

**MODUL PETUNJUK PRAKTIKUM
MK FISILOGI TUMBUHAN**



Disusun oleh

Dr.rer.nat. Yunus Effendi, M.Sc.

PROGRAM STUDI BIOLOGI (BIOTEKNOLOGI)

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS AL AZHAR INDONESIA

JAKARTA - 2020

PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim,

Buku modul praktikum Fisiologi tumbuhan ini merupakan buku petunjuk pelaksanaan praktikum fisiologi tanaman yang berisikan topik-topik praktikum untuk menunjang pengetahuan teoritis yang didapat mahasiswa peserta MK Fisiologi Tumbuhan. Terdapat beberapa topik praktikum fisiologi dasar seperti pengukuran laju fotosintesis, estimasi pigmen fotosintesis, pengukuran senyawa metabolit sekunder seperti fenol dan asam amino prolin, juga pengukuran laju transpirasi tanaman.

Pengembangan materi maupun isi dari modul praktikum ini akan selalu diusahakan ter-update, sehingga dapat selalu mengikuti perkembangan ilmu fisiologi tanaman khususnya yang berupa terapan dari prinsip-prinsip Ilmu fisiologi tanaman. Insya Allah akan selalu ada pengembangan dari modul praktikum untuk MK Fisiologi Tumbuhan kedepannya.

Penyusun

DAFTAR ISI

Pengantar	2
Daftar Isi	3
Modul 1 PENGUKURAN POTENSIAL AIR PADA TANAMAN	4
Modul 2 STUDI TRANSPIRASI	7
Modul 3 PENGUKURAN FOTOSINTESIS PADA CAKRAM DAUN	9
Modul 4 EFEK ASAM GEBBERELLIN TERHADAP PRODUKSI GULA REDUKSI	11
Modul 5 ESTIMASI FENOL	13
Modul 6 PENGUKURAN PIGMEN FOTOSINTESIS	15
Modul 7 ESTIMASI KANDUNGAN PROLIN	17

MODUL 1

PENGUKURAN POTENSIAL AIR PADA TANAMAN

Tujuan:

Mahasiswa diharapkan mampu dan memiliki pengalaman dalam mengukur potensial air tanaman melalui eksperimen menggunakan umbi kentang dengan metode “falling drop”

Bahan dan Prosedur:

Umbi kentang (wortel atau daun)	Pipet
60 ml larutan sukrosa (0.5 M)	Rak tabung reaksi
10 ml larutan metilen blue (0.2% w/v dlm H ₂ O)	Cork borer
Tabung reaksi	Forceps
Piper kapiler	

A. Kontrol dan Serial tes konsentrasi Sukrosa.

- Persiapkan 8 tabung reaksi dan letakkan dalam rak tabung reaksi.
- Tambahkan 10 ml air dan buat serial larutan sukrosa dengan konsentrasi yang berbeda, dimulai dari 0.1 M – 0.5 M (berjarak 0.05 M).
- Label tabung sebagai serial kontrol
- Siapkan tabung dengan larutan serupa dan label dengan serial tes
- Masukkan 0.1 ml dari tiap konsentrasi larutan ke dalam serial tabung reaksi lainnya (tabung tes)

B. Penentuan potensial air umbu kentang.

- Menggunakan cork borer (diameter 4 mm), potong bentuk silinder dari umbi kentang (sudah dikupas) yang sudah dipersiapkan sebelumnya.
- Potong silinder umbi kentang tadi menjadi 2 cm potongan
- Transfer segera potongan silinder umbi kentang tersebut ke dalam tabung serial tes
- Lakukan untuk semua tabung reaksi serial test. Pastikan potongan silinder umbi kentang terendam dalam larutan sukrosa utk tiap tabung reaksi.

