

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Jenis Penelitian**

Jenis penelitian anatomi kalus tebu (*Saccharum officinarum* L.) hasil subkultur yang dilakukan merupakan penelitian dasar dengan metode deskriptif. Penelitian ini bertujuan untuk membuat deskripsi, gambaran secara sistematis dan faktual mengenai fakta-fakta serta sifat-sifat antar fenomena yang diselidiki (Nazir, 2005).

#### **B. Pelaksanaan dan Lokasi Penelitian**

Penelitian anatomi kalus tebu (*S. officinarum* L) hasil subkultur dilaksanakan mulai bulan Mei 2007 hingga bulan Desember 2007. Penelitian dilakukan pada dua laboratorium, yang pertama adalah Laboratorium Fisiologi, untuk penginduksian dan subkultur kalus serta yang kedua adalah Laboratorium Struktur Tumbuhan, untuk pembuatan preparat awetan kalus. Kedua laboratorium tersebut berada di Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

#### **C. Populasi dan Sampel**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah seluruh tanaman tebu yang tumbuh di kebun koleksi Pusat Penelitian Perkebunan Gula

Indonesia (P3GI). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tebu varietas Ps-851 (*S. officinarum* L) berusia sekitar 4 bulan.

#### D. Bahan Penelitian

Bahan tanaman yang dipakai untuk menginduksi kalus adalah pucuk batang tebu varietas Ps-851 (*S. officinarum* L) berusia sekitar 4 bulan. Pucuk batang ini berasal dari kebun koleksi Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P3GI) Pasuruan, Jawa Timur. Bagian yang diambil dan dijadikan sebagai sumber eksplan adalah irisan-irisan daun muda yang masih menggulung.

#### E. Alat dan Bahan

##### 1. Alat

**Tabel 3.1**  
Alat-alat yang digunakan untuk pembuatan larutan stok garam-garam mineral dan zat pengatur tumbuh

No.	Nama Alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Botol untuk persediaan larutan stok dan zat pengatur tumbuh	250 ml	8 buah
2.	Gelas ukur	100 ml	1 buah
3.	Gelas kimia	250 ml	5 buah
4.	Corong	Diameter 5 cm	1 buah
5.	Spatula	Bahan logam	1 buah
6.	Batang pengaduk	Panjang 20 ml	1 buah
7.	Botol semprot	500 ml	1 buah

**Tabel 3.2**  
**Alat-alat yang digunakan untuk pembuatan medium**

No.	Nama alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Autoclave	ALP/KT 23	1 buah
2.	Hot plate & magnetik stirer	EYELA Magnetic stirer Rch-3	1 buah
3.	pH meter	UCHIDA KT-1A	1 buah
4.	Botol kultur	Diameter 3 cm, tinggi 5 cm	60 buah
5.	Gelas kimia	1000 ml	2 buah
6.	Gelas ukur	1000 ml	1 buah
		250 ml	1 buah
7.	Mikropipet	1 ml	2 buah
8.	Pipet	Bahan kaca	7 buah
9.	Botol semprot	500 ml	1 buah
10.	Batang pengaduk	Panjang 20 ml	1 buah
11.	Cawan petri	Diameter 12 cm	3 pasang
12.	Spatula	Bahan logam	1 buah

**Tabel 3.3**  
**Alat-alat yang digunakan untuk penanaman dan subkultur**

No.	Nama alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Laminar air flow cabinet	SBC-1000 A SHIMADZU	1 buah
2.	Pinset	Panjang 14 cm	1 buah
3.	Skapel dan blade	14,5 cm	1 buah
4.	Lampu spirtus	Diameter alas 5 cm	1 buah
5.	Jarum ose	Panjang 15 cm	1 buah
6.	Cawan petri	Diameter 12 cm	2 pasang

