

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian mengenai struktur dan perkembangan kalus tebu (*Saccharum officinarum* L.) yang diinduksi dari eksplan daun muda merupakan penelitian dasar dengan metode deskriptif. Tujuan dari penelitian deskriptif ini yaitu untuk membuat deskripsi, gambaran secara sistematis dan faktual mengenai fakta-fakta serta sifat-sifat antar fenomena yang diselidiki (Nazir, 2005).

B. Waktu dan Lokasi Penelitian

Pelaksanaan penelitian berlangsung dari bulan Mei 2007 hingga bulan Desember 2007. Untuk penginduksian kalus tebu (*Saccharum officinarum* L.) dilakukan di laboratorium Fisiologi, sedangkan pembuatan preparat awetan serta pengamatannya dilakukan di laboratorium Struktur Tumbuhan, Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

C. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk dikultur dalam penginduksian kalus yaitu pucuk daun tebu muda varietas Ps-851 yang masih menggulung dan berusia sekitar 4 bulan. Pucuk daun tebu ini diperoleh dari kebun koleksi Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P3GI), Pasuruan, Jawa Timur. Dalam pembuatan

preparat, bahan yang digunakan yaitu kultur yang berusia 0, 3, 6, 9, 12, 15 dan 32 hari.



Gambar 3.1 Pucuk tebu (*Saccharum officinarum L.*) varietas PS-851 yang digunakan sebagai eksplan. (Sumber: dokumentasi pribadi)

D. Langkah Kerja

1. Persiapan Alat dan Medium

a. Penyediaan dan Sterilisasi Alat

Untuk penanaman eksplan, alat yang digunakan harus dalam keadaan steril. Alat-alat yang digunakan dalam penanaman eksplan seperti pinset, skapel serta petridish yang berisi karet tahan panas, kapas dan aluminium disterilisasi menggunakan *autoclave* yang telah diatur pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

b. Pembuatan Larutan Stok dan Medium Penanaman

Dalam penelitian ini, medium yang digunakan yaitu medium Murashige & Skoog (MS) yang ditambahkan zat pengatur tumbuh 2,4-D (*Dichlorophenoxyacetic acid*) sebanyak 3 mg/L. Komposisi medium tersebut merupakan medium baku yang digunakan oleh P3GI untuk induksi kalus pada tahap awal mikropropagasi tebu. Medium ini juga biasa disebut dengan medium MS I. Adapun komposisi medium MS I dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Komposisi Medium MS I

No.	Nama Bahan	Jumlah (mg/L)
1.	NH ₄ NO ₃	1,650
2.	KNO ₃	1,900
3.	CaCl ₂ .2H ₂ O	440,000
4.	H ₃ BO ₃	6,200
5.	KH ₂ PO ₄	170,000
6.	CaCl ₂ .6H ₂ O	440,000
7.	Na ₂ Mo O ₄ .2H ₂ O	0,250
8.	KI	0,830
9.	MgSO ₄ .7H ₂ O	370,000
10.	Zn SO ₄ .7H ₂ O	8,600
11.	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
12.	MnSO ₄ .7H ₂ O	22,300
13.	NaEDTA	37,200
14.	Fe SO ₄ .7H ₂ O	27,800
15.	Sukrosa	30,000
16.	Agar-agar	8,000
17.	Air kelapa muda	100,000
18.	Myo-inositol	1,000
19.	Thiamin	0,400
20.	Piridoksin	4,000
22.	2,4-D	3,000
23.	Akuades	Secukupnya

(Sumber : Lamadji, 1991)

Untuk memudahkan dalam pembuatan medium, maka dibuat larutan stok terlebih dahulu. Bahan-bahan medium yang akan dibuat larutan stoknya

adalah unsur makro, unsur mikro, vitamin, Myo-inositol dan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT). Bahan untuk larutan stok dikelompokkan menjadi delapan kelompok (Tabel 3.2).

Tabel 3.2 Komposisi larutan stok

No.	Kode larutan stok	Komposisi larutan stok
1.	A	NH_4NO_3
2.	B	KNO_3
3.	C	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
4.	D	H_3BO_3 , KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan KI
5.	E	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
6.	F	NaEDTA dan $\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
7.	G	Myo-inositol, Tiamin, Piridoksin dan Biotin
8.	H	2,4-D

Larutan tersebut dipekatkan dan dibuat stok untuk 5 liter medium. Maka, berat tiap bahan yang akan dibuat larutan stok yang tertera pada tabel 3.1 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 5 mL/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.

