

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian deskriptif. Data yang diambil dalam penelitian ini berupa data kualitatif dan kuantitatif meliputi respon eksplan megagametofit dari setiap perlakuan dan perhitungan persentase keberhasilan induksi dari perlakuan berbagai konsentrasi dan kombinasi auksin dan sitokinin. Auksin yang dipakai dalam penelitian ini adalah *2,4-Dikloropenoksiasetik acid* (2,4-D) dan sitokinin yang dipakai adalah *1-Naphthaleneacetic acid* (NAA) serta *6-Benzyladenin* (BA) mewakili hormon sitokinin. Zat pengatur tumbuh yang digunakan dikombinasikan dengan jumlah 16 kombinasi, tertuang dalam Tabel 3.1.

Tabel 3.1

*Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh yang Digunakan*

<b>Auksin/Sitokinin</b>	<b>S0</b> (BA 0)	<b>S1</b> (BA 2 $\mu\text{M}$ )	<b>S2</b> (BA 3 $\mu\text{M}$ )	<b>S3</b> (BA 4 $\mu\text{M}$ )
<b>A0</b> (Auksin 0)	A0S0	A0S1	A0S2	A0S3
<b>A1</b> (NAA 4.5 $\mu\text{M}$ + 2,4-D 4.5 $\mu\text{M}$ )	A1S0	A1S1	A1S2	A1S3
<b>A2</b> (NAA 9 $\mu\text{M}$ )	A2S0	A2S1	A2S2	A2S3
<b>A3</b> (2,4-D 9 $\mu\text{M}$ )	A3S0	A3S1	A3S2	A3S3

### **3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Sampel penelitian berupa megagametofit diambil dari strobilus yang berasal dari pohon *Pinus merkusii* di daerah Lapangan Berdebu, UPI dan Pondok Hijau Indah, Bandung Utara pada bulan Mei sampai Juni 2018. Perlakuan penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Botani, FPMIPA, Universitas Pendidikan Indonesia pada bulan Juni sampai Juli 2018.

### **3.3 Subjek Penelitian**

Subjek dalam penelitian ini adalah megagametofit *Pinus merkusii* yang mengandung embrio zigotik muda yang didapatkan dari strobilus berukuran 5-7 cm.

### **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.

##### **3.4.1.2 Pembuatan Medium Induksi**

###### **3.4.1.2.1 Pembuatan Stok Medium**

**Rai Irtifaul Fikri, 2018**

**RESPONS EKSPLAN MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii* Jung. & Devr. PADA MEDIA DCR DENGAN KOMBINASI ZPT BA, 2,4-D DAN NAA YANG BERBEDA**  
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |  
perpustakaan.upi.edu

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium *Douglas Cotyledon Reserve* DCR (Gupta dan Durzan, 1985). Dalam pembuatan medium, terlebih dahulu dibuat larutan stok yang kemudian disimpan dalam refrigerator. Pembuatannya dilakukan dengan pengelempokkan sebagai berikut:

#### 3.4.1.2.1.1 Stok A = 50ml (10 kali konsentrasi)

Pembuatan larutan stok makronutrien A 50 ml untuk 10 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang 4 gram  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 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. Penggunaan untuk membuat 1 L medium DCR adalah 5 ml.

#### 3.4.1.2.1.2 Stok B = 50 ml (10 kali konsentrasi)

Untuk membuat larutan stok B 10 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang 3,4 gram  $\text{KNO}_3$  dan dilarutkan dalam akuadest kurang lebih 40 ml menggunakan gelas piala. Pelarutan dilakukan dengan mengaduknya menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Setelah homogen, ditambahkan akuades sampai volum yang diinginkan dalam gelas ukur dan dituangkan kembali kedalam gelas piala untuk dihomogenkan kembali. Setelah seutuhnya larut, larutan dipindahkan

**Rai Irtifaul Fikri, 2018**

*RESPONS EKSPLAN MEGAGAMETOFIT Pinus merkusii Jung. & Devr. PADA MEDIA DCR DENGAN KOMBINASI ZPT BA, 2,4-D DAN NAA YANG BERBEDA*  
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |  
perpustakaan.upi.edu

kedalam botol gelap ukuran 250 ml. Botol diberi label stok B. Penggunaan larutan stok B adalah 5 ml untuk 1L medium DCR.

#### 3.4.1.2.1.3 Larutan stok C = 50 ml (10 kali konsentrasi)

Pembuatan larutan stok makroutrien C 10 kali konsentrasi dilakukan dengan menimbang 0,8 gram  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . 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 DCR.