**Tabel 3.4**  
**Alat-alat yang digunakan untuk pembuatan preparat dan pengamatan anatomi kalus**

No.	Nama alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Pinset	Panjang 14 cm	1 buah
2.	Vacuum Diafragh Pump	ULVAC SINKU KIKO DA-20D	1 buah
3.	Desicator	DURAN	1 buah
4.	Botol vial	20 ml	50 buah
5.	Pipet	Bahan kaca	5 buah
6.	Botol untuk persediaan larutan	500 ml	18 buah
7.	Oven	SIBATA SPF-450	1 buah
8.	Mikrotom putar	370x290x230 mm Berat 19 kg	1 buah
9.	Kuas	No.3	2 buah
10.	Baki pita	Bahan kardus	5 buah
11.	Kaca objek	24,4 x 76,2 mm tebal 1mm-1,2mm	10 pak
12.	Kaca penutup	MENZEL-GLASER 20 x 20 mm	20 pak
13.	Paraffin Section Heat	ERMA F-1	1 buah
14.	Staining jar	Bahan kaca	24 buah
15.	Mikroskop	SHIMADZU KT-6	1 buah
16.	Kamera digital	SONY DSC-S60	1 buah

## 2. Bahan

**Tabel 3.5**  
**Bahan yang digunakan untuk pembuatan stok garam-garam mineral dan zat pengatur tumbuh**

No.	Nama bahan	Jumlah
1.	akuades	2 liter
2.	Larutan-larutan stok penyusun medium MS	Sesuai tabel 3.8
3.	Zat pengatur tumbuh 2,4-D	3 mg/l
4.	Karet	100 gram
5.	Kertas label	1 pak
6.	Aluminium foil	1 pak

**Tabel 3.6**  
**Komposisi medium modifikasi MS I untuk inisiasi kalus**

No.	Nama bahan/zat	Jumlah (mg/l)
1.	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
2.	KNO <sub>3</sub>	1900
3.	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
4.	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
5.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
6.	Na <sub>2</sub> EDTA	37,2
7.	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8
8.	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
9.	MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	22,3
10.	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
11.	KI	0,83
12.	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25
13.	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
14.	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
15.	Sukrosa	30000
16.	Agar-agar	8000
17.	Air kelapa muda	100
18.	Inositol	1
19.	Thiamine	0,4
20.	Pyridoxine	4

(Sumber : Lamadji, 1991)

**Tabel 3.7**  
**Bahan yang digunakan untuk pembuatan medium**

No.	Nama bahan	Jumlah
1.	Akuades	2 liter
2.	Larutan-larutan stok penyusun medium MS	Sesuai tabel 3.6
3.	Zat pengatur tumbuh 2,4-D	3 mg/l
4.	Agar-agar	8000 mg/l
5.	Sukrosa	30000 mg/l
6.	pH buffer	Secukupnya
7.	HCl 0,1 N	Secukupnya
8.	NaOH 0,1 N	Secukupnya
9.	Kertas label	1 pak
10.	Aluminium foil	1 pak
11.	Karet	100 gram

**Tabel 3.8**  
**Bahan-bahan yang digunakan untuk penanaman dan subkultur**

No.	Nama bahan	Jumlah
1.	Alkohol 70%	100 ml
2.	Alkohol 96%	100 ml
3.	Medium padat MS dalam botol kultur	1000 ml
4.	Pucuk batang tanaman tebu ( <i>S. Officinarum</i> L) yang berumur 4 bulan	14 buah
5.	Kertas saring	5 buah
6.	Korek api	1 pak
7.	Spirtus	150 ml

**Tabel 3.9**  
**Bahan-bahan untuk pembuatan preparat anatomi kalus**

No.	Nama bahan	Jumlah
1.	Formaldehid 40 %	25 ml
2.	Alkohol 50 %	500 ml
3.	Asam asetat glasial	25 ml
4.	Alkohol 70 %	500 ml
5.	Alkohol 80 %	500 ml
6.	Alkohol 90 %	500 ml
7.	Alkohol 96 %	500 ml
8.	Alkohol 100 %	500 ml
9.	Xilol	1 liter
10.	Paraffin lunak	250 gram
11.	Paraffin keras	500 gram
12.	Pewarna Hemalum-Meyer	100 ml
13.	Haupt	100 ml

## F. Cara Kerja

### 1. Pembuatan Medium

- a. Pembuatan larutan stok garam-garam Mineral dan zat pengatur tumbuh

Pembuatan medium untuk inisiasi dan subkultur kalus diawali dengan pembuatan larutan stok medium Murashige & Skoog (MS).