Dalam penelitian ini, medium penanaman dibuat sebanyak satu liter. Larutan stok A dan B diambil masing-masing sebanyak 10 mL, larutan stok C sampai dengan larutan stok G diambil masing-masing sebanyak 5 mL, sukrosa sebanyak 8 gram, dan air kelapa muda sebanyak 100 mL dimasukkan ke dalam gelas kimia. Kemudian ditambahkan akuades hingga volumenya menjadi 1L. Pengadukan bahan dilakukan dengan menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut. Setelah semua bahan larut, kemudian dimasukkan 2,4-D sebanyak 5 mL. Derajat keasaman (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*. Setelah pH larutan medium 5,8, kemudian medium tersebut dipanaskan dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer with hotplate* dan ditambahkan agar-agar sebanyak 8 gram. Setelah bahan mendidih dan larut, kemudian dimasukkan ke dalam botol kultur kurang lebih sebanyak 8-10 mL, ditutup dengan menggunakan *aluminium foil* dan karet. Sterilisasi medium dilakukan dengan menggunakan *autoclave* yang telah diatur pada suhu 121⁰C, tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Setelah disterilisasi, medium disimpan di ruang kultur.

2. Penanaman Eksplan dan Pemeliharaan Kultur

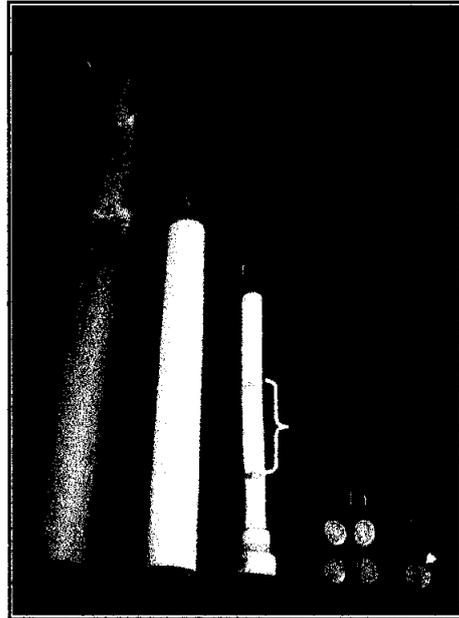
Semua bahan dan alat kecuali eksplan, seperti botol kultur yang berisi medium MS I, pinset, skapel dan petridish yang berisi karet, *aluminium foil* dan kapas yang telah disterilisasi, talenan plastik, botol yang berisi alkohol 95 %, lampu spirtus, dan korek api dimasukkan ke dalam *laminar air flow*. Talenan yang

di atasnya diletakkan *aluminium foil* disterilisasi dengan menggunakan alkohol 95%. Semua alat dimasukkan ke dalam *laminar air flow*, kemudian diberi sinar UV selama 30 menit.

Eksplan yang akan ditanam dimasukkan ke dalam *laminar air flow* setelah sebelumnya diberi alkohol. Dengan menggunakan pinset, potongan pucuk tebu yang telah disiapkan (Gambar 3.2 bagian B) dicelupkan dalam alkohol. Bagian pucuk tadi kemudian dilalukan di atas api spirtus hingga alkohol habis terbakar, kemudian bagian pelepah pucuk dikelupas. Tahap ini dilakukan sebanyak tiga kali. Ruas terakhir dekat batang dipotong perlahan dengan menggunakan skapel. Pemotongan dilakukan sambil memutar pucuk dengan menahan bagian ujung pucuk dekat batang menggunakan jari. Pelepah daun dikelupas, hingga terlihat daun muda. Pengelupasan dilakukan sebanyak kurang lebih 2 kali. Bagian pucuk yang letaknya kurang lebih 2-3 cm dari titik tumbuh bagian yang menuju batang diambil (Gambar 3.2 bagian C), sedangkan sisanya disingkirkan. Pemotongan ini dilakukan dengan menggunakan skapel. Bagian yang digunakan dipotong-potong setebal 3-5 mm sebanyak 8-10 potongan (Gambar 3.2 bagian D). Potongan yang telah ada dilukai dengan menggunakan skapel, kemudian dimasukkan ke dalam botol kultur yang berisi medium MS I dan ditutup menggunakan *aluminium foil* dan karet. Pinset yang digunakan tidak boleh terlalu panas, karena dapat mematikan jaringan.