#### 3.4.1.2.1.4 Larutan stok D = 50 ml (10 kali konsentrasi)

Larutan stok makronutrien D untuk 10 kali konsentrasi terdiri dari 3,7 gram  $\text{MgSO}_4$  dan 1,7 gram  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . 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.

#### 3.4.1.2.1.5 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 adalah 5 ml.

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

**Rai Irtifaul Fikri, 2018**

*RESPONS EKSPLAN MEGAGAMETOFIT Pinus merkusii Jung. & Devr. PADA MEDIA DCR DENGAN KOMBINASI ZPT BA, 2,4-D DAN NAA YANG BERBEDA*  
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |  
perpustakaan.upi.edu

Larutan stok zat besi terdiri dari 0,278 gram  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan 0,378 gram NaEDTA untuk 10 L medium DCR. 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 dimasukkan kedalam botol gelap dan ditutup rapat. Botol diberi label.

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

Mikronutrien dibuat stok 100 ml untuk 1000 konsentrasi dibuat dengan melarutkan 6,2 gram  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 8,6 gram  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 22,3 gram  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,38 gram KI, 0,25 gram  $\text{NaMoO}_4$ , 0,25 gram  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , dan 0,025 gram  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  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.

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

Pembuatan larutan mikronutrien G 10.000 kali konsentrasi yang dipisahkan menjadi 100 ml dilakukan dengan melarutkan 0,25 gram

**Rai Irtifaul Fikri, 2018**

**RESPONS EKSPAN MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii* Jung. & Devr. PADA MEDIA DCR DENGAN KOMBINASI ZPT BA, 2,4-D DAN NAA YANG BERBEDA**  
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

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.

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

Stok larutan Myo-inositol 50 ml untuk 10 kali konsentrasi dibuat dengan melarutkan Myo-inositol sebanyak 2 gram 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 DCR.

#### 3.4.1.2.1.10 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.

**Rai Irtifaul Fikri, 2018**

**RESPONS EKSPLAN MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii Jung. & Devr.* PADA MEDIA DCR DENGAN KOMBINASI ZPT BA, 2,4-D DAN NAA YANG BERBEDA**  
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |  
perpustakaan.upi.edu

#### 3.4.1.2.1.11 Larutan stok Vitamin = 100 ml (1000 kali konsentrasi)

Larutan vitamin terdiri dari 0.5 gram Asam Nikotin, 0,5 Pyridoxin-HCl, 1 gram Thiamin-HCl dan 2 gram L-Glycin. Untuk membuat stok 100 ml dengan 1000 kali kepekatan vitamin terlebih dahulu dilarutkan dalam 70 ml akuades didalam gelas piala, setiap memasukan 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. Penggunaan stok vitamin adalah 0,1 ml untuk 1 L medium.

#### 3.4.1.2.2 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.

#### 3.4.1.2.3 Pembuatan Medium

Pembuatan 1 L medium untuk 16 kombinasi dengan tiga kali ulangan dilakukan dengan masing-masing larutan stok diambil sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan dan dicampur dalam gelas piala

**Rai Irtifaul Fikri, 2018**

**RESPONS EKSPLAN MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii Jung.* & *Devr.* PADA MEDIA DCR DENGAN KOMBINASI ZPT BA, 2,4-D DAN NAA YANG BERBEDA**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |  
perpustakaan.upi.edu

yang telah terlebih dahulu diisi akuades. Setelah tercampur merata, ditambahkan 20 g/l sukrosa dan ditambah akuades menjadi 500 ml. Medium ini dibagi kedalam 16 gelas piala dengan masing-masing 15 ml. Kedalam setiap gelas piala tadi ditambahkan ZPT sesuai dengan kombinasi yang akan diperlakukan, medium ditambah akuades hingga mencapai volume sekitar 25 ml dan pH medium dibuat menjadi  $5,8 \pm 0,1$  dengan penambahan 0,1 N NaOH dan/atau 0,1 N HCl. Medium diberi akuades hingga 30 ml, ke dalam larutan medium dimasukkan agar-agar sebanyak 0,24g/30ml. Selanjutnya medium dipanaskan sehingga seluruh agar terlarut. Masing-masing kombinasi sebanyak 10ml media dituangkan ke dalam botol kultur. Botol ditutup dengan *aluminium foil*, diberi label, diikat dengan karet dan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  pada tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Medium kemudian disimpan dalam keadaan gelap pada suhu kamar sampai digunakan.

