

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Tempat dan Waktu**

##### **3.1.1. Tempat**

Pengambilan sampel polen dilaksanakan di Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan (P3BPTH), Purwobinangun, Pakem, Yogyakarta. Pembuatan preparat dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika FMIPA UNDIP. Pengamatan dilaksanakan di Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Tumbuhan serta Laboratorium Ekologi dan Biosistematik FMIPA UNDIP.

##### **3.1.2. Waktu**

Penelitian berlangsung dari bulan Juli 2003 sampai dengan Juni 2004.

#### **3.2. Alat dan Bahan**

##### **3.2.1. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah botol flakon untuk tempat sampel polen; sentrifuge sebagai alat pemisah bahan dari zat yang tidak berguna; tabung vial untuk tempat larutan pada saat disentrifugasi; kompor listrik sebagai alat pemanas larutan; gelas objek dan gelas penutup untuk tempat preparat polen; mikroskop cahaya sebagai alat pengamatan morfologi polen; dan mikrometer

objek dan mikrometer okuler sebagai alat pengukur panjang aksis polar, diameter equator dan diameter porus.

### 3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel polen tanaman murbei yang terdapat di kebun koleksi P3BPTH Yogyakarta yang terdiri dari 10 jenis, yaitu:

1. Itouwase (*M. bombycis* Koidz)
2. Tsukasaguwa (*M. latifolia* Poir)
3. Amakusaguwa (*M. acidosa* Griff X *M. bombycis* Koidz)
4. Sha-lun (*M. atropurpurea* Roxb X *M. atropurpurea* Roxb)
5. Shiwasuguwa (*M. acidosa* Griff) X Itouwase (*M. bombycis* Koidz)
6. Shiwasuguwa (*M. acidosa* Griff) X Tsukasaguwa (*M. latifolia* Poir)
7. Shiwasuguwa (*M. acidosa* Griff) X Sha-Lun (*M. atropurpurea* Roxb X *M. atropurpurea* Roxb)
8. Shiwasuguwa (*M. acidosa* Griff) X Amakusaguwa (*M. acidosa* Griff X *M. bombycis* Koidz)
9. *M. multicaulis* X Itouwase (*M. bombycis* Koidz)
10. *M. cathayana* X Amakusaguwa

Dari sampel polen tersebut dibuat preparat polen. Bahan kimia yang digunakan adalah larutan asam asetat glasial 75% dan larutan asam sulfat pekat sebagai pendehidrasi polen; aquades dan alkohol sebagai pelarut bahan; dan gliserin jeli sebagai media pengamatan dalam pembuatan preparat polen.

### 3.3. Cara Kerja

#### 3.3.1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel polen pada bunga jantan tanaman murbei adalah dengan diambil tandan bunga jantan yang sudah cukup matang kemudian dimasukkan ke dalam botol flakon yang telah diisi dengan larutan asam asetat glasial.

#### 3.3.2. Preparasi Sampel Polen

Preparasi polen menurut Wetzel (1991), Faegri dan Iversen (1989) dan Soerodikoesoemo (1987) dalam Peni (1997) adalah sebagai berikut :

- Polen dimasukkan ke dalam botol yang berisi asam asetat glasial selama kurang lebih 24 jam. Asam asetat glasial ini berfungsi untuk mendehidrasi butir polen.
- Sampel polen dimasukkan ke dalam tabung vial untuk kemudian disentrifuge (500-1000 rpm) untuk memisahkan polen, setelah itu cairan dibuang dan ditambahkan campuran asam asetat glasial dan asam sulfat pekat (9 ml : 1 ml).
- Tabung tersebut dididihkan dalam waterbath selama 10 menit, lalu diturunkan suhunya selama 15 menit.
- Kemudian dilakukan sentrifuge, cairan dibuang dan diganti dengan alkohol, dilakukan sentrifuge selama 15 menit.
- Dicuci dengan aquadest 2-3 kali, diganti dengan gliserin jeli. Gliserin jeli berfungsi untuk media pengamatan dalam pembuatan preparat polen.

- Polen diletakkan pada gelas benda dan ditutup dengan gelas penutup, tepi-tepi gelas penutup ditutup dengan cat kuku bening.
- Dilakukan pengamatan dengan mikroskop kemudian dipotret.

### **3.3.3. Identifikasi Polen**

Polen diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000X untuk melihat morfologi polen, antara lain unit polen, polaritas polen, simetri polen, bentuk polen, tipe dan jumlah aperture, serta ornamentasi exine. Identifikasi polen berdasarkan kunci determinasi polen menurut Kapp (1969).

### **3.4. Parameter yang Diamati**

Sifat ciri morfologi polen yang dijadikan sebagai parameter dalam pengamatan adalah:

- Unit polen
- Polaritas polen
- Simetri polen
- Bentuk polen berdasarkan indeks P/E
- Tipe aperture
- Ornametasi exine
- Panjang aksis polar (P)
- Diameter equator (E)
- Indeks P/E
- Diameter porus

### 3.5. Analisis Data

Morfologi polen dianalisis secara deskriptif, yaitu dengan membuat deskripsi morfologi polen tiap spesies berdasarkan parameter, sehingga terlihat persamaan atau perbedaan morfologi polen. Untuk mengetahui kekerabatan beberapa tanaman murbei dilakukan perhitungan Indeks Similaritas dan Indeks Disimilaritas menurut Davis dan Heywood (1963).

$$IS = \frac{Ns}{Ns + Nd} \times 100\%$$

$$ID = 100 - IS$$

IS : indeks similaritas

ID : indeks disimilaritas

Ns : jumlah karakter yang berpasangan

Nd : jumlah karakter yang tidak berpasangan

Selanjutnya indeks similaritas ditampilkan dalam suatu matriks similaritas yang membandingkan tingkat kesamaan antara taksa satu dengan yang lain. Hasil matriks similaritas disusun sedemikian rupa sehingga taksa-taksa yang mempunyai indeks similaritas yang sama mengelompok secara berurutan. Kemudian dari pengelompokan matriks, disusun dalam suatu dendogram taksonomi (Davis dan Heywood, 1963).