Botol kultur yang telah berisi eksplan diinkubasi di dua tempat, yaitu di tempat dalam kondisi gelap dan terang pada temperatur kamar, penyinaran 16 jam/hari (24 jam) dengan menggunakan lampu neon. Perkembangan eksplan

jam/hari (24 jam) dengan menggunakan lampu neon. Perkembangan eksplan secara morfologi pada hari ke-3, 6, 9, 12, 15 dan hari ke-32 diamati dan dicatat serta didokumentasikan dengan menggunakan kamera digital.



Gambar 3.2. Cara pengambilan eksplan yang akan ditanam di medium

A. Bagian pucuk daun tebu; B. Bagian pucuk yang akan diambil jaringannya (setelah dipotong dan dikelupas); C. Bagian pucuk setelah dikelupas sebanyak 3x dan daerah pemotongannya; D. Potongan-potongan jaringan yang akan ditanam; E. Potongan jaringan yang akan ditanam setelah dilukai. (Sumber: dokumentasi pribadi)

3. Pembuatan Preparat Awetan Anatomi Kalus dan Pengamatan

Dalam penelitian ini, eksplan dan atau kalus yang dibuat preparat awetannya yaitu dari kultur yang berusia 0, 3, 6, 9, 12, 15 dan 32 hari. Pembuatan preparat dilakukan dengan menggunakan metode parafin (Sass, 1958) dan pewarnaan menggunakan Hemalum Mayer's. Pewarna Hemalum Mayer's dapat digunakan untuk mewarnai jaringan meristematik atau belum banyak terdiferensiasi (Hidayat, 1980). Spesimen berupa eksplan dan kalus yang

50% selama 24 jam. Setelah difiksasi, spesimen memasuki tahap aspirasi yang bertujuan untuk menarik udara yang ada dalam jaringan untuk keluar. Tahap aspirasi dilakukan hingga bahan tenggelam dan tidak ada gelembung udara. Tahap ini dilakukan menggunakan alat vakum dengan waktu 8 x 1,5 menit.

Setelah itu, spesimen kemudian memasuki tahapan dehidrasi yang dilakukan untuk menarik air dari jaringan tumbuhan agar parafin dapat masuk ke jaringan. Dehidrasi dilakukan dengan menggunakan larutan TBA (Tersier Butil Alkohol) atau disebut larutan serial Johansen (Sass,1958). Komposisi larutan serial Johansen yang digunakan tertera pada tabel 3.3. Langkah-langkah pada tahap dehidrasi dapat dilihat pada lampiran .

Tahapan selanjutnya yaitu infiltrasi yang secara umumnya bertujuan untuk menurunkan konsentrasi larutan yang digunakan pada tahapan dehidrasi dan meningkatkan konsentrasi parafin pada jaringan (Sass, 1958), sehingga parafin dapat mudah masuk ke dalam jaringan dan dapat terpotong dengan menggunakan mikrotom. Pada tahap infiltrasi, spesimen direndam pada campuran TBA dan minyak parafin dengan perbandingan 1:1 selama 1 jam. Spesimen kemudian direndam pada parafin lunak 48⁰C selama 3x2 jam, kemudian pada parafin keras 56⁰C selama 2x2 jam. Tahapan infiltrasi dengan parafin lunak dan parafin keras dilakukan dengan menggunakan oven yang suhunya telah diatur sesuai dengan titik leleh parafin tersebut.