Larutan stok ini dikelompokkan menjadi 7 kelompok yaitu:

Tabel 3.10 komposisi larutan stok

No.	Kode larutan stok	Komposisi larutan stok
1.	A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
2.	B	KNO <sub>3</sub>
3.	C	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O
4.	D	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O, Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O dan KI
5.	E	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, Zn SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O dan MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
6.	F	NaEDTA dan Fe SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
7.	G	Myo-inositol, Tiamin, Piridoksin dan Biotin
8.	H	2,4-D ( <i>Diclorophenoxyacetic acid</i> )

Larutan tersebut dipekatkan dan dibuat stok untuk 5 liter medium. Maka, berat tiap bahan yang akan dibuat larutan stok yang tertera pada tabel 3.6 dikalikan 5. Untuk larutan A dan B, dibuat dengan konsentrasi 10 ml/L, sehingga bahan dilarutkan dengan ditambahkan akuades menjadi 50 ml. Bahan C sampai dengan bahan G dibuat larutan dengan konsentrasi 5 ml/L, untuk itu, masing-masing bahan dilarutkan pula dengan menggunakan akuades hingga volumenya 25 ml. Untuk bahan H (ZPT), dibuat dengan konsentrasi 5ml/L. Bahan ini dilarutkan dengan menggunakan NaOH 1N. Semua proses pelarutan dilakukan dengan mengaduknya menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah selesai, larutan stok dimasukkan ke dalam botol kaca dan gelas kimia yang diberi penutup kemudian disimpan di dalam lemari es.

#### b. Pembuatan Medium MS

Medium dibuat sebanyak 1 liter untuk inisiasi kalus dari irisan daun muda yang masih menggulung dan untuk subkultur kalus yang

terbentuk dari irisan daun muda tersebut. Larutan stok A dan B sebanyak 10 ml, larutan stok C-G sebanyak 5 mL, sukrosa sebanyak 8 gram, dan air kelapa muda sebanyak 100 mL dimasukkan ke dalam gelas kimia dengan kapasitas 1000 ml. Akuades ditambahkan hingga volumenya menjadi 1 liter. Semua bahan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut. Setelah semua bahan larut, kemudian dimasukkan 2,4-D sebanyak 5 mL. pH pada larutan medium diatur hingga 5,8 dengan menggunakan NaOH 0,1 N dan HCl 0,1N. Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan *pH meter*. Agar-agar sebanyak 8 gram ditambahkan pada medium tersebut dan dipanaskan hingga seluruh agar-agar larut sempurna. Setelah itu medium dituangkan ke dalam botol-botol kultur sebanyak 10 ml. Botol-botol kultur ditutup dengan menggunakan aluminium foil, dikencangkan dengan karet dan kemudian diberi label. Medium siap untuk disterilkan.

## 2. Sterilisasi Alat dan Medium

Semua botol kultur yang berisi medium dan alat-alat yang akan digunakan dalam proses penanaman dan subkultur disterilkan dahulu menggunakan autoklaf tipe KT-23 ALF pada suhu 121°C tekanan 15 Psi selama 15 menit. Botol-botol kultur yang berisi medium dan telah disterilkan disimpan di ruang kultur. Alat-alat untuk penanaman eksplan dan subkultur seperti pinset dan jarum ose dicuci bersih kemudian dikeringkan. Cawan Petri diisi dengan kertas saring, aluminium foil dan



karet. Semua alat dibungkus dengan menggunakan kertas buram dan dibungkus plastik tahan panas.

