

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental meliputi respon eksplan megagametofit dari setiap perlakuan dan perhitungan persentase keberhasilan induksi dari perlakuan berbagai jenis medium kultur. Pada penelitian ini dicari medium yang paling optimum dalam menginduksi embriogenesis somatik *Pinus merkusii*. Dalam penelitian ini digunakan tiga jenis medium kultur, yaitu DCR (*Douglas Cotyledon Reserve*), SH (Schenk & Hildebrant), dan Litvay. Zat pengatur tumbuh yang digunakan adalah kombinasi *2,4-Dicholophenoxyacetic-acid* (2,4-D) dan *Benzine Amino Purine* (BAP) dengan konsentrasi masing-masing 9 μ M dan 3 μ M. Pemberian zat pengatur tumbuh didasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan Rahmadani (2007). Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap non-faktorial.

Variabel bebas dan variabel terikat pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Variabel bebas : Lima jenis medium kultur : Medium DCR, Medium SH, dan Medium Litvay. (dengan ditambahkan 9 μ M 2,4D dan 3 μ M BAP)
2. Variabel terikat : Jumlah megagametofit *Pinus merkusii* yang berhasil terinduksi.

Untuk perlakuan penggunaan medium kultur dilakukan dengan 36 perlakuan. Adapun jumlah pengulangan didasarkan pada perhitungan Rumus Federer :

$(t-1)(n-1)$	≥ 15	Keterangan : t = Jumlah Perlakuan n = Jumlah pengulangan
$(3-1)(n-1)$	≥ 15	
$(2)(n-1)$	≥ 15	
2n	$\geq 15+2$	
2n	≥ 17	
n	≥ 8.5	

Tabel 3.1. *Matriks Perlakuan (Medium dan Kombinasi ZPT)*

Medium	ZPT	
	2,4-D	BAP
DCR	9 μ M	9 μ M
SH		
Litvay		

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama lima bulan selama bulan Februari 2019 hingga Juni 2019. Pengambilan dan penyusunan data penelitian dilakukan di Laboratorium Botani FPMIPA UPI.

3.3 Alat dan Bahan

Selama penelitian dibutuhkan alat yang tersedia pada tabel 3.2 dan bahan yang tersedia pada tabel 3.3, tabel tersebut terlampir pada lampiran 1. Informasi komposisi medium yang digunakan dapat dilihat pada tabel 3.4, tabel ini terlampir pada lampiran 2.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Pelaksanaan

3.4.1.1 Persiapan Eksplan

Tahap persiapan diawali dengan studi lapangan, diantaranya observasi lokasi *Pinus merkusii*, menentukan pohon-pohon induk, pengambilan sampel berupa strobilus betina dari pohon-pohon induk. Penentuan pohon-pohon induk sebagai sumber sampel berdasarkan banyaknya strobilus muda. Sampel yang digunakan adalah organ megagametofit yang berwarna bening yang berasal dari *Pinus merkusii* karakteristik morfologi yang unggul, yakni dengan diameter batang yang lebih dari 15 cm dan tegakan batang lurus.

3.4.1.2 Pembuatan Stok Medium Kultur

Terdapat tiga medium yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu medium DCR, medium SH, dan medium Litvay. Dalam pembuatan medium, terlebih dahulu dibuat larutan stok yang kemudian disimpan dalam refrigerator. Pembuatannya dilakukan dengan pengelompokkan sebagai berikut:

3.4.1.2.1 Stok A = 50ml (10 kali konsentrasi)

Pembuatan larutan stok makronutrien A 50 ml untuk 10 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang NH_4NO_3 4 gram untuk medium DCR, 3 gram untuk medium SH, dan 16,5 gram untuk medium Litvay, kemudian dimasukkan kedalam gelas piala berisi akuades kurang lebih 40 ml, sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai larut. Larutan kemudian ditambah akuades hingga 50 ml dalam gelas ukur. Larutan ini dipindahkan kedalam gelas piala dan diaduk menggunakan *stirrer*. Setelah larut, larutan dipindahkan kedalam botol gelap ukuran 250ml, ditutup rapat. Botol diberi label A dan nama mediumnya masing-masing. Penggunaan untuk membuat 1 L medium adalah 5 ml.