- Teteskan satu tetes larutan metilen blue pada masing masing tabung reaksi berisi potongan umbi kentang dan kocok pelan agar tercampur homogen pada tabung reaksi. Diamkan selama 30 menit.
- Setelah 30 menit ambil sedikit larutan dari tabung test menggunakan pipet kapiler. Letakan pipet berisi larutan tersebut sekitar 1 cm berjarak dari permukaan larutan pada tabung serial kontrol (konsentrasi yang sama). Kemudian teteskan secara perlahan pada tabung berisi larutan kontrol tersebut dan amati perilaku dari tetesan tersebut, apakah larutan test tersebut mengambang atau meluruh ke dalam larutan kontrol. Jika mengambang menunjukkan bahwa larutan test mengalami penurunan densitas larutan, sebaliknya jika larutan test meluruh ke dalam larutan test, menunjukkan bahwa larutan test mengalami peningkatan densitas dari densitas awal larutan. Namun jika larutan test terdispersi/berdifusi bebas pada larutan kontrol, mengindikasikan bahwa densitas larutan test dan larutan kontrol adalah sama atau memiliki densitas yang kurang lebih sama.
- Lakukan prosedur serupa untuk semua larutan test dan ulang prosedur tersebut dengan interval 30 menit selama 2 jam (4 titik pengukuran)
- Catat dan buat hasil pengamatan pada tabel berikut

Tabung kontrol	Larutan test (M)	Potensial Osmotik (Atm)	Pergerakan droplet (Min)*							
			15	30	45	60	75	90	105	
1	0.15	-4.0								
2	0.20	-5.3								
3	0.25	-6.7								
4	0.30	-8.1								
5	0.35	-9.6								
6	0.40	-11.1								
7	0.45	-12.7								
8	0.50	-14.3								

*Menunjukkan pergerakan relatif dari droplet pada serial larutan kontrol (naik, turun atau nol)

Pertanyaan/Tugas:

Intepretasikan hasil yang sudah diperoleh dari tabel di atas dan estimasi nilai potensila air pada umbi kentang yang diuji. Pelru dicatat bahwa potensial air dari suatu jaringan adalah ekivalen dengan potensial osmotic dari larutan gula yang tidak mengalami pergerakan/perpindahan air dari atau ke dalam jaringan.

MODUL 2

STUDI TRANSPIRASI

Tujuan:

Mempelajari efek faktor-faktor lingkungan terhadap transpirasi tanaman dengan menggunakan metode potometer

Material dan Prosedur:

- Tanaman herbaceous (tomat, bayam, pacar air, etc)
- Tabung capiller U
- Botol dengan mulut lebar
- Sumber sinar (lampu atau sejenisnya)
- Cork borer
- Penutup botol (styrofoam atau sejenisnya)
- Kipas angin
- parafin
- Air 1 liter (didihkan kemudian dinginkan pada suhu temperatur ruangan)

Prosedur:

A. Potometer

- Persiapkan potometer seperti nampak pada gambar 1.
- Prosedur penyiapannya adalah: buat lubang pada penutup botol, buat penutup botol terpasang tepat pada mulut botol (tidak ada kebocoran). Lubang yang dibuat berukuran kurang lebih sama dengan diameter batang pipa U yang akan . Pastikan pada penutup botol masih terdapat cukup space untuk membuat lubang ke-2.
- Buat lubang ke-2 pada tutup botol dengan ukuran yang dapat mengakomodir batang tanaman yang akan digunakan.
- Potong batang tanaman, dengan posisi didalam air dan pasang batang tanaman tersebut pada tutup botol yang sudah dilubangi. Proses ini juga lakukan di dalam air.

- Isi botol dengan air masak, kemudian tarik batang tanam dengan cepat dan pasang penutup botol tersebut pada botol yang sudah disiapkan. Pastikan bahwa sekitar 3 cm batang tanaman ada di dalam botol.
- Selanjutnya pasang ujung pipa U pada lubang yang ada di tutup botol. Pastikan sekitar 2 cm ujung tabung U ada di dalam botol
- Tabung capiler U juga harus diisi dengan air. Untuk itu letakkan ujung lainnya dari tabung kapiler U ke dalam beaker glass atau botol lainnya yang berisi air masak.

B. Pengoperasian Potometer

- Pastikan tabung kapiler U terisi penuh air.
- Masukkan sebuah gelembung udara kecil ke dalam kapiler U dengan cara mengangkat ujung kapiler U yg ada di dalam beaker glass beberapa saat, dan rendam kembali ujung pipa kapiler U ke dalam air di dalam beaker glass. Biarkan gelembung udara terperangkap di dalam tabung capiler U.
- Gelembung udara tersebut akan digunakan sebagai indikator laju transpirasi dengan menghitung waktu seberapa cepat gelembung udara tersebut bergerak melewati jarak tertentu dalam pipa capiller U yang berada pada posisi mendatar.

