

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni – September 2003, bertempat di Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan (P3BPTH) Pakem, Sleman, D.I. Yogyakarta.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Cawan petri, oven, gunting, lemari pendingin, plastik parafilm, germinator, erlenmeyer, Laminar Air Flow (LAF), gelas beaker, timbangan analitik, hot plate, mikroskop, gelas ukur, counter, batang pengaduk dari gelas.

3.2.2 Bahan

Serbuk sari bunga *Morus alba* var. Kanva 2 yang baru mekar, silica gel, agar, air destilasi, sukrosa, asam borak (H_3BO_3), potassium nitrat (KNO_3), magnesium sulfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), kalsium nitrat ($Ca(NO_3) \cdot 4H_2O$).

3.3 Cara Kerja

3.3.1 Pengambilan Sampel Serbuk Sari

Bunga jantan berasal dari tanaman murbei Kanva hasil stek yang berumur 6 bulan.. Bunga yang baru mekar (berwarna keputih-putihan), dipotong pada bagian tangkai bunga.

3.3.2 Penyimpanan Serbuk Sari

Bunga yang telah dipetik dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah diberi silica gel. Setiap perlakuan lama penyimpanan masing-masing 3 cawan petri dan setiap cawan petri berisi 3 tandan bunga murbei. Cawan petri berisi bunga murbei ditutup dengan parafilm kemudian diberi label yang berisi nama tanaman, tanggal pengambilan bunga, dan perlakuan lama penyimpanan. Setelah itu cawan petri-cawan petri yang berisi bunga murbei tersebut dimasukkan ke dalam lemari pendingin dengan suhu 0° C. Bunga murbei disimpan dalam lemari pendingin dengan lama penyimpanan 1, 2, 3, 4, dan 5 hari.

3.3.3 Persiapan Media Perkecambahan

Media yang digunakan adalah media perkecambahan serbuk sari Brewbaker's (Brewbaker and Kwack, 1963 dalam Owen *et al.*, 1991). Beberapa langkah persiapan media sebagai berikut :

a. Pembuatan larutan stock Brewbaker's (untuk 100 ml)

Sebanyak 100 mg asam borak, 300 mg kalsium nitrat, 200 mg magnesium sulfat, dan 100 mg potassium nitrat dilarutkan ke dalam 100 ml air destilasi.

b. Pembuatan larutan siap pakai Brewbaker's dan 10 % sukrosa (untuk 100 ml)

10 gram sukrosa dilarutkan ke dalam 10 ml larutan stok Brewbaker's kemudian ditambahkan air hingga volumenya mencapai 100 ml.

c. Pembuatan medium agar

Ke dalam larutan siap pakai Brewbaker's dalam 10 % sukrosa ditambahkan 0,5 gram agar kemudian diaduk rata lalu dipanaskan perlahan-lahan sampai larutan mendidih. Larutan yang telah mendidih dituangkan ke dalam petridish-petridish yang telah disterilkan. Setiap petridish diisi kira-kira 3-4 ml medium. Petridish lalu ditutup dan medium agar dibiarkan mengeras. Medium agar yang telah dingin dan mengeras siap digunakan.

3.3.4 Penaburan Serbuk Sari Pada Media Perkecambahan

Penaburan dilakukan di dalam Laminar Air Flow (LAF). Untuk perlakuan lama penyimpanan 0 hari (serbuk sari yang tidak disimpan), serbuk sari dari bunga murbei yang baru diambil dapat langsung ditabur ke dalam media yang telah disimpan. Cara penaburannya adalah bunga diketuk-ketuk dengan menggunakan jarum bertangkai di atas tutup cawan petri hingga serbuk sari berjatuhan dan tersebar merata. Serbuk sari tersebut kemudian ditabur pada media dengan menutupkan tutup cawan petri yang telah berisi serbuk sari pada alas cawan petri yang berisi media agar, lalu tutup cawan petri diketuk-ketuk beberapa kali agar serbuk sari tertabur merata pada permukaan media.

