

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian yang dilakukan termasuk jenis penelitian eksperimen. Pada penelitian ini dicari konsentrasi dan kombinasi ZPT yang optimum untuk menginduksi embrio somatik *Pinus merkusii* Jung. & Devr. Berdasarkan Tabel 3.1, kombinasi ZPT yang digunakan yaitu 2,4-D, BAP, 2,4-D dan BAP, serta 2,4-D dan kinetin. Konsentrasi 2,4-D yang digunakan yaitu 9 μM . Konsentrasi BAP yang digunakan yaitu 3 μM . Sedangkan konsentrasi kinetin yang digunakan yaitu 2 μM . Eksplan yang digunakan adalah megagametofit *Pinus merkusii* yang tidak terlalu bening dan tidak terlalu putih. Megagametofit tersebut diperoleh dari strobilus betina yang muda dengan ukuran 5 – 7 cm (Gambar 3.1). Percobaannya diulangi 6 kali. Desain penelitian yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL).

Menurut Zulkarnain (2009), jumlah pengulangan didasarkan pada perhitungan rumus berikut.

$$(t-1) (n-1) \geq 15$$

$$(4-1) (n-1) \geq 15$$

$$(3) (n-1) \geq 15$$

$$n-1 \geq 15/3$$

$$n \geq 5+1$$

$$n \geq 6$$

Keterangan :

t = Jumlah Perlakuan

n = Jumlah Pengulangan

Berikut ini merupakan tabel dari kombinasi dan konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) yang digunakan.

Tabel 3.1

Kombinasi dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan

ZPT			Kode Kultur
2,4-D	BAP	Kinetin	
9 μ M	-	-	D9
-	3 μ M	-	B3
9 μ M	3 μ M	-	D9B3
9 μ M	-	2 μ M	D9K2

Keterangan : D9 = 2,4-D 9 μ M

B3 = BAP 3 μ M

D9B3 = 2,4-D 9 μ M dan BAP 3 μ M

D9K2 = 2,4-D 9 μ M dan kinetin 2 μ M



Gambar 3.1 Strobilus betina muda *Pinus merkusii* yang digunakan



Gambar 3.2 Biji *Pinus merkusii* yang digunakan

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi dari penelitian ini adalah megagametofit *Pinus merkusii* yang terdapat di sekitar UPI dan Pondok Hijau Indah, Bandung. Sampel dari penelitian ini adalah megagametofit yang diambil dari pohon pinus unggul yang terdapat di sekitar UPI dan Pondok Hijau Indah, Bandung. Pohon pinus unggul ditentukan berdasarkan karakter morfologi batang yaitu berbatang lurus dan diameter batang ≥ 25 cm.

3.3 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Botani, FPMIPA UPI Bandung pada bulan Januari sampai Mei 2019.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Pelaksanaan

3.4.1.1 Persiapan Alat dan Bahan

Pada tahap ini dilakukan persiapan alat dan bahan yang akan digunakan (Lampiran 1). Terlebih dahulu alat-alat yang akan digunakan untuk sterilisasi eksplan dan penanaman seperti scalpel, pinset, gelas piala, cawan petri, botol kultur, kertas saring, aluminium foil, dan botol berisi aquades disterilisasi basah dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm (Gambar 3.3). Disiapkan juga alat-alat yang tidak disterilisasi diantaranya yaitu gelas piala, gelas ukur, batang pengaduk, spatula, timbangan analitik, magnetic stirrer, bunsen, pipet biasa, mikropipet, tips, pH meter, aluminium foil, plastik, karet gelang, dan tisu. Bahan yang akan digunakan (Lampiran 1) juga disiapkan seperti bahan-bahan kimia, agar-agar, gula, dan eksplan.



Gambar 3.3 Sterilisasi alat-alat yang digunakan

3.4.1.2 Persiapan Eksplan

Pada tahap ini dilakukan pengambilan sampel berupa strobilus muda *Pinus merkusii* pada beberapa pohon pinus di sekitar UPI dan Pondok Hijau Indah, Bandung.