C. Efek lingkungan terhadap transpirasi

- Letakan alat yang sudah disetting tersebut di atas pada beberapa lokasi yang berbeda, misalnya di dalam kelas, di greenhouse, atau tempat lain yang mempunyai kondisi abiotik berbeda misalnya suhu, atau sinar matahari atau kecepatan angin.
- Catat jarak yang ditempuh oleh gelembung udara pada satuan waktu tertentu untuk lokasi-lokasi yang berbeda pada salah satu faktor abiotik tersebut di atas.

MODUL 3

PENGUKURAN FOTOSINTESIS PADA CAKRAM DAUN

Tujuan:

Mendemonstrasikan metode infiltrasi sodium bikarbonat pada cakram daun dalam pengukuran laju fotosintesis pada jaringan tanaman

Material dan Prosedur:

• Daun Coleus	• Cork borer
• Daun bayam atau lainnya yang relatif tipis	• Alat infiltrasi (aspirator air, pipa kaca dan karet, botol kaca, tutup karet)
• Buffer sitrat fosfat (pH 6.8)	• Cawan petri (diameter 5cm)
• 0.001 M NaHCO ₃ buffer (pH 6.8)	• Sumber cahaya (lampu 150 W)
• 0.01 M NaHCO ₃ buffer (pH 6.8)	• Ringstand
• Glass beaker 1 L	• Meteran
• Timer	

Prosedur:

A. Fotosintesis pada cakram daun coleus

1. Persiapan cakram daun dan infiltrasi sodium bikarbonat

Potong beberapa daun Coleus (variegated hijau putih) dan letakan di dalam sebuah glass beaker yang berisi air keran selama kurang lebih 1 jam.

2. Usahakan tidak mengekspos cakram daun tersebut pada cahaya kuat
3. Buat cakram daun dari daun yang sudah direndam air tadi sebanyak 15 cakram (kurang lebih berdiameter 1 cm).
4. Secara cepat masukan masing-masing 5 buah cakram daun tersebut pada 5 buah botol yang berisi 25 ml 0.01 M NaHCO₃ buffer (pH 6.8).
5. Tutup botol-botol tersebut dengan penutup karet yang memiliki 2 lubang. Satu lubang dilengkapi dengan pipa kaca dan satu lubang dilengkapi dengan pipa karet yang terhubung dengan pompa aspirator.

6. Nyalakan keran air dan lakukan penyedotan dengan cara menutup ujung pipa gelas dengan jari. Kemudian buka kondisi vakum dengan cara melepas jari dari ujung pipa kaca. Lanjutkan infiltrasi sampai tidak ada lagi gelembung udara yang ada di sekitar cakram daun dan cakram daun akan bergerak ke dasar gelas berisi air tersebut.
7. Tuang cakram daun dan air yang merendahnya ke cawan petri dan atur sehingga antar ke 5 cakram daun tidak tumpang tindih dan bersentuhan.
8. Pengukuran laju fotosintesis dilkakukan dengan meletakkan petridisk yang ada cakram daunnya dibawah lampu (kondisi lampu off).
9. Lampu diatur sedemikian rupa sehingga jaraknya tidak terlalu jauh dari cawan petri.
10. Nyalakan lampu dan catat waktu (detik) yang diperlukan oleh cakram daun untuk mengapung kepermukaan larutan atau bergerak ke samping cawan petri. Catat hanya daun yang bergerak.
11. Waktu yang diperlukan oleh cakram daun untuk mengapung atau bergerak ke sisi samping cawan petri adalah berbanding terbalik dengan secara proporsional dengan laju fotosintesis. Sehingga laju fotosintesis dapat disetarakan dengan waktu resiprokal (detik).
12. Lakukan prosedur serupa dengan menggunakan beberapa jenis cakram daun yang berasal dari tanaman lain

MODUL 4

EFEK ASAM GIBBERELLIN TERHADAP PRODUKSI GULA REDUKSI

Tujuan:

Mempelajari efek asam geberelin terhadap aktivitas amylase

Material dan Prosedur

Biji gandum (sekitar 60 biji) yagn sudah direndam dalam air semalam	Reagen Nelon's arsenomolybdate
100 ml larutan hipoklorit (1%)	12 mg Streptomycin sulfat
Stok Asam Gibberellin (10 mg/100 ml H ₂ O)	1gr Rexyn 101 resin
5 larutan uji asam gibberellin	Spektrofotometer
Reagen Somogyi	Kuvet
Pipet dan air masak	Tabung reaksi 13 buah

Prosedur:

- A. Preparasi biji gandum. Rendam sekitar 60 biji gandum dalam 50% (v/v) asal sulfat selama 1 jam. Angkat biji dan tiriskan biji tersebut kemudian cuci dengan menggunakan air keran mengalir semalam
- B. Larutan asam gibberellin. Buat stok asam gibberellin (10 mg/100 ml H₂O), kemudian siapkan beberapa larutan uji dengan cara melakukan pengenceran bertingkat.
 - 10⁻⁶ gram GA/ml H₂O
 - 10⁻⁷ gram GA/ml H₂O
 - 10⁻⁸ gram GA/ml H₂O
 - 10⁻⁹ gram GA/ml H₂O
 - 10⁻¹⁰ gram GA/ml H₂O

Pipet 10 ml dari tiap larutan uji ke dalam tabung terpisah dan larutkan 2.0 mg streptomycin sulfat pada masing masing tabung. Kemudian pipet 1 ml dari masing-masing larutan dan letakkan pada tabung reaksi. Beri nomer pad amasing masing tabung (5 tabung). Tambahkan 1 tabung lagi berisi 10 ml air yang juga mengandung steptomysicin sulfat

- C. Perlakuan asam gibeerellin pada biji

Pilih 50 biji gandum yang sudah disiapkan pada tahap sebelumnya, cuci dengan larutan 1% hypochlorite. Cuci beberapa kali dengan air destilasi untuk membuang sisa hypochlorite. Pisah biji tersebut menjadi 6 kelompok. Potong biji secara transversal menjadi 2 keping.

Pilih 4 keping biji yang memiliki ukuran serupa dari tiap kelompok biji dan letakkan masing-masing 4 biji keeping tersebut ke dalam tabung (1 tabung berisi 4 keping biji), beri label. Tiap-tiap tabung tersebut isi dengan 1 ml larutan GA test yang sudah dipersiapkan sebelumnya.

Tutup tabung tersebut dan diamkan semalam pada suhu ruangan.

Tambahkan 4 ml air destilasi pada masing-masing tabung test dan simpan pada suhu -4°C atau lebih rendah. Tabung test ini akan digunakan pada pertemuan berikutnya.

Simpan tabung pada suhu ruangan dan pada masing-masing tabung test tambahkan sekitar 150 mg Rexyn 101 resin. Tutup tabung dan kocok tabung secara merata. Biarkan resin bergerak ke dasar tabung dan uji 2 ml aliquot dari tiap-tiap larutan untuk mengetahui gula tereduksi.

D. Deteksi gula tereduksi

Pada masing-masing 6 tabung reaksi yang berisi 2 ml reagen Simony, tambahkan 2 ml aliquot larutan yang mengelilingi keeping biji. Siapkan tabung mengandung 2 ml reagen gula reduksi dan 2 ml air destilasi (blanko).

Tutup tabung dengan kelereng dan panaskan pada air mendidih selama 10 menit. Dinginkan tabung pada air dingin selama 5 menit, kemudian 2 ml reagen Nelson arsenomolybdate. Sesudah mencampur larutan tersebut, transfer isi dari masing-masing tabung ke dalam kuvet dan ukur absorbansi menggunakan spectrophotometer. Atur panjang gelombang 540 nm. Catat absorbansinya dari semua tabung uji termasuk blanko.

MODUL 5

ESTIMASI FENOL

Tujuan:

Estimasi kandungan fenol pada tanaman

Prinsip:

Fenol merupakan senyawa aromatic dengan gugus hidrosil yang banyak ditemukan pada tanaman. Fenol dapat ditemukan pada hampir semua bagian tanaman. Fenol sering dihubungkan dengan fungsi sistem pertahanan tanaman dalam menghadapi penyakit dan hama. Beberapa jenis senyawa termasuk dalam kelompok fenol seperti tannin., flavonol, caffeine dan lain sebagainya. Total estimasi kandungan fenol dapat diukur menggunakan reagen folin-ciocalteau.