3.4.1.2.2 Stok B = 50 ml (10 kali konsentrasi)

Untuk membuat larutan stok B 10 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang KNO_3 sebanyak 3,4 gram untuk medium DCR, 25 gram untuk medium SH, dan 19 gram untuk medium Litvay, kemudian dilarutkan dalam akuades kurang lebih 40 ml menggunakan gelas piala. Pelarutan dilakukan dengan mengaduknya menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Setelah homogen, ditambahkan akuades sampai volume yang diinginkan dalam gelas ukur dan dituangkan kembali kedalam gelas piala untuk dihomogenkan kembali. Setelah larut, larutan dipindahkan kedalam botol gelap ukuran 250 ml. Botol diberi label stok B dan nama masing-masing medium. Penggunaan larutan stok B adalah 5 ml untuk 1L medium.

3.4.1.2.3 Larutan stok C = 50 ml (10 kali konsentrasi)

Pembuatan larutan stok makroutrien C 10 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang CaCl_2 sebanyak 0,8 gram untuk medium DCR, 2 gram untuk medium SH, dan 0,22 gram untuk medium Litvay, kemudian zat ini dilarutkan dalam akuades hingga 50ml menggunakan gelas piala dan disimpan dalam botol gelap berukuran 250 ml. Botol ditutup rapat dan diberi label. Penggunaan larutan stok C adalah 5 ml untuk 1L medium.

3.4.1.2.4 Larutan stok D = 50 ml (10 kali konsentrasi)

Pembuatan larutan stok makronutrien D untuk 10 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang 3,7 gram MgSO_4 dan 1,7 gram KH_2PO_4 untuk medium DCR, 1,95 gram MgSO_4 untuk medium SH, dan 9,0337 gram MgSO_4 dan 3,4 gram KH_2PO_4 untuk medium Litvay. Kedua makronutrien tersebut dilarutkan dalam 40 ml akuades hingga homogen dan ditambahkan akuades hingga 50 ml dalam gelas ukur. Larutan dihomogenkan kembali dan disimpan dalam botol gelap. Botol ditutup rapat dan diberi label. Penggunaan untuk 1L adalah 5 ml.

3.4.1.2.5 Larutan stok E = 50 ml (10 kali konsentrasi)

Larutan stok E 50 ml untuk 10 kali konsentrasi dibuat dengan melarutkan 5,56 gram $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dalam 40 ml akuades. Larutan dihomogenkan dan ditambahkan akuades hingga 5ml dalam gelas ukur. Setelah homogen, larutan dimasukkan kedalam botol gelap dan ditutup rapat. Botol diberi label. Penggunaan stok E untuk 1 L medium DCR adalah 5 ml.

3.4.1.2.6 Larutan stok zat besi = 50 ml (10 kali konsentrasi)

NaEDTA terlebih dahulu dilarutkan dalam 35 ml akuades pada gelas piala diatas *hot plate* dengan suhu kisaran 40-60°C. Setelah homogen larutan dibiarkan kembali pada suhu kamar, kemudian tambahkan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan ditambah akuades hingga 50 ml dalam gelas ukur. Kedua zat dihomogenkan kemudian dimasukan kedalam botol gelap dan ditutup rapat. Botol diberi label.

3.4.1.2.7 Larutan stok Mikronutrien F = 100 ml (1000 kali konsentrasi)

Mikronutrien dibuat stok 100 ml untuk 1000 konsentrasi dibuat dengan melarutkan H_3BO_3 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KI, NaMoO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, dan $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dengan massa 1000 kali yang dibutuhkan untuk 1 liter ke dalam gelas piala berisi akuades 70 ml. Setiap pemasukan bahan, larutan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan kemudian ditambah akuades hingga 100 ml dalam gelas ukur dan dihomogenkan kembali. Larutan disimpan dalam botol gelap berukuran 250 ml, ditutup rapat dan diberi label 'F'. Penggunaan larutan F untuk 1 L adalah 0,1 ml.