3.4.1.3 Pembuatan Medium Induksi

3.4.1.3.1 Pembuatan Stok Medium

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium *Douglas Cotyledon Reserve (DCR)*. Komposisi medium DCR dapat dilihat pada Lampiran 2. Untuk membuat medium tersebut, harus dibuat dulu larutan stok (Gambar 3.4) yang dikelompokkan. Cara pembuatannya yaitu sebagai berikut :

3.4.1.3.1.1 Stok Makronutrien A

Larutan stok makronutrien A dibuat dari 4 gram NH_4NO_3 yang dilarutkan dengan 50 ml aquades. Cara pembuatannya yaitu 4 gram NH_4NO_3 dimasukkan ke dalam gelas piala yang berisi 40 ml aquades. Larutan tersebut diaduk sampai larut menggunakan *magnetic stirrer*. Jika sudah larut, larutan tersebut dituangkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan aquades sampai volumenya 50 ml. Setelah itu, larutan tersebut dituangkan lagi ke dalam gelas piala dan dilarutkan lagi menggunakan *magnetic stirrer*. Jika larutan tersebut sudah benar-benar larut, maka larutan tersebut dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml dan ditutup rapat. Botol tersebut diberi label A. Larutan stok tersebut berisi 50 ml

untuk 10 kali konsentrasi. Untuk penggunaan larutan stok tersebut yaitu apabila akan membuat 1 L medium maka ditambahkan 5 ml larutan stok tersebut.

3.4.1.3.1.2 Stok Makronutrien B

Larutan stok makronutrien B dibuat dari 3,4 gram KNO_3 yang dilarutkan dengan 50 ml aquades. Cara pembuatannya yaitu 3,4 gram KNO_3 dimasukkan ke dalam gelas piala yang berisi 40 ml aquades. Larutan tersebut diaduk sampai larut menggunakan *magnetic stirrer*. Jika sudah larut, larutan tersebut dituangkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan aquades sampai volumenya 50 ml. Setelah itu, larutan tersebut dituangkan lagi ke dalam gelas piala dan dilarutkan lagi menggunakan *magnetic stirrer*. Jika larutan tersebut sudah benar-benar larut, maka larutan tersebut dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml dan ditutup rapat. Botol tersebut diberi label B. Larutan stok tersebut berisi 50 ml untuk 10 kali konsentrasi. Apabila akan membuat 1 L medium maka ditambahkan 5 ml larutan stok tersebut.

3.4.1.3.1.3 Stok Makronutrien C

Larutan stok makronutrien C dibuat dari 0,8 gram $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ yang dilarutkan dengan 50 ml aquades. Cara pembuatannya yaitu 0,8 gram $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dimasukkan ke dalam gelas piala yang berisi 40 ml aquades. Larutan tersebut diaduk sampai larut menggunakan *magnetic stirrer*. Jika sudah larut, larutan tersebut dituangkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan aquades sampai volumenya 50 ml. Setelah itu, larutan tersebut dituangkan lagi ke dalam gelas piala dan dilarutkan lagi menggunakan *magnetic stirrer*. Jika larutan tersebut sudah benar-benar larut, maka larutan tersebut dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml dan ditutup rapat. Botol tersebut diberi label C. Larutan stok tersebut berisi 50 ml untuk 10 kali konsentrasi. Apabila akan membuat 1 L medium maka ditambahkan 5 ml larutan stok tersebut.

3.4.1.3.1.4 Stok Makronutrien D

Larutan stok makronutrien D dibuat dari 3,7 gram MgSO_4 dan 1,7 gram KH_2PO_4 yang dilarutkan dengan 50 ml aquades. Cara pembuatannya yaitu 3,7 gram MgSO_4 dan 1,7 gram KH_2PO_4 dimasukkan ke dalam gelas piala yang berisi 40 ml aquades. Larutan tersebut diaduk sampai larut menggunakan *magnetic stirrer*. Jika sudah larut, larutan tersebut dituangkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan aquades sampai volumenya 50 ml. Setelah itu, larutan tersebut dituangkan lagi ke dalam gelas piala dan dilarutkan lagi menggunakan *magnetic stirrer*. Jika larutan tersebut sudah benar-benar larut, maka larutan tersebut dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml dan ditutup rapat. Botol tersebut diberi label D. Larutan stok tersebut berisi 50 ml untuk 10 kali konsentrasi. Apabila akan membuat 1 L medium maka ditambahkan 5 ml larutan stok tersebut.