Fenol akan bereaksi dengan phosphomolibdic acid yang terkandung dalam reagen folin-ciocalteau dan akan menghasilkan warna biru kompleks (biru molybdenum).

Material dan prosedur:

- 80% etanol
- Folin-Ciocalteau reagen
- Na₂CO₃ (20%)
- Standar (100 mg catenol dalam 100 ml air). Larutkan 10 X untuk larutan kerja.

Prosedur:

- Timbang 0.5 gr – 1.0 gr sample tanaman dan gerus halus dengan menggunakan pestle pada 10x larutan 80% ethanol
- Sentrifugasi homogenate pada kecepatan 10000 rpm selama 20 menit. Ambil supernatant dan simpan. Re ekstrak kembali residu 5X lagi dengan ethanol 80%. Lakukan prosedur serupa dan kumpulkan supernatant yang diperoleh.
- Evaporasi supernatant sampai kering
- Larutkan residu yang didapat pada air destilasi (5 ml)

- Pipet larutan tersebut pada volume yang berbeda (0.2 – 2 ml) dan letakkan pada tabung yang terpisah.
- Tambahkan air sampai menjadi volume 3 ml untuk masing-masing tabung
- Tambahkan 0.5 ml reagen Folin-Ciocalteu
- Sesudah 3 menit tambahkan 2 ml 20% Na_2CO_3 pada masing-masing tabung
- Campur secara rata dan letakkan tabung tersebut pada air mendidih selama 1 menit dan kemudian dinginkan.
- Ukur absorbansi menggunakan panjang gelombang 650 nm. Ukur pula blanko yang sudah dipersiapkan
- Siapkan kurva standar dengan menghitung larutan catechol yang berbeda konsentrasinya.

MODUL 6

PENGUKURAN PIGMEN FOTOSINTESIS

Tujuan:

Estimasi pigmen fotosintesis pada jaringan tanaman

Prinsip:

Pigmen fotosintesis yakni klorofil dan karotenoid merupakan pigmen yang banyak ditemukan pada tanaman. Fotosintesis yang merupakan proses utama yang di dalamnya terdapat proses pemanenan energy dari sinar matahari yang nantinya akan digunakan untuk mengerjakan mesin anabolisme pembentukan karbohidrat. Tanaman dan cyanobacteria mampu menangkap energy sinar matahari dan digunakan untuk memensitisis senyawa kompleks dari senyawa anorganik. Pigmen-pigmen fotosintesis merupakan senyawa yang mampu menyerap energy sinar matahari pada bagian awal proses fotosintesis.

Klorofil dan karotenoid dapat diekstrak dari daun atau batang tanaman dan konsentrasinya dapat diukur menggunakan spektrofotometer. Dengan menggunakan persamaan simultan, konsentrasi pigmen fotosintesis dapat ditentukan, misalnya klorofil a, klorofil b, total klorofil dan karotenoid pada sample yang sama

Terdapat 2 metode yang umum digunakan yakni metode acetone dan DMSO.

A. Metode Acetone

Material yang diperlukan:

Tanaman (daun atau batang), air destilasi, acetone 80%, mortar dan pestle, Funnel, Kertas whatman grade 1, tabung volumetric, pipet ukur dan spectronik

Prosedur:

- Siapkan acetone 80% dan timbang sample tanaman 250 mg (Fresh). Gerus material tanaman dengan menggunakan mortar dan pestle dengan menambahkan 5 ml 80% acetone.
- Filter homogenate dalam 25 ml tabung volumetric (25 ml) dengan menggunakan kertas Whatman grade 1. Cuci homogenate 3-4 kali dengan 5 ml 80% acetone . Larutkan konsentrat dalam vial volume 25 ml.