3.4.1.2.8 Larutan stok Mikronutrien G = 100 ml (10.000 kali konsentrasi)

Pembuatan stok mikronutrien G dilakukan dengan melarutkan 0,25 gram NiCl dalam 80 ml akuades. Zat dihomogenkan kemudian ditambah akuades hingga 100 ml dalam gelas ukur dan kembali dihomogenkan sebelum disimpan dalam botol gelap serta ditutup rapat. Botol diberi label stok 'G'. Penggunaan larutan ini adalah 0,01ml untuk 1 L medium DCR.

3.4.1.2.9 Larutan stok Myo-inositol = 50 ml (10 kali kepekatan)

Stok larutan Myo-inositol dibuat dengan melarutkan Myo-inositol sebanyak 10 kali massa yang dibutuhkan untuk 1 liter ke dalam 40 ml akuades. Larutan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* diatas *hote plate* dengan suhu berkisar 40-60 °C kemudian ditambah akuades hingga 50 ml dalam gelas ukur. Homogenisasi dilakukan kembali sebelum larutan dimasukkan ke dalam botol gelap berukuran 250 ml. Botol ditutup rapat dan diberi label. Penggunaan larutan ini adalah 5 ml untuk 1L medium.

3.4.1.2.10 Larutan stok L-Glutamin = 50 ml (10 kali kepekatan)

Pembuan larutan L-Glutamin 50 ml untuk 10 kali kepekatan dilakukan dengan melarutkan 7,3 gram L-Glutami dalam 40 ml akuades. Zat dihomogenkan diatas *hot plate* dengan suhu sekitar 40-60 °C kemudian ditambah akuades hingga 50 ml dalam gelas ukur dan kembali dihomogenkan sebelum disimpan dalam botol gelap dan ditutup rapat. Botol diberi label stok 'L-Glutamin' dan disimpan dalam refrigerator. Penggunaan larutan ini adalah 5 ml untuk 1 L medium DCR.

3.4.1.2.11 Larutan stok Vitamin = 100 ml (1000 kali konsentrasi)

Larutan vitamin terdiri dari Asam Nikotin, Pyridoxin-HCl, Thiamin-HCl dan L-Glycin (hanya untuk medium DCR) sebanyak 1000 kali massa yang dibutuhkan untuk 1 liter, kemudian dilarutkan dalam 70 ml akuades didalam gelas piala, setiap pemasukan bahan, larutan langsung di aduk meggunakan *magnetic stirrer*. Larutan kemudian tambah akuades hingga volum yang diinginkan dan dihomogenkan kembali dalam gelas ukur kemudian disimpan dalam botol gelap. Botol ditutup rapat dan diberi label. Penggunan stok vitamin adalah 0,1 ml untuk 1 L medium.

3.4.1.3 Pembuatan Medium Kultur

Dalam pembuatan medium, terlebih dahulu dibuat larutan stok untuk makronutrien, mikronutrien, NaFeEDTA, vitamin, larutan N-organik, dan larutan stok untuk zat pengatur tumbuh (ZPT). Masing-masing larutan stok dibuat dengan kepekatan 10 kali, sementara larutan stok ZPT dibuat dengan konsentrasi 10^{-3} . Seluruh larutan stok dipipet dan dicampur dalam beaker glass yang telah terlebih dahulu diisi akuades. Setelah tercampur merata, ditambahkan sukrosa 20 g/l kemudian ditambahkan ZPT sesuai dengan kombinasi ZPT yang diinginkan, kemudian medium digenapkan dengan menambahkan akuades hingga mencapai volume yang diinginkan. pH medium dibuat menjadi $5,8 \pm 0,1$ dengan penambahan 0,1 N NaOH dan atau 0,1 N HCl. Setelah pH yang diinginkan tercapai, ke dalam arutan medium dimasukkan agar sebanyak 8 g/l. Selanjutnya medium dipanaskan sehingga seluruh agar terlarut, kemudian masing-masing sebanyak 10 ml media dituangkan ke dalam botol kultur. Botol ditutup dengan *aluminium foil*, dan diikat dengan karet, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C pada tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Medium kemudian disimpan dalam kondisi gelap pada suhu kamar sampai digunakan.