3.4.1.3.1.5 Stok Makronutrien E

Larutan stok makronutrien E dibuat dari 5,56 gram $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ yang dilarutkan dengan 50 ml aquades. Cara pembuatannya yaitu 5,56 gram $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dimasukkan ke dalam gelas piala yang berisi 40 ml aquades. Larutan tersebut diaduk sampai larut menggunakan *magnetic stirrer*. Jika sudah larut, larutan tersebut dituangkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan aquades sampai volumenya 50 ml. Setelah itu, larutan tersebut dituangkan lagi ke dalam gelas piala dan dilarutkan lagi menggunakan *magnetic stirrer*. Jika larutan tersebut sudah benar-benar larut, maka larutan tersebut dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml dan ditutup rapat. Botol tersebut diberi label E. Larutan stok tersebut berisi 50 ml untuk 10 kali konsentrasi. Apabila akan membuat 1 L medium maka ditambahkan 5 ml larutan stok tersebut.

3.4.1.3.1.6 Stok Zat Besi

Larutan stok zat besi dibuat dari 0,278 gram $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan 0,378 gram Na_2 EDTA yang dilarutkan dengan 50 ml aquades. Cara pembuatannya yaitu 0,378 gram Na_2 EDTA dimasukkan ke dalam gelas piala yang berisi 35 ml aquades. Larutan tersebut diaduk sampai larut menggunakan *magnetic stirrer*.

Ditambahkan 0,278 gram $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ke larutan tersebut sambil dilarutkan lagi. Jika sudah larut, larutan tersebut dituangkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan aquades sampai volumenya 50 ml. Setelah itu, larutan tersebut dituangkan lagi ke dalam gelas piala dan dilarutkan lagi menggunakan magnetic stirrer. Jika larutan tersebut sudah benar-benar larut, maka larutan tersebut dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml dan ditutup rapat. Botol tersebut diberi label zat besi. Larutan stok tersebut berisi 50 ml untuk 10 kali konsentrasi. Apabila akan membuat 1 L medium maka ditambahkan 5 ml larutan stok tersebut.

3.4.1.3.1.7 Stok Mikronutrien F

Larutan stok mikronutrien F dibuat dari 6,2 gram H_3BO_3 , 8,6 gram $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,83 gram KI, 0,25 gram NaMoO_4 , 0,25 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, dan 0,025 gram $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ yang dilarutkan dengan 100 ml aquades. Cara pembuatannya yaitu masing-masing bahan dimasukkan ke dalam gelas piala yang berisi 70 ml aquades. Larutan tersebut diaduk sampai larut menggunakan *magnetic stirrer*. Jika sudah larut, larutan tersebut dituangkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan aquades sampai volumenya 100 ml. Setelah itu, larutan tersebut dituangkan lagi ke dalam gelas piala dan dilarutkan lagi menggunakan magnetic stirrer. Jika larutan tersebut sudah benar-benar larut, maka larutan tersebut dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml dan ditutup rapat. Botol tersebut diberi label mikronutrien F. Larutan stok tersebut berisi 100 ml untuk 1000 kali konsentrasi. Apabila akan membuat 1 L medium maka ditambahkan 0,1 ml larutan stok tersebut.

3.4.1.3.1.8 Stok Mikronutrien G

Larutan stok mikronutrien G dibuat dari 0,25 gram NiCl yang dilarutkan dengan 100 ml aquades. Cara pembuatannya yaitu 0,25 gram NiCl dimasukkan ke dalam gelas piala yang berisi 80 ml aquades. Larutan tersebut diaduk sampai larut menggunakan *magnetic stirrer*. Jika sudah larut, larutan tersebut dituangkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan aquades sampai volumenya 100 ml. Setelah itu, larutan tersebut dituangkan lagi ke dalam gelas piala dan dilarutkan lagi

menggunakan magnetic stirrer. Jika larutan tersebut sudah benar-benar larut, maka larutan tersebut dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml dan ditutup rapat. Botol tersebut diberi label mikronutrien G. Larutan stok tersebut berisi 100 ml untuk 1000 kali konsentrasi. Apabila akan membuat 1 L medium maka ditambahkan 0,1 ml larutan stok tersebut.

3.4.1.3.1.9 Stok Mikronutrien H

Larutan stok mikronutrien H dibuat dari 2,25 gram $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ yang dilarutkan dengan 100 ml aquades. Cara pembuatannya yaitu 2,25 gram $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dimasukkan ke dalam gelas piala yang berisi 80 ml aquades. Larutan tersebut diaduk sampai larut menggunakan *magnetic stirrer*. Jika sudah larut, larutan tersebut dituangkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan aquades sampai volumenya 100 ml. Setelah itu, larutan tersebut dituangkan lagi ke dalam gelas piala dan dilarutkan lagi menggunakan magnetic stirrer. Jika larutan tersebut sudah benar-benar larut, maka larutan tersebut dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml dan ditutup rapat. Botol tersebut diberi label mikronutrien H. Larutan stok tersebut berisi 100 ml untuk 100 kali konsentrasi. Apabila akan membuat 1 L medium maka ditambahkan 1 ml larutan stok tersebut.

