

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Desember 2009 sampai bulan Juli 2010 di laboratorium Struktur Tumbuhan Jurusan Pendidikan Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia.

B. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian dasar dengan metode deskriptif. Penelitian dasar merupakan penelitian yang dikerjakan tanpa memikirkan ujung praktis atau titik terapan pada penelitian dan metode deskriptif karena hanya memberikan gambaran terhadap fenomena-fenomena tertentu dan tidak adanya perlakuan terhadap variabel (Nazir, 2003).

C. Alat dan Bahan

Alat dan Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, dapat dilihat pada Tabel 3.1, Tabel 3.2 dan Tabel 3.3 sebagai berikut:

Tabel 3.1 Spesies yang Digunakan

No	Genus	Spesies	Nama Daerah
1	Citrus	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	Jeruk Nipis
2		<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.f.	Jeruk Lemon
3		<i>Citrus hystrix</i> DC.	Jeruk Purut
4		<i>Citrus amblycarpa</i>	Jeruk Purut Sambel
5		x <i>Citrofortunella microcarpa</i> (Bunge) Wijnands	Jeruk Limau
6		<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Jeruk Manis
7		<i>Citrus reticulata</i> Blanco cv. 'Keпок Garut'	Jeruk Garut
8		<i>Citrus reticulata</i> Blanco cv. 'Keпок Siem'	Jeruk Siem
9		<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Meer.cv. 'Jeruk Bali'	Jeruk Bali
10		<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Meer.cv. 'Jeruk Bali Madiun'	Jeruk Bali Madiun

Tabel 3.2 Bahan yang Digunakan

No	Nama bahan	Kegunaan
1.	Formalin 4%	Membuat larutan FAA
2.	Asam asetat glasial	Membuat larutan FAA
3.	Alkohol	Untuk dehidrasi, infiltasi (30%, 50%, 70%, 95%, 100%)
4.	Xilol murni	Pelarut parafin
5.	Fast green	Untuk pewarnaan
6.	Safranin	Untuk pewarnaan
7.	Aquades	Pelarut
8.	Parafin (lunak dan keras)	Untuk infiltrasi dan embedding
9.	Haupt	Perekat
10.	Air suling	Pembilas pada pewarnaan
11.	Entelan	Untuk penutupan kaca objek

Tabel 3.3 Alat yang Digunakan

No	Nama alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Pisau tipis	Gillette Goal	1 Pak @ 6 buah
2.	Pinset	Besi ujung lengkung	1 buah
3.	Botol vial	10 ml	30 buah
4.	Pipet	Bahan kaca	5 buah
5.	Gelas ukur	Bahan kaca Pyrex ukuran 10ml, 50 ml, 500 ml	@ 1 buah
6	Gelas kimia	Bahan kaca Pyrex ukuran 50 ml, 250 ml dan 500 ml	@ 2 buah
7.	Botol untuk larutan	Bahan kaca gelap 300 ml, 500 ml	@ 5 buah
8.	Vacuum diafragh pump	Ulvac sinko kiko DA-20D	1 buah
9.	Desicator	Duran	1 buah
10.	Oven	SIBATA SPF-450	1 buah
11.	Baki pita	Bahan karton Duplex	3 buah
12.	Kuas	No. 3	2 buah
13.	Mikrotom putar	Model Yamato KHKI PR-50	1 buah
14.	Hot plate	ERMA F-1	1 buah
15.	Staining jar	Bahan kaca	12 buah
16.	Mikroskop elektrik	Shimadzu 3904935	1 buah
17.	Kaca objek	Sail Brand 25.4 X 76.2 mm	3 pak @ 72 buah
18.	Kaca Penutup	Menzel-Glaser 24 X 24 mm	6 pak @ 50 Buah
19.	Box Preparat	Bahan Kayu isi 100	2 buah
20.	Skala pengukur mikroskop	Skala okuler, skala objekif	@ 1 buah
21.	Kamera digital	Fuji Film model Finepix 9 mega pixel	1 buah

D. Cara Kerja

1. Pra-penelitian pada Daun Jeruk

Daun jeruk yang akan dijadikan sampel dalam penelitian secara anatomi, sebelumnya dilakukan pengamatan ciri-ciri tanaman secara umum (Lampiran I) dan pengamatan khusus morfologi daun. Pengamatan secara morfologi pada daun jeruk meliputi perhitungan indeks daun, bentuk daun, tipe tepi daun, ujung daun, ada tidaknya petiolus dan bentuk sayap pada petiolus.

2. Pengambilan Daun Jeruk di Lapangan

Daun-daun jeruk yang digunakan diambil dari daerah Desa Cihideung, Kec. Parompong, Kab. Bandung Barat. Sampel yang diambil adalah daun pada nodus ke-empat karena pada bagian seperti inilah pertumbuhan daun sudah dianggap maksimal. Sampel daun diambil dan disimpan dalam air atau dalam tempat lembab agar tidak layu pada saat dilakukan pengamatan di laboratorium. Sampel yang telah diambil sebagian dikirim ke Pusat Penelitian Biologi LIPI Herbarium Bogoriense untuk diidentifikasi penamaannya (Lampiran II) dan sebagian lagi digunakan untuk penelitian di laboratorium.