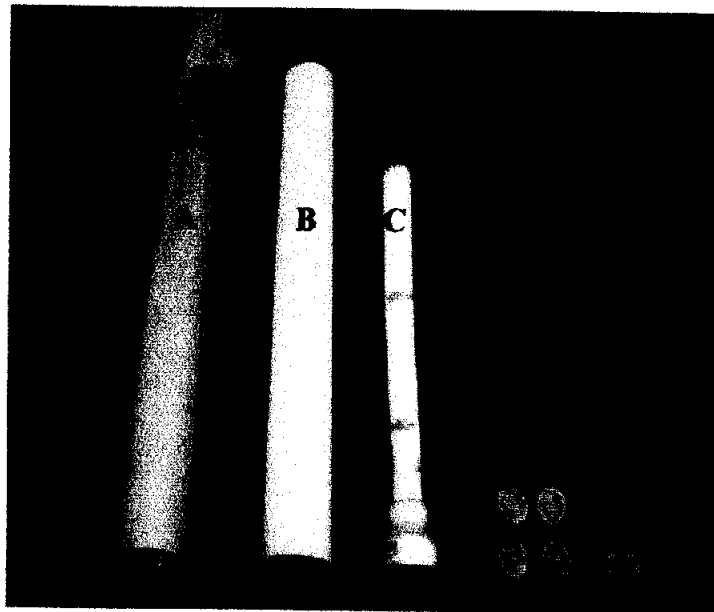
### 3. Pemilihan Eksplan untuk Penginisian Kalus

Pucuk batang yang berasal dari tanaman tebu yang berumur 4 bulan dengan tinggi  $\pm$  1 meter dipotong dan dikumpulkan (Gambar 3.1).



**Gambar 3.1. Pucuk batang tanaman tebu (*S. officinarum* L)**

Pucuk batang dibersihkan dan dibuat potongan-potongan batang sepanjang 30 cm dari daun pertama (Gambar 3.2.A dan B). Bagian yang dijadikan sebagai eksplan untuk penginisian kalus yaitu daun menggulung yang berada 10 cm diatas meristem apeks (Gambar 3.2.C).



**Gambar 3.2.** Bahan yang dijadikan eksplan untuk penginisiasian kalus. A. Pucuk tebu; B. Pucuk tebu yang akan disterilkan secara fisik dalam laminar; C. Daun muda menggulung (▶ menunjukkan bagian yang akan dijadikan eksplan); D. Irisan-irisian daun muda yang masih menggulung; E. Irisan daun muda yang siap ditanam dalam medium MS.

#### 4. Penanaman Eksplan dan Subkultur Kalus

##### a. Penanaman Eksplan

Sebelum menanam, semua bahan yang akan digunakan, diantaranya media, eksplan, alkohol, lampu spirtus, pinset dan cawan Petri disiapkan. *Laminar air flow* dibersihkan dengan alkohol 70% kemudian semua bahan dan alat yang akan digunakan kecuali eksplan dimasukkan. Sinar ultra violet dinyalakan selama kurang lebih 30 menit dan aliran udara dibiarkan selama 30 menit. Sterilisasi eksplan dilakukan secara mekanik, yaitu potongan pucuk batang tebu dicelupkan ke dalam alkohol 96%, kemudian dilewatkan di atas lampu spirtus sampai alkoholnya habis terbakar. Pelepah daun yang menutupi potongan pucuk dikelupas. Hal ini dilakukan dan diulang sampai tiga kali hingga nampak adanya daun muda

yang masih menggulung dengan diameter  $\pm 1$  cm. Daun muda yang akan digunakan sebagai eksplan berada 10 cm di atas meristem apeks. Daun setebal 3-5 mm dipotong melintang sebanyak 10 buah (Gambar 3.2.D). Eksplan terlebih dahulu dilukai dan kemudian dimasukkan ke dalam botol kultur yang berisi media dan ditutup dengan rapat menggunakan alumunium foil (Gambar 3.3.E). Botol kultur diberi label agar tidak tertukar. Semua prosedur dilakukan dekat api.

Botol kultur yang telah berisi eksplan diinkubasi di dua tempat, yaitu di tempat dalam kondisi gelap dan terang. Pada kondisi terang diatur penyinaran 16 jam/hari dengan menggunakan lampu neon. Kedua kondisi berada pada temperatur kamar.