3.4.1.3.1.10 Stok Myo-Inositol

Larutan stok myo-inositol dibuat dari 2 gram myo-inositol yang dilarutkan dengan 50 ml aquades. Cara pembuatannya yaitu 2 gram myo-inositol dimasukkan ke dalam gelas piala yang berisi 40 ml aquades. Larutan tersebut diaduk sampai larut menggunakan *magnetic stirrer*. Jika sudah larut, larutan tersebut dituangkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan aquades sampai volumenya 50 ml. Setelah itu, larutan tersebut dituangkan lagi ke dalam gelas piala dan dilarutkan lagi menggunakan magnetic stirrer. Jika larutan tersebut sudah benar-benar larut, maka larutan tersebut dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml dan ditutup rapat. Botol tersebut diberi label myo-inositol. Larutan stok tersebut berisi 50 ml untuk 10 kali konsentrasi. Apabila akan membuat 1 L medium maka ditambahkan 5 ml larutan stok tersebut.

3.4.1.3.1.11 Stok L-Glutamin

Larutan stok L-glutamin dibuat dari 3,65 gram L-glutamin yang dilarutkan dengan 50 ml aquades. Cara pembuatannya yaitu 2 gram myo-inositol dimasukkan ke dalam gelas piala yang berisi 15 ml aquades. Larutan tersebut diaduk sampai larut menggunakan *magnetic stirrer*. Jika sudah larut, larutan tersebut dituangkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan aquades sampai volumenya 25 ml. Setelah itu, larutan tersebut dituangkan lagi ke dalam gelas piala dan dilarutkan lagi menggunakan *magnetic stirrer*. Jika larutan tersebut sudah benar-benar larut, maka larutan tersebut dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml dan ditutup rapat. Botol tersebut diberi label L-glutamin. Larutan stok tersebut berisi 25 ml untuk 5 kali konsentrasi. Apabila akan membuat 1 L medium maka ditambahkan 5 ml larutan stok tersebut.

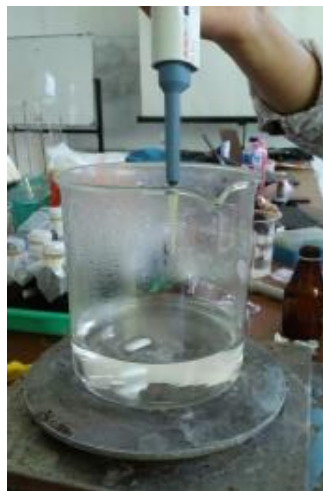
3.4.1.3.1.12 Stok Vitamin

Larutan stok vitamin dibuat dari 0,5 gram asam nikotin, 0,5 gram pyridoxin-HCl, 1 gram thiamin-HCl, dan 2 gram L-glysin yang dilarutkan dengan 100 ml aquades. Cara pembuatannya yaitu masing-masing bahan dimasukkan ke dalam gelas piala yang berisi 80 ml aquades. Larutan tersebut diaduk sampai larut menggunakan *magnetic stirrer*. Jika sudah larut, larutan tersebut dituangkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan aquades sampai volumenya 100 ml. Setelah itu, larutan tersebut dituangkan lagi ke dalam gelas piala dan dilarutkan lagi menggunakan *magnetic stirrer*. Jika larutan tersebut sudah benar-benar larut, maka larutan tersebut dipindahkan ke dalam botol gelap yang berukuran 250 ml dan ditutup rapat. Botol tersebut diberi label vitamin. Larutan stok tersebut berisi 100 ml untuk 1000 kali konsentrasi. Apabila akan membuat 1 L medium maka ditambahkan 0,1 ml larutan stok tersebut.



