

### 3. METODOLOGI

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian telah dilaksanakan di Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika Jl. Raya Tlekung No.1, Junrejo Batu. Berada di ketinggian 950 m di atas permukaan laut. Memiliki suhu rata-rata 20°C sampai 30°C, dengan rata-rata curah hujan 1.800 mm/tahun. Penelitian ini dilaksanakan selama 3 bulan mulai dari bulan September 2015 hingga Desember 2015.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain gunting kecil, cawan Petri berukuran kecil dan berukuran besar, mikroskop, pipet (makro dan mikro), gelas ukur, spatula, timbangan digital, pH meter, *stirrer*, *autoclave*, LAFC (*Low Air Flow Cabinet*), kompor gas, penjepit, magnet, lemari pendingin, plastik, label, *scalpel*, preparat, *chamber* (lemari kultur), dan thermo-hygrometer.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini dibagi berdasarkan perlakuannya:

1. Viabilitas serbuk sari
  - a. Bahan yang digunakan antara lain; *acetocarmine*, serbuk sari dari sampel bunga yang diambil dari enam tanaman, kaca preparat dan penutup kaca (*cover slip*).
  - b. Bahan *acetocarmine*: air destilasi 55 ml, glacid acetic acid 45 ml, dan 1 gram *carmine* serta aluminium foil.
2. Fertilitas serbuk sari

Bahan yang digunakan antara lain, serbuk sari dari bunga yang sudah mekar, dan media serbuk sari yang memiliki komposisi media yang berbeda-beda. Median yang diuji diantaranya P1, P2, P3, P4, P5, P6. Komposisi dari enam media terlampir pada Lampiran 1.

#### 3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan Penelitian yang digunakan terdapat dua rancangan, yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) non faktorial untuk parameter viabilitas serbuk sari dan RAL faktorial untuk parameter fertilitas serbuk sari. Masing-masing parameter diulang dengan lima kali ulangan. Viabilitas dan fertilitas serbuk sari terdiri atas 6 tanaman, diantaranya tanaman jeruk Keprok SoE digunakan sebagai

kontrol. Berikut merupakan tanaman aksesori hasil dari perbanyakan tanaman mutan SoE yang di uji antara lain; 76.3; 76.27; 86.6; 86.7; dan 86.16. dan bagan rancangan terlampir pada Lampiran 2.

### 3.4 Metode Kerja

#### 3.4.1 Viabilitas Serbuk sari

Bunga yang sudah mekar sempurna, dipilih dan diambil apabila serbuk sari dalam kondisi sudah pecah, kemudian bunga diletakkan pada cawan petri dengan ukuran diameter 5 cm, satu cawan petri kecil berisi 3 - 5 bunga. Satu tanaman diambil 10-15 bunga dan diberi label sesuai dengan identitas tanaman. Setelah itu, mahkota bunga dipisahkan beserta putiknya, yang tertinggal hanya benang sari beserta tangkai sari dan tangkai bunga. Serbuk sari yang berada di dalam kepala benang sari (*anther*) dirontokkan di atas preparat, apabila sudah rontok, maka segera ditetesi dengan larutan pewarna *acetocarmine*, lalu ditutup dengan *cover glass* dan dibiarkan hingga 1 - 2 jam agar warna dari larutan *acetocarmine* terserap oleh serbuk sari dengan baik dan terwarnai secara merata. Satu preparat dihitung satu ulangan, dan dalam satu preparat terdapat dua sub ulangan. Serbuk sari diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x dan didokumentasi pada setiap serbuk sari yang telah terwarnai secara merata, pengambilan gambar dalam proses pengamatan menggunakan teknik optik visual (bidang pandang), dimana dalam satu luasan penutup kaca (*cover slip*) diambil 16 kotak.