#### b. Subkultur kalus

Persiapan subkultur kalus sama dengan persiapan pada saat penanaman eksplan. Kalus-kalus yang terbentuk dari eksplan yang telah berumur satu bulan baik pada kondisi gelap dan terang dipisahkan dengan eksplan dan disubkultur pada media yang sama. Subkultur kalus dilakukan dengan cara eksplan dikeluarkan dengan jarum Ose. Kemudian kalus dipisahkan dari eksplan dan dipotong-potong dengan ukuran  $\pm 0,5$  cm diatas cawan Petri menggunakan skapel dan pinset steril. Potongan kalus empat sampai lima dimasukkan ke dalam media MS. Botol-botol kultur yang telah berisi kalus disimpan kembali pada kondisi gelap dan terang. Perkembangan kalus secara morfologi pada hari ke-0, 7, 9, 13, 15 dan 32

diamati, dicatat, dan didokumentasikan dengan menggunakan kamera digital.

#### **5. Pengambilan Kalus untuk Pembuatan Preparat Awetan Anatomi Kalus**

Kalus sebelum subkultur (hari ke-0) dan setelah subkultur (hari ke-7, 9, 11, 13, 15 dan 32) difiksasi dalam FAA 50 % dan sebelumnya dilakukan pengamatan morfologi kalus berdasarkan warna dan tekstur kalus. Dipilihnya kalus sebelum subkultur bertujuan untuk melihat anatomi kalus sebelum disubkultur, sedangkan alasan dipilihnya pengambilan kalus pada hari ke-7 sampai ke-15 dengan interval 3 hari dikarenakan pada hari-hari tersebut ditemukan adanya perubahan warna dan tekstur kalus.

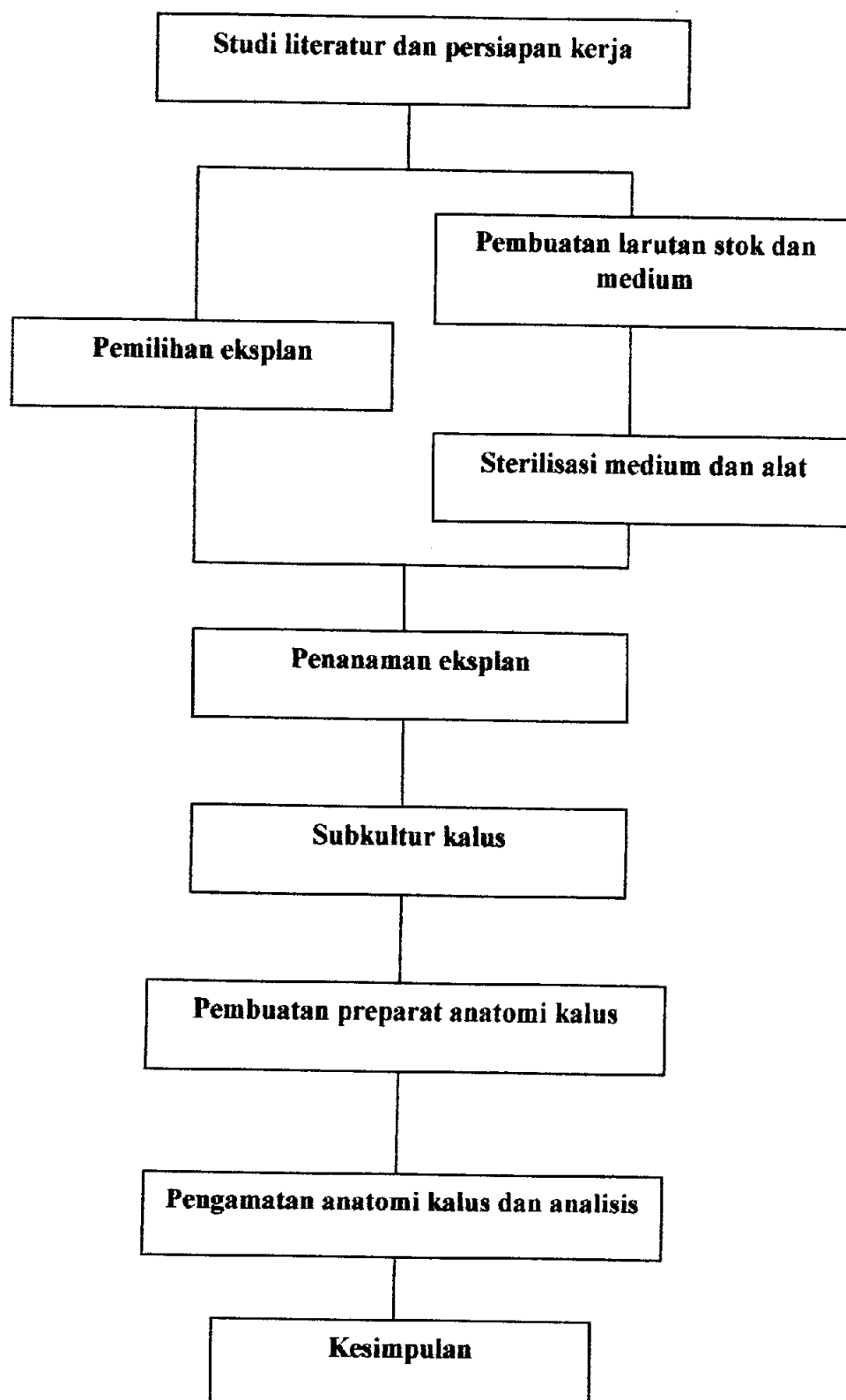
#### **6. Pembuatan Preparat Awetan Anatomi Kalus**