3.4.1.4 Sterilisasi Alat

Alat yang digunakan dalam pembuatan medium seperti botol medium, batang pengaduk, *magnetic stirrer*, *tips* mikropipet, gelas piala, gelas ukur disterilisasi terlebih dahulu di dalam autoklaf dengan suhu 121 °C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Alat yang sudah disterilisasi kemudian disimpan ditempat yang bersih untuk dipergunakan dalam pembuatan medium.

3.4.2 Pelaksanaan Eksperimen

3.4.2.1 Pengambilan, Sterilisasi, Pendinginan, dan Penanaman.

Strobilus yang dicuplik adalah strobilus yang memiliki ukuran 5-7cm dengan warna hijau mengkilap (Gambar 3.1). Strobilus didapatkan dari wilayah sekitar Bandung Utara. Strobilus yang dicuplik terlebih dahulu dicuci dan disikat menggunakan sikat gigi dan detergen kemudian dibungkus dengan plastik dan diberi perlakuan pendinginan dalam refrigerator pada suhu $2 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ selama 12 jam.



Gambar 3.1 Strobilus betina *Pinus merkusii* (kiri). Biji *Pinus merkusii* (kanan)

Keterangan :

Anak panah hitam : Biji *Pinus merkusii*

Anak panah merah : Megagametofit yang mengandung embrio zigotik muda

Teknik pendinginan dilakukan sebagai pre-treatment dalam rangka mengakumulasi amilum dalam biji (Salisbury & Ross, 1984 dalam Rahmadani, 2007), gibberelin dan sitokinin, permeabilitas membran juga meningkat dengan

perlakuan pendinginan, hal ini memudahkan distribusi air antar sel (Devlin & Witham, 1983 dalam Rahmadani, 2007). Setelah pendinginan, biji dikeluarkan dari strobilus kemudian eksplan yang berupa megagametofit disterilisasi permukaannya dengan NaHPO₄ (Bayclin) 40% (40 ml bayclin dalam 60 ml akuades) selama 15 menit dan dibilas tiga kali dengan akuades steril masing-masing selama tiga menit. Sterilisasi dan penanaman eksplan ini dilakukan seluruhnya dalam *laminar air flow* dalam kondisi steril dan aseptik. Setiap botol diisi dengan lima buah megagametofit kemudian dikultivasi selama delapan minggu dalam keadaan gelap. Pengamatan dilakukan setiap satu minggu sekali setelah penanaman.

