

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini terdiri dari dua tahap yaitu tahap perbanyakan dan pematangan embrio somatik *Pinus merkusii* Jung. & Devr. Tahap perbanyakan dilakukan pada medium DCR dengan penambahan 9 μM 2,4-D dan 2 μM BAP. Tahap pematangan terdiri dari dua faktor yaitu klon ESM (PMC 2, 4 dan 11) dan konsentrasi ABA (0; 2,5; 5; 7,5; 10 μM). Faktor pertama terdiri dari 3 taraf (perlakuan) dan faktor kedua terdiri dari 5 taraf (faktorial 3x5). Percobaan diulang sebanyak 3 kali.

Tabel 3.1 Kombinasi perlakuan pematangan embrio somatik *Pinus merkusii*

Perlakuan		Klon ESM		
PEG (%)	ABA (μM)	PMC 2	PMC 4	PMC 11
6	0	PMC 2 PA 60	PMC 4 PA 60	PMC 11 PA 60
6	2,5	PMC 2 PA 62,5	PMC 4 PA 62,5	PMC 11 PA 62,5
6	5	PMC 2 PA 65	PMC 4 PA 65	PMC 11 PA 65
6	7,5	PMC 2 PA 67,5	PMC 4 PA 67,5	PMC 11 PA 67,5
6	10	PMC 2 PA 610	PMC 4 PA 610	PMC 11 PA 610

Ket : PA 60 adalah PEG 6 % dan ABA 0 μM dan seterusnya.

B. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fisiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini tertera pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2 Alat-alat penelitian

No	Nama Alat	Jumlah
1.	Mikropipet 1000 μ L, 2 mL dan 5 mL	3
2	Spatula	1
3	<i>Laminary air flow</i>	1
4	Autoklaf	1
5	<i>Hot plate with magnetic stirrer</i>	1
6	Timbangan analitik	1
7	pH meter	1
8	Pembakar spirtus	1
9	Gelas kimia 50 mL, 250 mL dan 1000 mL	3
10	Gelas ukur 100 mL, 250 mL dan 1000mL	3
11	Botol kultur	200
12	Botol semprot	1
13	Batang pengaduk	1
14	Kaca arloji	2
15	Lemari es	1
16	Pinset	1
17	Pembakar spirtus	1
18	<i>Filter holder</i>	1
19	Membran selulosa	2

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini tertera dalam Tabel 3.3.

Tabel 3.3 Bahan-bahan penelitian

No	Nama Bahan	Jumlah
1	Medium DCR	3000 mL
2	Aquadest	10.000 mL
3	Hormon 2-4D	22,1 mg
4	Hormon BAP	22,5 mg
5	PEG	350 gram
6	ABA	30 mg
7	Spiritus	1000 mL
8	Etanol 70 % v/v	1000 mL
9	NaOH 10 % b/v	100 mL
10	Agar batangan	18 g
11	NaOH 0,1 N	500 mL
12	HCl 0,1 N	200 mL
13	Karet	500 gram
14	Tissue gulung	5 gulung
15	Aluminium foil	2 gulung
16	Plastic wrap	2 gulung
17	Kertas label	2 pak
18	Kertas saring	100 lembar

D. Cara Kerja

Langkah kerja dalam penelitian ini terdiri dari tiga tahapan yaitu tahap persiapan, pelaksanaan dan pengumpulan serta analisis data.