Gambar 3.4 Larutan stok

3.4.1.3.2 Pembuatan Medium



Gambar 3.5 Penambahan larutan stok

Pada penelitian ini, dibuat 1 L medium DCR untuk 4 kombinasi dan 6 kali ulangan. Terlebih dahulu, masing-masing larutan stok dimasukkan ke dalam gelas piala yang berisi 300 ml aquades (Gambar 3.5), lalu diaduk/dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Apabila sudah terlihat homogen, ditambahkan 20 gram gula dan ditambahkan aquades sampai volumenya 500 ml. Jika sudah larut, maka larutan tersebut dibagi ke dalam 4 gelas piala, masing-masing 125 ml. Pada setiap gelas piala ditambahkan ZPT sesuai dengan kombinasi yang diperlukan. Setelah itu ditambahkan aquades sampai volumenya 230 ml. Apabila larutan mediumnya sudah agak dingin bisa dicek pH menggunakan pH meter (Gambar 3.6). Nilai pH medium tersebut dibuat menjadi $5,8 \pm 0,1$. Jika larutan medium tersebut terlalu asam, maka ditambahkan larutan basa berupa NaOH 0,1 N. Sedangkan jika larutan medium tersebut terlalu basa, maka ditambahkan larutan asam berupa HCl 0,1 N. Setelah itu, masing-masing larutan medium tersebut ditambahkan agar-agar sebanyak 2 gram dan ditambahkan aquades sampai volumenya 250 ml. Larutan medium tersebut dilarutkan lagi menggunakan *magnetic stirrer*. Apabila sudah mendidih, larutan medium tersebut dituangkan ke dalam masing-masing botol kultur sebanyak 10 ml (Gambar 3.7). Botol ditutup menggunakan aluminium foil dan plastik, lalu diikat menggunakan karet gelang. Masing-masing botol diberi label. Setelah itu, medium disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit (Gambar 3.8).

Kemudian, medium disimpan di tempat yang bersih pada suhu kamar sampai nanti digunakan untuk penanaman.



Gambar 3.6 Pengecekan pH pada larutan medium



Gambar 3.7 Larutan medium dimasukkan ke dalam botol kultur



Gambar 3.8 Sterilisasi medium

3.4.2 Pelaksanaan Eksperimen

3.4.2.1 Pengambilan dan Pendinginan Eksplan

Eksplan yang digunakan berupa megagametofit *Pinus merkusii* yang terdapat pada strobilus betina yang muda berukuran 5-7 cm (Gambar 3.1). Strobilus yang telah dicuplik kemudian disikat dan dicuci menggunakan sikat gigi dan detergen (Gambar 3.9). Kemudian dibungkus menggunakan plastik dan disimpan dalam lemari pendingin pada suhu $2\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ selama minimal 12 jam (Gambar 3.10). Setelah dilakukan pendinginan, lalu biji dikeluarkan dari strobilus muda dan siap untuk disterilisasi (Gambar 3.11).



Gambar 3.9 Strobilus disikat dan dicuci



Gambar 3.10 Pendinginan strobilus



Gambar 3.11 Biji pinus yang siap disterilisasi

3.4.2.2 Sterilisasi dan Penanaman Eksplan

Biji *Pinus merkusii* (Gambar 3.2) yang telah dikeluarkan dari strobilus muda kemudian disterilisasi menggunakan NaHPO_4 (bayclin) 40% selama 15 menit (Gambar 3.12). Lalu dibilas menggunakan aquades steril 3x3 menit. Sterilisasi tersebut dilakukan di dalam *Laminar Air Flow (LAF)*. Setelah selesai sterilisasi eksplan, kemudian dilanjutkan ke tahap penanaman yang dilakukan di dalam *Laminar Air Flow (LAF)* juga. Biji diambil dan disimpan di atas cawan petri yang telah dilapisi kertas saring. Kemudian kulit bijinya dikupas menggunakan *steril blade* dan megagametofitnya dikeluarkan (Gambar 3.13). Megagametofit yang ditanam yaitu megagametofit yang tidak terlalu bening dan tidak terlalu putih. Kemudian megagametofit tersebut ditanam di dalam botol medium DCR sebanyak 5 biji/botol (Gambar 3.14). Botol medium yang sudah ditanami megagametofit kemudian disimpan dalam tempat yang gelap dan dikultivasi selama tiga bulan (Gambar 3.15). Pengamatannya dilakukan seminggu sekali.