3. Pembuatan Preparat Anatomi dengan Metode Parafin

Preparat anatomi daun jeruk dibuat dengan metode parafin (Sass, 1958). Sampel daun yang akan diamati dipotong dengan ukuran 1-2 cm, sampel kemudian difiksasi dalam larutan FAA 50% dan disimpan selama 1 x 24 jam. Larutan FAA ini terdiri dari 90 ml alkohol 50%, 50 ml asam asetat glasial, dan 5 ml formalin 4%. Sampel kemudian diaspirasi dengan menggunakan aspirator untuk menghilangkan udara dalam sampel, hal ini dilakukan agar memudahkan

proses dehidrasi dan infiltrasi. Aspirasi dilakukan sampai bahan tenggelam atau tidak terlihat lagi gelembung udara yang keluar dari jaringan dengan tekanan vakum maksimal.

Sampel selanjutnya didehidrasi dengan seri larutan alkohol-TBA (tertier butil alkohol) atau disebut juga larutan Johansen (Hidayat & Utomo, 1980) (Lampiran III). Dehidrasi dilakukan untuk menarik air yang ada pada jaringan agar parafin dapat masuk kedalam jaringan pada saat infiltrasi.

Sampel selanjutnya diinfiltrasi dalam TBA-minyak parafin 1:1 selama 1,5 jam, kemudian proses infiltrasi dilanjutkan dengan menggunakan parafin lunak (48°C) selama 3x2 jam dan parafin keras (58°C) selama 2x2 jam di dalam oven. Setelah infiltrasi kemudian sampel ditanam dalam blok parafin keras. Sampel selanjutnya disayat dengan mikrotom putar dengan ketebalan $10\mu\text{m}$.

Sayatan yang berupa pita-pita parafin kemudian ditempelkan pada kaca objek yang telah dilapisi perekat Haupt (Lampiran III) dan diberi setetes air. Sayatan yang berupa pita-pita parafin dibiarkan merenggang dan mengering diatas papan pemanas dengan suhu 42°C . Sayatan diwarnai dengan fast green (Lampiran III) dan pewarna lawan Safranin (Lampiran III) berdasarkan metode yang dikemukakan oleh Sass (1958) (Lampiran IV). Bahan yang diwarnai dibubuhi entelan dan ditutup dengan kaca penutup. Langkah pembuatan preparat Anatomi dengan metode parafin ini dapat dilihat pada Lampiran V.

4. Pembuatan Preparat Anatomi Sayatan Segar

Untuk mengamati tipe stomata, dibuat preparat anatomi sayatan segar dengan cara menyayat permukaan daun secara paradermal menggunakan pisau

tipis yang tajam. Sayatan ini kemudian diletakkan pada kaca objek yang telah diberi tetesan air dan ditutup dengan kaca penutup.

Jumlah ruang sekretori dan diameter ruang sekretori diamati dengan menempelkan sampel daun segar pada kaca objek. Sampel daun yang telah diambil di lapangan, dibagi menjadi tiga bagian yaitu bagian atas, tengah, dan bawah. Bagian-bagian sampel daun ini kemudian diletakkan pada kaca objek. Penyimpanan sampel pada kaca objek disesuaikan dengan ukuran kaca objek.

5. Pengamatan Anatomi

a. Pengamatan anatomi daun

Pengamatan lapisan epidermis, tipe birai, bentuk palisade, bentuk kristal, letak, dan jumlah lapisan epitel pada ruang sekretori dilakukan pada setiap preparat sayatan melintang daun yang telah dibuat menggunakan metode parafin dan diwarnai dengan pewarna fast green dan safranin. Seluruh hasil pengamatan kemudian didokumentasikan menggunakan kamera digital Fuji Film model Finepix 9 mega pixel.

b. Pengamatan tipe stomata

Pengamatan tipe stomata dilakukan dengan menggunakan preparat anatomi sayatan segar. Masing-masing diamati sebanyak 10 kali lapang pandang menggunakan mikroskop elektrik.

c. Menentukan jumlah ruang sekretori

Penentuan jumlah ruang sekretori dilakukan pada sampel daun segar yang telah ditempelkan pada kaca objek. Masing-masing sampel daun dilakukan