1. Tahap Persiapan

Persiapan pada penelitian ini terdiri dari persiapan sterilisasi alat yang akan digunakan, pembuatan medium perbanyakan, pembuatan medium pematangan dan seleksi klon yang akan diperbanyak.

a. Sterilisasi Alat

Semua alat yang akan digunakan dalam penelitian seperti spatula, pinset cawan Petri, kertas saring, tips mikropipet, *filter holder* dan membran selulosa disterilisasi pada suhu 121 °C dan tekanan 1,5 atm.

b. Medium Perbanyakan

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium DCR (*Douglas Cotyledon Reserve*). Komposisi medium DCR tertera pada Tabel 3.4. Sebelum pembuatan medium, larutan stok untuk makronutrient, mikronutrient, NaFeEDTA, vitamin, larutan N-organik dan ZPT (2,4-D dan BAP) disiapkan terlebih dahulu. Masing-masing larutan stok dibuat dengan kepekatan 10 kali. Sementara larutan ZPT dibuat dengan kepekatan 10^{-3} M. Larutan stok makronutrien, mikronutrient, vitamin, NaFeEDTA, dan larutan N-organik dimasukkan dalam beaker glass yang telah diisi aquadest sesuai dengan kebutuhan. Penambahan ZPT (9 μ M 2,4-D dan 2 μ M BAP) dilakukan setelah semua larutan stok tercampur. Setelah tercampur merata, ditambahkan 20 g/L sukrosa dan medium digenapkan sesuai kebutuhan. Keasaman medium ditera hingga mencapai $5,8 \pm 0,1$ dengan menambahkan 0.1 N NaOH dan atau 0,1 N HCl. Setelah pH tercapai, kedalam larutan dimasukkan agar sebanyak 8 g/L dan dipanaskan hingga seluruh agar larut. Sebanyak 15 mL media dimasukkan dalam botol kultur lalu disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121 °C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Medium kemudian disimpan dalam tempat gelap pada suhu kamar sampai digunakan.

Tabel 3.4 Komposisi medium DCR (Gupta dan Durzan, 1985)

No	Bahan	Jumlah dalam 1 L (mg)
1	KNO ₃	340
2	NH ₄ NO ₃	400
3	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	556
4	CaCl ₂ .2H ₂ O	85
5	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
6	KH ₂ PO ₄	170
7	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
8	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
9	H ₃ BO ₃	6,2
10	KI	0,83
11	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
12	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25
13	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,25
14	NiCl ₂	0,025
15	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
16	Na ₂ EDTA	37,8
17	Myoinositol	200
18	Asam Nikotin	0,5
19	Pyrodixin-HCl	0,5
20	Thiamin-HCl	1,0
21	L-Glycin	2,0
22	L-Glutamin	730

c. Medium Pematangan

Pembuatan medium pematangan diawali dengan dibuatnya larutan stok ABA dengan kepekatan 10^{-3} M. Sementara bahan lainnya menggunakan larutan stok sama seperti medium perbanyakan. Seluruh larutan stok dimasukkan dalam beaker glass yang telah diisi aquadest. Setelah tercampur merata, ditambahkan 20 g/L sukrosa, 6 % PEG dan 0; 2,5; 5; 7,5 atau 10 μ M ABA. Medium digenapkan sesuai kebutuhan. Keasaman medium ditera hingga mencapai $5,8 \pm 0,1$ dengan menambahkan 0.1 N NaOH dan atau 0,1 N HCl. Setelah pH tercapai, kedalam larutan dimasukkan agar sebanyak 8 g/L dan dipanaskan hingga seluruh agar larut. Sebanyak 15 mL media

dimasukkan dalam botol kultur lalu disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Penambahan ABA dilakukan dengan dua cara yaitu sebelum diautoklaf dan setelah diautoklaf. Penambahan ABA setelah diautoklaf dilakukan pada medium setengah dingin (± 40 °C) yang sebelumnya telah disterilisasi menggunakan membran selulosa. Medium kemudian disimpan dalam tempat gelap pada suhu kamar sampai digunakan.

d. Seleksi Klon

Pada penelitian yang dilakukan oleh Dinar (2007), Rahmadani (2007) dan Rusfiandi (2007) didapat 14 klon embrio somatik *Pinus merkusii*. Namun tidak semua klon berploriferasi dengan baik. Sebagian klon tidak menunjukkan pertumbuhan setelah disubkultur, klon tersebut adalah PMC 3, 5, 6, 7, 10, 12 dan 13. Sedangkan PMC 1 mengalami *browning* sehingga tidak dapat digunakan dalam penelitian selanjutnya. Klon yang berploriferasi dengan baik adalah PMC 2, 4, 8, 9, 11 dan 14.