Untuk mengamati anatomi kalus sebelum dan setelah subkultur dibuat preparat awetan dengan menggunakan metode paraffin (Sass,1958). Kalus yang telah diambil, dipisahkan dan difiksasi dalam botol vial berisi larutan FAA 50% selama 24 jam. Selanjutnya, kalus diaspirasi dengan menggunakan aspirator sampai udara dalam jaringan habis dikeluarkan dengan interval 6 x 2 menit. Kalus kemudian didehidrasi dengan menggunakan larutan seri alkohol (alkohol 50%,70%,80%,90%,100%). Bahan direndam dalam larutan seri alkohol masing-masing selama dua jam. Dari larutan alkohol 100%, bahan dimasukkan ke dalam larutan alkohol : xilol ( 3:1;1:1;dan 1:3) berturut-turut selama masing-masing dua jam. Kemudian dimasukkan ke dalam xilol murni dengan dua kali

penggantian selama masing-masing dua jam. Tahap selanjutnya yaitu, infiltrasi dengan menggunakan larutan xilol : paraffin ( 3:1;1:1;1:3) dalam oven 48°C berturut-turut selama masing-masing dua jam. Infiltrasi dilanjutkan dengan paraffin keras dalam oven dengan suhu 58°C selama 4 jam dengan dua kali penggantian masing-masing dua jam. Pada penggantian yang kedua, bahan kemudian ditanam dalam paraffin keras dengan menggunakan cetakan dari kotak yang terbuat dari kertas tebal. Setelah itu, bahan dipotong dan disayat secara seri dengan menggunakan mikrotom putar dengan ketebalan 8-10 µm. Setelah pita paraffin terbentuk, 3-4 potong pita paraffin disimpan di atas kaca objek yang sebelumnya diolesi dengan sedikit perekat haupt dan beberapa tetes akuades diatas hot plate dengan suhu  $\pm 41^{\circ}\text{C}$  hingga pita paraffin memuai dan menempel dengan rata. Hasil sayatan pada objek diwarnai dengan pewarna Hemalum-Meyer. Setelah tahap pewarnaan selesai, kemudian objek ditetesi dengan entelan dan ditutup dengan kaca penutup.

#### **7. Pengamatan Anatomi**

Struktur anatomi diamati dengan mikroskop yang telah dikalibrasi antara lensa objektif dan okuler dengan mikrometer. Data anatomi yang didapat didokumentasikan dengan kamera digital SONY DSC-S60.



**Gambar 3.3. Alur Penelitian**