Saat pengetukan tutup cawan petri, cara memegang cawan petri diusahakan miring sambil diketuk-ketuk. Hal ini dimaksudkan agar serbuk sari tersebar merata ke seluruh permukaan media dan tidak menggerombol di satu bagian saja pada permukaan media, juga dimaksudkan untuk memudahkan penghitungan serbuk sari. Setelah serbuk sari ditabur, cawan petri ditutup dengan parafilm untuk mengurangi terjadinya kontaminasi, lalu dimasukkan

ke dalam germinator dengan suhu 25° C selama 3 hari untuk mengecambahkan serbuk sari.

Untuk serbuk sari dari bunga murbei yang telah disimpan dalam lemari pendingin (selama 1, 2, 3, 4, dan 5 hari), sebelum ditabur harus diaklimatisasi terlebih dahulu untuk meningkatkan kelembabannya. Aklimatisasi dilakukan dengan cara menempatkan bunga murbei ke dalam petridish kecil kemudian ditempatkan ke dalam petridish besar yang telah berisi air kemudian ditutup selama 4 jam.

Setelah itu dilakukan penaburan serbuk sari di dalam LAF. Cara penaburannya adalah bunga diketuk-ketuk dengan menggunakan jarum bertangkai di atas tutup cawan petri hingga serbuk sari berjatuhan dan tersebar merata. Serbuk sari tersebut kemudian ditabur pada media dengan menutupkan tutup cawan petri yang telah berisi serbuk sari pada alas cawan petri yang berisi media agar, lalu tutup cawan petri diketuk-ketuk beberapa kali agar serbuk sari tertabur merata pada permukaan media. Setelah serbuk sari ditabur, cawan petri ditutup dengan parafilm untuk mengurangi terjadinya kontaminasi, lalu dimasukkan ke dalam germinator dengan suhu 25° C selama 3 hari untuk mengecambahkan serbuk sari.

3.3.5 Pengamatan

Serbuk sari yang telah dikecambahkan lalu diamati di bawah mikroskop diseksi. Setiap petridish diamati 3 daerah, dan setiap perlakuan diulang 3 kali.

Serbuk sari yang berkecambah dihitung dengan menggunakan counter untuk mengetahui persen perkecambahannya. Serbuk sari dianggap

berkecambah apabila panjang tabung serbuk sari dua kali ukuran diameter serbuk sari (Owen *et al.*, 1991).

3.4 Parameter

Parameter yang diamati adalah persen perkecambahan serbuk sari. Menurut Owen *et al.*(1991), persen perkecambahan (dalam satu bidang pandang pada mikroskop) dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\frac{\text{Jumlahserbuksariyangberkecambah}}{\text{Jumlahserbuksaritotal}} \times 100 \%$$

Hasil persen perkecambahan kemudian dikategorikan sesuai dengan kisaran sebagai berikut ;

- > 80 % : baik
- 50 % - 80 % : cukup baik
- 30 % – 50 % : kurang baik
- < 30 % : tidak baik

3.5 Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan desain penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktor, dengan 6 perlakuan dan 3 ulangan. Perlakuan tersebut yaitu :

- H0 = lama penyimpanan 0 hari (serbuk sari tidak disimpan)
- H1 = lama penyimpanan 1 hari (serbuk sari disimpan 1 hari)
- H2 = lama penyimpanan 2 hari (serbuk sari disimpan 2 hari)
- H3 = lama penyimpanan 3 hari (serbuk sari disimpan 3 hari)
- H4 = lama penyimpanan 4 hari (serbuk sari disimpan 4 hari)
- H5 = lama penyimpanan 5 hari (serbuk sari disimpan 5 hari)

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan Analisa Variansi (Anova) pada taraf signifikan 5 % untuk mengetahui ada tidaknya perlakuan yang berbeda nyata. Bila terdapat beda nyata analisis dilanjutkan dengan uji Duncan dengan taraf signifikan 5 %.