadia pertumbuhan generatif (R1), yaitu saat tanaman mulai berbunga.

3.5.2 Pengamatan Stomata

Pengamatan stomata dilakukan pada saat tanaman memasuki stadia pertumbuhan generatif (R1) dengan mengamati sayatan dari epidermis bawah daun kedelai. Pembuatan preparat untuk pengamatan stomata dilakukan dengan metode stomatal printing (Perdani, 2007) yaitu permukaan bawah daun diolesi kutek dan dibiarkan mengering. Kemudian kutek dikelupas menggunakan isolasi dan diletakan di atas gelas benda. Preparat diamati dibawah mikroskop komputer Olympus CX 31 dengan perbesaran 400 kali. Anatomi yang diamati adalah kerapatan, indeks stomata dan lebar celah stomata

3.5.2.1 Kerapatan dan Indeks Stomata

Pengamatan kerapatan dan indeks stomata dilakukan dengan menghitung stomata dari hasil foto dibawah mikroskop komputer Olympus CX 31. Menurut Sulistyowati dkk (1997) kerapatan stomata dan indeks stomata dihitung menggunakan rumus:

- Kerapatan Stomata

$$RS = \frac{S1 + S2 + S3 + \dots + Sn}{n}$$

$$KS = \frac{RS}{LBP}$$

$$LBP = P \times l$$

Keterangan:

S1 : Stomata bidang pandang 1

S2 : Stomata bidang pandang 2

S3 : Stomata bidang pandang 3

Sn : Stomata bidang pandang n

RS : Rata-rata Stomata

KS : Kerapatan Stomata

LBP : Luasan Bidang Pandang untuk perbesaran $400 \times$ ($P = 0.162 \text{ mm}$, $l = 0,122 \text{ mm}$)

Kerapatan stomata diklasifikasikan menjadi (Agustini, 1999 dalam, Kurnia, 2005):

- (1.) Kerapatan rendah ($< 300/\text{mm}^2$)
- (2.) Kerapatan sedang ($300\text{-}500/\text{mm}^2$)
- (3.) Kerapatan tinggi ($> 500/\text{mm}^2$)

▪ Indeks Stomata

$$I = \frac{S}{S + E}$$

Keterangan:

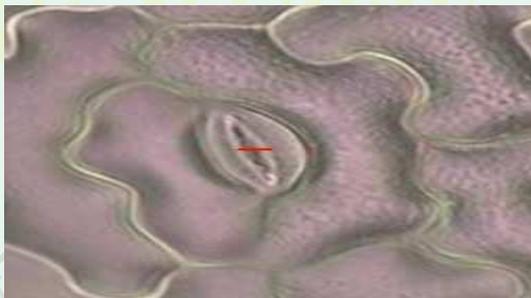
I : Indeks Stomata

S : Stomata

E : Sel Epidermis

5.2.3 Pengamatan Lebar Celah Stomata

Pembuatan preparat untuk pengamatan lebar celah stomata sama seperti preparat untuk kerapatan stomata dan indeks stomata dilakukan dengan metode stomatal printing (Perdani, 2007) yaitu permukaan bawah daun diolesi kutek dan dibiarkan mengering. Kemudian kutek dikelupas menggunakan isolasi dan diletakan di atas gelas benda. Preparat diamati dibawah mikroskop komputer Olympus CX 31 dengan perbesaran 400 kali. Pengamatan lebar celah stomata dilakukan pada jam 8, 10 dan 12 menggunakan sampel daun yang masih berada di tanaman. Pengukuran lebar celah dilakukan menggunakan aplikasi *measurements* dari mikroskop komputer Olympus CX 31 dengan cara sebagai berikut:



Gambar 3.1 Cara Mengukur Lebar Celah Stomata (Dokumen pribadi)

3.5.3 Pengamatan Trikomata

Menurut Dahlin *et.al* (1992) daun yang digunakan untuk pengamatan trikomata adalah daun yang telah benar-benar terbuka yaitu daun ke-3 atau ke-4 dari pucuk pada saat tanaman memasuki stadium R1. Kerapatan trikomata daun diamati dengan menggunakan *macrocomp* dengan perbesaran 15 kali. Trikomata dihitung dengan cara menghitung banyaknya trikomata permukaan bawah daun.

Perhitungan diulang 3 kali tiap satu sampel. Untuk mendapatkan kerapatan trikomata, rerata yang didapatkan dari tiga kali ulangan tiap satu sampel dihitung menggunakan rumus:

$$RT = \frac{T1+T2+T3+...+Tn}{n}$$

$$KT = \frac{RT}{LBP}$$

$$LBP = P \times l$$

Keterangan:

- T1 : Trikomata bidang pandang 1
 T2 : Trikomata bidang pandang 2
 T3 : Trikomata bidang pandang 3
 Tn : Trikomata bidang pandang n
 RT : Rata-rata Trikomata
 KT : Kerapatan Trikomata
 LBP : Luasan Bidang Pandang untuk perbesaran 20 × (P = 6 mm, l = 4,5 mm)

Kerapatan trikomata diklasifikasikan menjadi (Agustini, 1999 dalam, Kurnia, 2005):

- (1.) Kerapatan rendah (< 5/mm²)
- (2.) Kerapatan sedang (5-10/mm²)
- (3.) Kerapatan tinggi (> 10/mm²)

3.5.4 Pengamatan Tebal Kutikula dan Tebal Mesofil Daun

Pengamatan ini dilakukan dengan membuat preparat melintang daun yaitu menggunakan preparat semi permanen. Daun yang digunakan adalah pada saat tanaman memasuki stadium R1. Daun dipotong sepanjang 1×1 cm dengan menggunakan silet tajam, gabus ketela pohon yang berbentuk silinder dengan garis tengah 1 cm, dipotong sepanjang 4 cm kemudian dibelah menjadi 2 bagian. Selanjutnya potongan daun dijepit diantara kedua gabus tersebut dan dimasukkan ke penjepit mikrotom geser (*sliding microtome*) dan dibuat irisan melintang setipis mungkin untuk mendapatkan hasil yang benar-benar transparan. Irisan daun tersebut dipisahkan dari gabusnya dan dimasukkan ke dalam safranin $1\% \pm 1$ menit. Kemudian irisan tersebut diletakan pada kaca preparat, ditetesi gliserin dan ditutup dengan gelas penutup. Agar kaca penutup tidak mudah terlepas bagian tepi kaca penutup dirkatkan menggunakan kutek kemudian diamati dengan mikroskop komputer Olympus CX 31. Tebal mesofil diamati dengan perbesaran 100 kali kemudian difoto dan diukur menggunakan aplikasi *measurements*. Untuk tebal kutikula diamati dengan perbesaran 400 kali, difoto dan diukur ketebalannya menggunakan program *measurements*.

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisa menggunakan analisis variansi (ANOVA). Apabila ada pengaruh nyata pada perlakuan maka dilanjutkan dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan taraf kepercayaan 5%.