2. Tahap Pelaksanaan

a. Perbanyakan dan Pengukuran Pertambahan Berat (Kurva Tumbuh)

ESM

Seratus miligram embrio somatik yang telah berploriferasi dengan baik (PMC 2, 4, 8, 9, 11 dan 14) dipindahkan dalam medium DCR dengan penambahan 2,4-D dan BAP masing-masing sebanyak 9 μ M dan 2 μ M. Selama 6 minggu, embrio somatik tersebut ditimbang tiap minggu untuk mengetahui pertambahan beratnya. Seluruh proses tersebut dilakukan dalam

kondisi steril. Berdasarkan data tersebut kemudian dibuat kurva tumbuh tiap klon *Pinus merkusii*.

Pengamatan awal pertumbuhan tiap klon dilakukan secara visual setiap tiga hari. Awal pertumbuhan ESM didapat dengan melihat perubahan morfologi yang menunjukkan adanya pertumbuhan. Lama kultivasi didapat dari waktu klon untuk mencapai fase stationer.

Kurva tumbuh yang telah dibuat dijadikan acuan untuk menentukan waktu subkultur. Tiap klon disubkultur berdasarkan kurva tumbuhnya masing-masing yaitu pada fase stasioner awal. Waktu subkultur tersebut juga digunakan pada saat subkultur klon pada medium pematangan.

Kecepatan pertumbuhan embrio somatik dikelompokkan dalam kategori cepat, sedang dan lambat. Embrio somatik yang termasuk ke dalam kategori cepat adalah yang mulai tumbuh setelah 1 minggu subkultur. Embrio somatik yang termasuk ke dalam kategori sedang adalah yang mulai tumbuh setelah 2 minggu subkultur. Embrio somatik yang termasuk ke dalam kategori lambat adalah yang mulai tumbuh setelah 3 minggu subkultur.

d. Pematangan ESM

Pematangan embrio somatik dilakukan pada klon yang mewakili masing-masing karakter pertumbuhan. Karakter pertumbuhan cepat diwakili oleh PMC 11. Karakter pertumbuhan sedang diwakili oleh PMC 2 dan karakter pertumbuhan lambat diwakili oleh PMC 4.

Penanaman ESM pada medium pematangan dilakukan dengan dua cara. Cara yang pertama adalah 0,5 gram ESM disuspensikan dalam 5 mL aquadest steril. Sedangkan cara yang kedua adalah embrio yang telah disuspensikan

kemudian dibilas sebanyak tiga kali pada aquadest steril. Setelah itu, setengah mL suspensi masing-masing cara tersebut disebar menggunakan pipet steril di atas kertas saring. Kertas saring yang telah mengandung ESM diletakkan dalam medium pematangan.

Kultur tersebut diinkubasi selama 1-2 bulan dalam gelap pada suhu kamar. Perkembangan embrio somatik diamati setiap minggu. Perubahan bentuk morfologi yang terjadi pada embrio somatik dicatat dan didokumentasikan.

3. Pengumpulan dan Analisis Data

Embryo suspensor mass (ESM) yang telah berproliferasi ditimbang perubahan beratnya tiap satu minggu selama delapan minggu. Data hasil perhitungan pertambahan berat klon dirata-ratakan. Berdasarkan data hasil rata-rata tersebut dibuat kurva tumbuh tiap klon ESM.

Perubahan morfologi yang tampak dari tiap klon diamati dan didokumentasikan. Data tersebut kemudian dianalisis secara kualitatif (dideskripsikan). Data yang diperoleh berdasarkan hasil pematangan juga dianalisis secara kualitatif (dideskripsikan).