- Ukur absorbansi menggunakan spectrophotometer pada panjang gelombang 663 dan 645 nm). Gunakan 80% acetone sebagai blanko.
- Jumlah klorofil a dan b dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan Arnon (1949) sebagai berikut:

$$\text{Klorofil a (mg/g fw)} = \frac{[(12.7 \times A_{663}) - (2.69 \times A_{645})] \times \text{Volume}}{1000 \times W}$$

$$\text{Klorofil b (mg/g fw)} = \frac{[(22.9 \times A_{663}) - (4.68 \times A_{645})] \times \text{Volume}}{1000 \times W}$$

$$\text{Total Klorofil a + b (mg/g fw)} = \frac{[(8.02 \times A_{663}) - (20.2 \times A_{645})] \times \text{Volume}}{1000 \times W}$$

Sedangkan untuk karotenoid, penghitungan berdasarkan rumus Price and Hendry (1991) dan Venkat et al (1984) sebagai berikut:

$$\text{Total Karotenoid (mg/g fw)} = \frac{[A_{480} + (0.114 \times A_{663}) - (0.638 \times A_{645})] \times \text{Volume}}{1000 \times W}$$

B. Metode DMSO

Material yang diperlukan: DMSO, tabung reaksi, aluminium foil, oven dan lain sebagainya

Prosedur:

- Timbang 100 mg sample segar tanaman dan chpping secara halus daun sample.
- Letakkan material tersebut pada tabung reaksi dan tambahkan 220 ml DMSO
- Tutup tabung dengan aluminium foil untuk menghindari fotooksidasi pigmen.
- Letakkan tabung pada oven bersuhu 65oC selama 5 jam.
- Catat absorbansi klorofil menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 663 nm dan 645 nm.
- Hitung klorofil A, b dan total menggunakan rumus seperti diatas
- Gunakan DMSO sebagai blanko pada prosedur ini.

MODUL 7

ESTIMASI KANDUNGAN PROLIN

Tujuan:

Pengukuran prolin pada jaringan tanaman

Prinsip:

Prolin merupakan sama amino yang banyak ditemukan pada tanaman. Prolin disintesis dengan precursor asam glutamate melalui jalur yang dikatalisasi oleh pyrroline-5-carboxylate synthase, menghasilkan glutamate semialdehyde, yang secara otomatis akan dimetabolisme menjadi pyrroline-5-carboxylate. Semyawa ini kemudian akan direduksi menjadi prolin oleh enzim pyrroline-5-carboxylate reductase.

Kandunga prolin bebas pada daun dapat ditentukan dengan mengikuti metode Bates et al (1973). Estimasi prolin didasarkan pad apemebentukan warna merah bata proline-ninhydrin kompleks pada media asam. Komplek ini larut dalam toluene sehingga dapat diseparasi pada fase cair.

Material dan Prosedur:

Tabung reaksi, rak tabung reaksi, mikropipet, kertas whatman nomer 1, spektrofotometer, dan senyawa-senyawa kimia lainnya.

Reagen:

- Siapkan reagen sebagai berikut:
- Asam sulfosalic (3%): 3 gram asam sulfosalic dilarutkan dalam 100 ml air destilasi
- Asam orthoposporik : tambahkan air destilasi 38.1 ml asam orthoposporik sampai mencapai volume 100 ml
- Asam ninhydrin: 1.25 gr Ninhydrin dilarutkan pada 30 ml asam asetat glasial dan 20 ml asam orthoposporik, dikocok semalam pada suhu 40C.
- Toluene
- Proline 50 mg dalam 50 ml air ddestilasi

Prosedur:

- Ekstrak 0.5 gr sample tanaman dengan menghomogenasi dalam 10 ml 3% asam sulposalisic
- Filter homogenate dengan menggunakan kertas whatman no. 1
- Amabil 2 ml filtrate dan masukan ke dalam tabung reaksi. Tambahkan 2 ml asam asetat glasial dan 2 ml ada ninhydrin
- Panaskan pada air mendidi selama 1 jam
- Hentikan reaksi dengan meletakan tabung reaksi pada es
- Tambahkan 4 ml toluene dan campur dengan selama 20 detik
- Pisahkan lapisan toluene dan hangatkan pada suhu temperature
- Ukur intensitas warna merah pada 520 nm
- Kerjakan prosedur serupa namun untuk larutan prolin unutm membuat kurva standar
- Tentukan jumlah prolin dengan mengacu pada kurva standar