### **3.4.2 Pelaksanaan Eksperimen**

#### **3.4.2.1 Pengambilan, Sterilisasi, Pendinginan dan Penanaman Eksplan**

Strobilus yang dicuplik adalah strobilus yang memiliki ukuran 5-7cm dengan warna hijau mengkilap (Gambar 3.1). Strobilus yang dicuplik terlebih dahulu dicuci dan disikat menggunakan sikat gigi dan

**Rai Irtifaul Fikri, 2018**

**RESPONS EKSPLAN MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii* Jung. & Devr. PADA MEDIA DCR DENGAN KOMBINASI ZPT BA, 2,4-D DAN NAA YANG BERBEDA**  
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |  
perpustakaan.upi.edu



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 Jenis Strobilus yang diambil

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  $\text{NaHPO}_4$  (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

**Rai Irtifaul Fikri, 2018**

**RESPONS EKSPAN MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii* Jung. & Devr. PADA MEDIA DCR DENGAN KOMBINASI ZPT BA, 2,4-D DAN NAA YANG BERBEDA**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |  
perpustakaan.upi.edu

aseptik. Setiap botol diisi dengan tiga 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 kombinasi ZPT dan tiap ulangan, kemudian dihitung rata-rata persentasenya untuk tiga ulangan. Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Nurdini (2005), jumlah biji dalam botol dihitung sebagai 100%. Untuk menghitung persentase respon perhitungannya sebagai berikut:

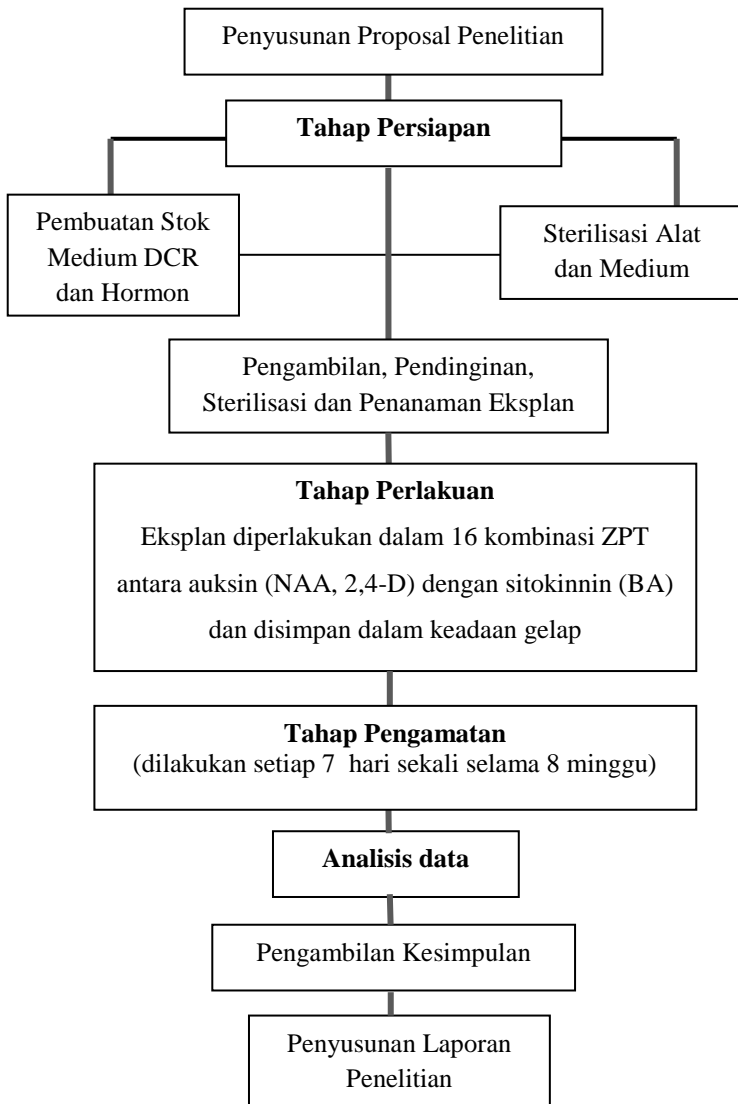
$$\text{Persentase respon} = \frac{\text{Jumlah biji yang mengalami respon tertentu} \times 100\%}{\text{Jumlah biji dalam satu botol}}$$

### 3.4.4 Alur Penelitian

**Rai Irtifaul Fikri, 2018**

*RESPONS EKSPAN MEGAGAMETOFIT Pinus merkusii Jung. & Devr. PADA MEDIA DCR DENGAN KOMBINASI ZPT BA, 2,4-D DAN NAA YANG BERBEDA*

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |  
perpustakaan.upi.edu



Rai Irtifaul Fikri, 2018

*RESPONS EKSPLAN MEGAGAMETOFIT Pinus merkusii Jung. & Devr. PADA MEDIA DCR DENGAN KOMBINASI ZPT BA, 2,4-D DAN NAA YANG BERBEDA*

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |  
perpustakaan.upi.edu

Gambar 3.2. Alur Penelitian