Tabel 3.3 Komposisi Larutan Johansen (mL/100 mL)

Seri larutan	Alkohol 95%	Alkohol Absolut	TBA	Akuades
I	50	-	10	40
II	50	-	20	30
III	50	-	35	15
IV	50	-	50	-
V	-	25	75	-

Sumber: (Sass, 1958)

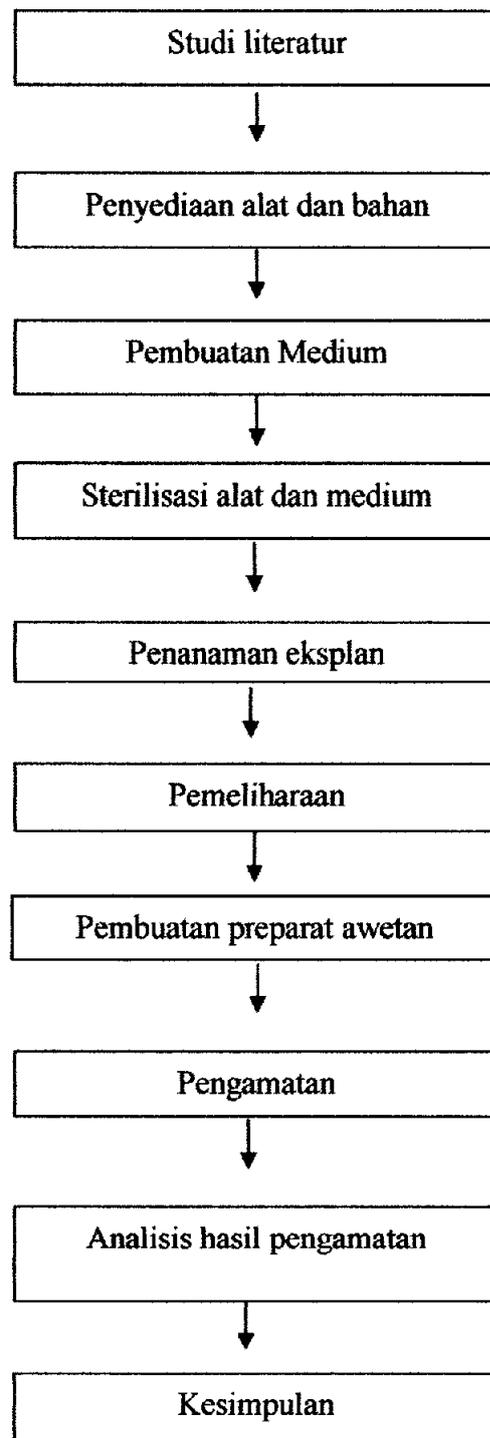
Setelah tahapan infiltrasi, spesimen kemudian ditanam pada blok parafin yang terbuat dari kertas berlilin. Tahap ini disebut *embedding* (penanaman). Parafin dalam kotak akan membeku. Sebelum penyayatan, spesimen dalam blok parafin disimpan dekat mikrotom, agar pada saat penyayatan suhu parafin mendekati suhu pisau penyayat sehingga dapat terbentuk pita yang baik.

Penyayatan dilakukan menggunakan mikrotom putar dengan ketebalan pita 10 mikrometer. Pita yang terbentuk diletakkan pada tempat yang bersih. Dalam penelitian ini, sayatan yang ditempel pada kaca objek merupakan sayatan seri. Pita parafin yang telah terbentuk diletakkan di atas kaca objek yang telah diolesi perekat Hauptz dan ditetesi akuades agar pita dapat mengembang setelah diletakkan di atas *hot plate* yang telah diatur suhunya sampai 41⁰C. Proses ini dilakukan kurang lebih selama 15 menit.

Sayatan diwarnai dengan pewarna Hemalum-Mayer's (Sass, 1958). Pewarna Hemalum dapat mewarnai sitoplasma dan inti dengan jelas. Secara umum, pewarna Hemalum memberikan warna ungu pada sel atau jaringan. Bagian inti terwarnai ungu tua atau agak kehitaman, sitoplasma terwarnai ungu muda atau kelabu, sedangkan bagian sel lainnya seperti dinding sel terkadang terwarnai

kelabu atau tidak terwarnai. Langkah dalam pewarnaan dapat dilihat pada lampiran. Objek preparat hasil pewarnaan ditetesi entelan, kemudian ditutup dengan menggunakan kaca penutup.

Setelah pembuatan preparat selesai, kemudian hasil preparat tersebut diamati dengan menggunakan mikroskop listrik. Pengukuran sel dan jaringan dilakukan dengan menggunakan mikrometer yang telah dikalibrasi. Hasil pengamatan yang berupa data anatomi eksplan dan kalus didokumentasikan dengan menggunakan kamera digital Sony DSC-S60.



Gambar 3.1 Alur Penelitian