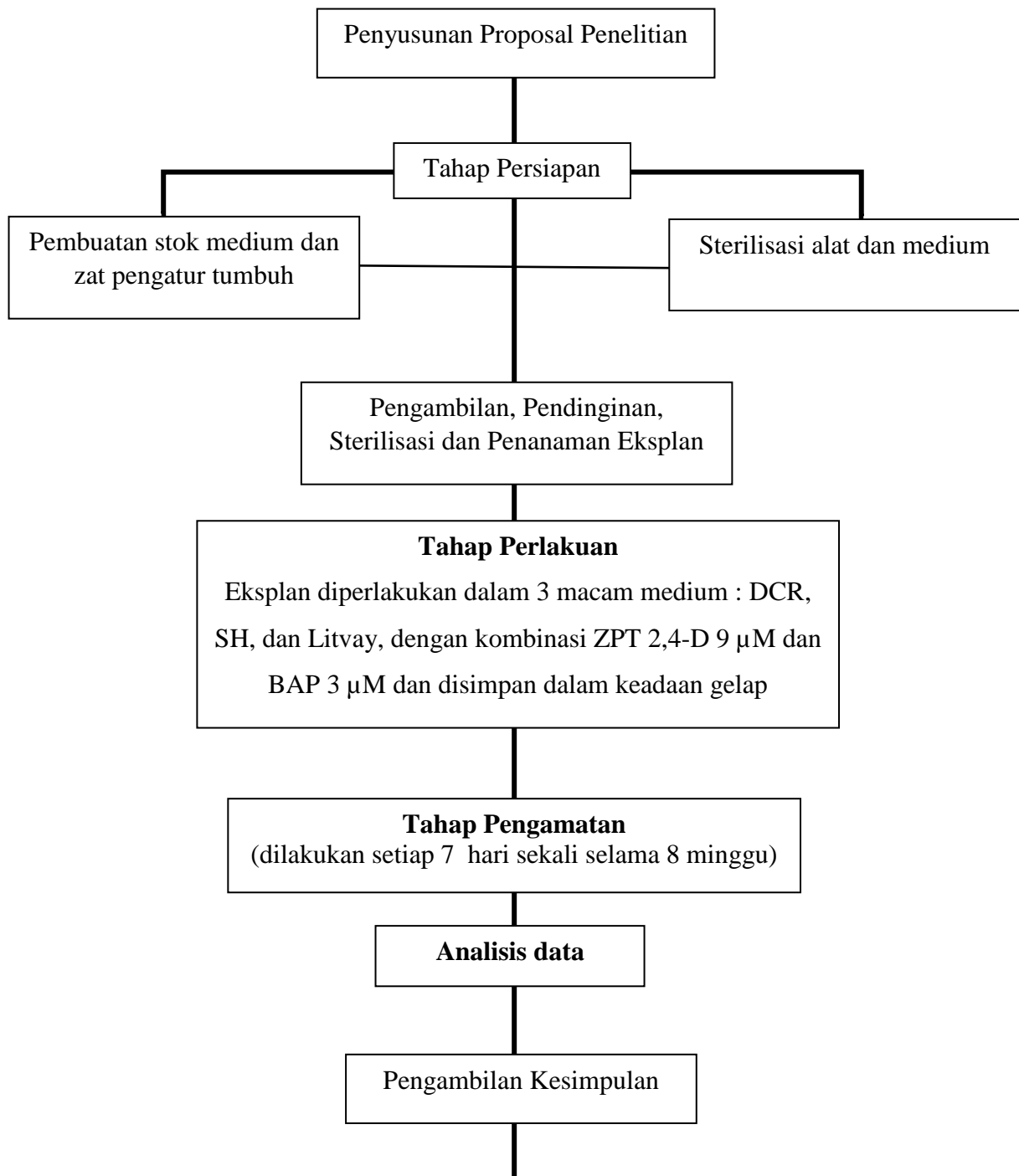
3.4.3 Teknik Pengumpulan Data dan Analisis Data

Botol kultur yang telah berisi megagametofit disimpan di tempat gelap pada suhu kamar dan diamati setiap tiga hari sekali selama 3 bulan. Tiap respon yang terjadi seperti pembesaran jaringan megagametofit, pembentukan kalus, perkecambahan dan pembentukan embrio somatik didokumentasikan serta dihitung persentasenya dari setiap jenis medium dan tiap ulangan, kemudian dihitung rata-rata persentasenya. Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Nurdini (2005), jumlah biji dalam botol dihitung sebagai 100%. Untuk menghitung persentase respon perhitungannya sebagai berikut:

$$\text{Persentase respon} = \frac{\text{Jumlah biji yang mengalami respon tertentu}}{\text{Jumlah biji dalam satu botol}} \times 100\%$$

3.5 Alur Penelitian

Berdasarkan deskripsi metode penelitian diatas, berikut adalah bagan alur yang akan dilakukan:



Penyusunan laporan penelitian

Gambar 3.1 Alur penelitian