#### 3.4.2 Pembuatan *Acetocarmine*

Pembuatan *Acetocarmine* sebanyak 100 ml adalah langkah pertama menimbang bubuk *carmine* sebanyak 1 gram dengan menggunakan timbangan digital. Gelas ukur yang telah terisi air destilasi sebanyak 55 ml ditaruh di atas strirer digital lengkap dengan pemanas. Glacid acetic acid sebanyak 45 ml dimasukkan ke dalam gelas ukur. Ditunggu sampai cairan dalam gelas ukur panas dan beruap. Lalu, bubuk *carmine* yang sudah ditimbang tadi dimasukkan ke dalam gelas ukur sedikit demi sedikit agar tidak terjadi penggumpalan. Setelah semua bahan dimasukkan dan dipanaskan, cairan *acetocarmine* disaring menggunakan kertas whatman ke dalam gelas ukur yang baru. Tahap terakhir, gelas ukur ditutup dan dibungkus menggunakan aluminium foil sampai rapat tanpa ada celah dan

diberi label. Cairan *acetocarmine* yang sudah jadi ditaruh di dalam lemari pendingin.

#### 3.4.3 Pembuatan Media Serbuk Sari

Terdapat enam media yang diuji, yaitu berbentuk padat dan cair. Berikut merupakan langkah kerja untuk membuat media serbuk sari dalam bentuk padatan, yaitu disediakan terlebih dahulu alat dan bahan yang digunakan. Menimbang sukrosa sebanyak 100 gram dan dimasukkan ke dalam gelas beker yang sudah terisi oleh akuades sebanyak 200 mL dan diaduk menggunakan *stirrer*. Ditambahkan asam borat (*boric acid*) sebanyak 0,1 gram/L,  $\text{KNO}_3$  sebanyak 0,1 gram/L, lalu ditambahkan  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (kalsium nitrat) sebanyak 0,3 gram/L. Setelah semuanya telah tercampur, diukur pH larutan hingga 5,8. Setelah itu, ditambahkan agar sebanyak 10 gram/L. Tahap berikutnya, sterilisasi media menggunakan autoclave dengan suhu  $102^\circ\text{C}$  selama  $\pm 2$  jam.

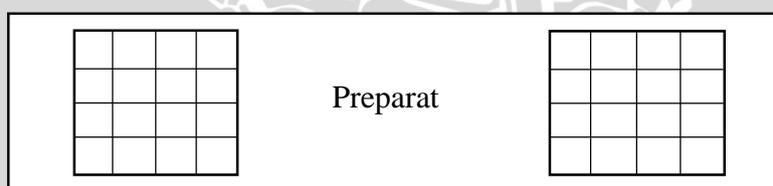
Media yang sudah disterilisasi menggunakan *autoclave* dipindahkan dan dituangkan ke dalam cawan Petri dengan ukuran diameter  $\pm 10$  cm. Proses penuangan media di dalam ruang LAFC, agar pada saat proses penuangan tidak terjadi kontaminasi. Media dituangkan setengah dari ukuran cawan Petri. Media serbuk sari sebanyak 1L, menghasilkan  $\pm 40$  cawan Petri. Cawan Petri ditutup dan dilapisi plastik *wrap*, hal ini bertujuan agar cawan Petri tertutup rapat tanpa celah, sehingga media terhindar dari bahaya kontaminan. Media serbuk sari yang sudah jadi diletakkan dan disimpan di ruang kultur dalam keadaan suhu ruang dan baru bisa dipakai 3 hari setelah pembuatan media. Pembuatan media juga berlaku media cair dengan komposisi media yang berbeda-beda, hanya saja pada media cair penambahan ditambahkan agar sebanyak 1%. Setelah 3 hari, media dipakai untuk germinasi serbuk sari.

#### 3.4.4 Fertilitas Serbuk Sari

Langkah pertama yang dilakukan pada parameter pegamatan fertilitas serbuk sari adalah bunga diambil dalam keadaan sudah mekar, kemudian diletakkan dalam cawan petri yang memiliki ukuran diameter 5 cm, sama halnya dengan metode kerja viabilitas yakni satu cawan Petri diisi dengan 3 - 5 bunga yang sudah mekar dan total bunga yang diambil dalam satu tanaman sebanyak 10 - 15 bunga. Setiap cawan Petri diberi label sesuai dengan identitas tanaman. Serbuk sari

ditaburkan diatas media yang sudah disiapkan dalam ruang LAFC, lalu ditutup dan dilapisi dengan plastik *wrap*, kemudian diletakkan dalam *chamber* dan diatur suhunya mencapai 24°C dan kelembaban 80%, selama 24 jam.