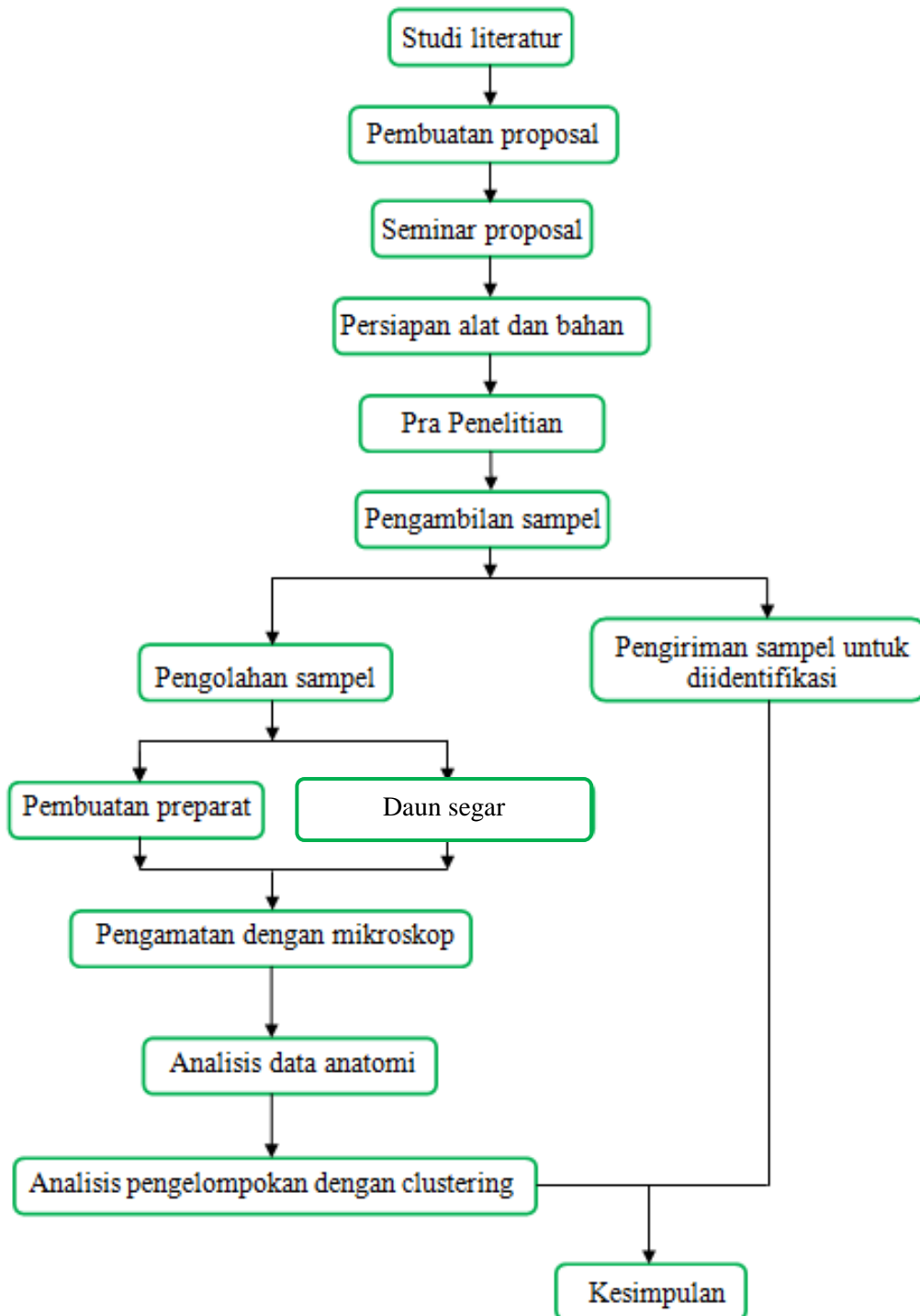
penghitungan ruang sekretori sebanyak 10 kali lapang pandang dibawah mikroskop elektrik Shimadzu dengan pembesaran lensa objektif 4x10.

d. Pengukuran diameter ruang sekretori

Pengukuran diameter ruang sekretori dilakukan baik pada preparat sayatan melintang daun yang telah dibuat menggunakan metode parafin dan diwarnai dengan pewarna fast green dan safranin maupun pada sampel daun segar yang ditempelkan pada kaca objek (Lampiran VI). Sebelum dilakukan pengukuran dengan menggunakan skala okuler dilakukan kalibrasi terlebih dahulu. Ruang sekretori yang telah diukur menggunakan skala okuler hasilnya dikalikan dengan hasil kalibrasi pada pembesaran yang digunakan.

6. Analisis Clustering

Dari Sembilan spesies pada genus *Citrus* dan satu spesies dari genus *Citrofortunella* dibedakan berdasarkan karakter anatomi daunnya. Enam karakter yang diamati adalah jumlah lapisan epidermis, indeks palisade dengan tebal daun, letak ruang sekretori, jumlah lapisan epitel, jumlah ruang sekretori dan diameter ruang sekretori. Setelah empat karakter diamati kemudian dilakukan skoring dan dibuat konstruksi pohon clustering menggunakan program komputer *Multi Variate Statistical Package* (MVSP) versi 3.13 q.



Gambar 3.1. Alur Penelitian