Gambar 3.12 Sterilisasi biji pinus



Gambar 3.13 Pengupasan kulit biji pinus



Gambar 3.14 Penanaman eksplan pada medium kultur



Gambar 3.15 Eksplan dikultivasi

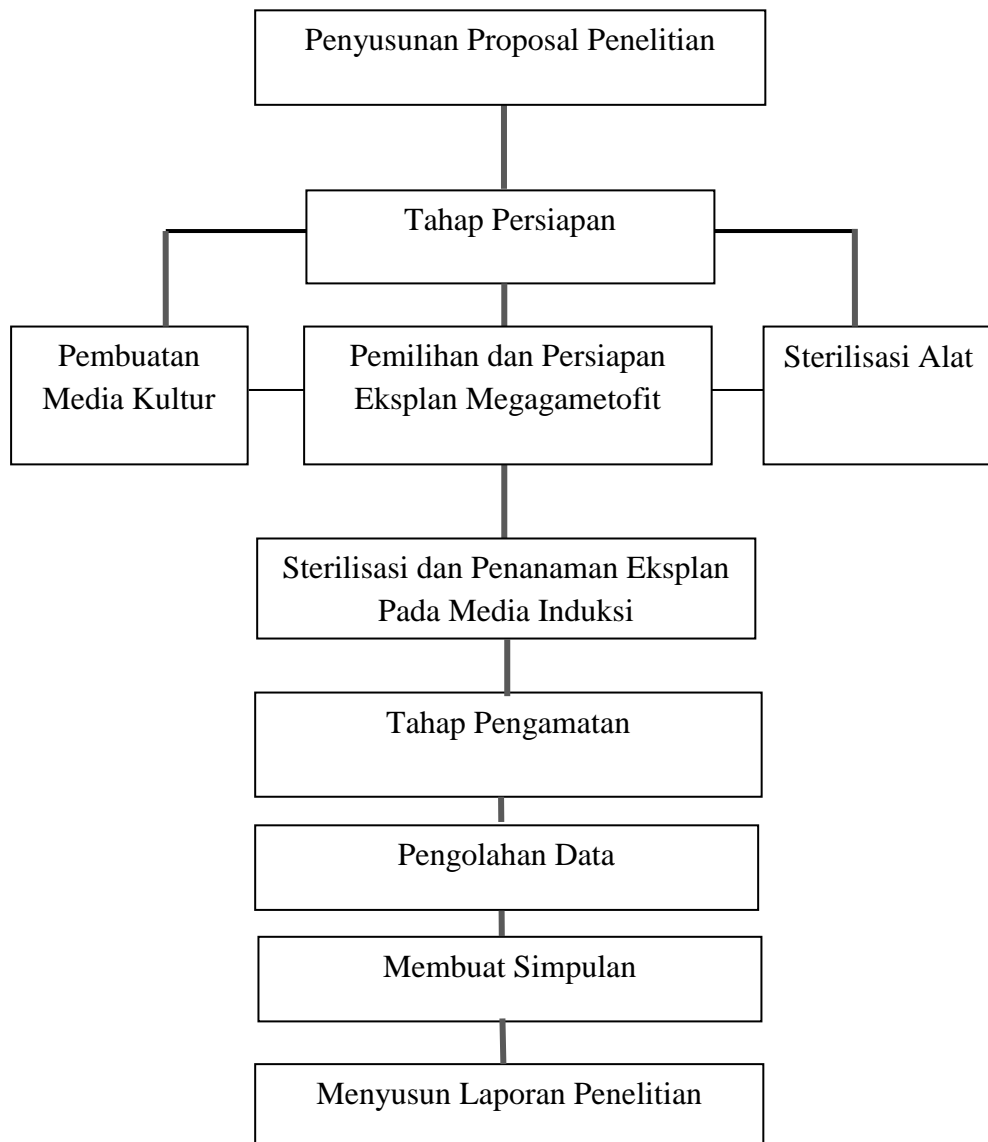
3.4.3 Teknik Pengumpulan Data dan Analisis Data

Embrio somatik yang berhasil diinduksi dari setiap kombinasi ZPT dihitung persentasenya dari tiap ulangan, kemudian dihitung rata-rata persentasenya untuk enam kali ulangan. Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Nurdini (2005), setiap embrio somatik yang terinduksi dari satu biji dihitung sebagai 20% dari total lima biji dalam satu botol. Perhitungannya sebagai berikut :

$$\text{Persentase induksi} = \frac{\text{Jumlah biji yang mengalami embriogenesis somatik}}{\text{Jumlah biji dalam satu botol}} \times 100\%$$

3.5 Alur Penelitian

Berikut ini adalah alur penelitian yang telah dilakukan.



Gambar 3. 16 Alur Penelitian