Pengamatan fertilitas serbuk sari dilakukan dengan dua cara, yaitu dikulturkan pada media padat dan media cair. Pengamatan fertilitas pada media cair menggunakan teknik "*hanging drop*". Teknik "*hanging drop*" digunakan agar dapat melihat perkecambahan tabung sari dengan menggunakan media cair. Langkah pertama yang dilakukan adalah menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan. Kaca preparat ditetesi dengan lem atau bisa diganti dengan cat kuku yang berwarna bening untuk merekatkan kaca preparat dengan penutup kaca (*cover slip*). Setelah diberi perekat, ditunggu hingga 2 - 3 menit untuk memastikan bahwa perekat tersebut kering (tidak lembek), sehingga ketika direkatkan dengan penutup kaca perekat tidak meluber dan mengenai media yang sudah bercampur dengan serbuk sari. Media cair yang berisi serbuk sari ditaruh diatas penutup kaca, lalu diberi tulisan label di atas pada kaca preparat, sesuai dengan identitas bunga yang diamati, beserta waktu dan tanggalnya. Setelah itu, sampel diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x (Gambar 2). Teknik ini mengikuti penelitian sebelumnya, yaitu penelitian yang dilakukan oleh Khan dan Perveen (2014).



Gambar 1. Pengambilan sampel pengamatan dan pembagian optik visual (bidang pandang) pada *cover slip*.

Cara pembagian bidang pandang menjadi 16 bagian dalam setiap *cover slip* bertujuan agar tidak terjadi pengambilan gambar yang sama pada saat pengamatan, sehingga memudahkan pengamatan dan perhitungan serbuk sari dan menurunkan resiko kesalahan dalam pengamatan dan juga kesalahan pada perhitungan serbuk sari.

### 3.5 Parameter Pengamatan

Berikut merupakan parameter pengamatan yang diamati pada penelitian ini, diantaranya adalah:

#### 1. Viabilitas Serbuk sari

Pengamatan viabilitas serbuk sari dilakukan dengan cara menghitung jumlah serbuk sari normal dan abnormal (cacat). Serbuk sari yang normal menunjukkan visual serbuk sari berwarna merah penuh, sedangkan serbuk sari yang abnormal berwarna kuning pucat. Berikut merupakan rumus perhitungan viabilitas serbuk sari.

$$\text{Viabilitas serbuk sari} = \frac{\text{Jumlah serbuk sari yang terwarnai}}{\text{Jumlah total serbuk sari yang diamati}} \times 100 \%$$

#### 2. Fertilitas Serbuk sari.

Pengamatan fertilitas serbuk sari dilakukan dengan cara mengamati dan menghitung jumlah serbuk sari yang berkecambah di setiap masing-masing media selama 24 jam, menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Berikut rumus perhitungan untuk menghitung perkecambahan serbuk sari.

$$\text{Fertilitas serbuk sari} = \frac{\text{Jumlah serbuk sari yang berkecambah}}{\text{Jumlah total 200 serbuk sari yang diamati}} \times 100 \%$$

#### 3. Pengamatan pertumbuhan panjang tabung sari.

Pengamatan pertumbuhan panjang tabung sari diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x pada masing-masing media. Perhitungan pertumbuhan panjang tabung menggunakan *software microscopic*, yang hasilnya nanti langsung dikalibrasi secara otomatis.

#### 4. Jumlah biji

Perhitungan jumlah biji buah jeruk dari masing-masing sample sebagai data pelengkap (data sekunder).

### 3.6 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan analisis SPSS 17.0, namun apabila terdapat hasil yang nyata pada F tabel 5 %, maka dilakukan uji lanjutan berupa uji BNT untuk uji viabilitas serbuk sari dan uji BNJ untuk uji fertilitas dan panjang tabung sari.