

# BAB 3.

## METODE PEMBUATAN PREPARAT SPORA

Spora tumbuhan paku dapat diamati dengan metode tanpa asetolisis dan metode asetolisis. Subbab berikut akan menerangkan metode pembuatan preparat spora tumbuhan paku menggunakan kedua metode tersebut, baik pengamatan menggunakan mikroskop cahaya maupun *Scanning electron microscopy* (SEM).

### 3.1. Metode Tanpa Asetolisis

Metode pengamatan spora tanpa asetolisis merupakan metode pengamatan tanpa menggunakan asam asetat untuk melisiskan substansi non sporopolenin pada permukaan spora (Eksin) (Hesse & Waha 1989). Metode ini merupakan metode sederhana, mudah dan dapat dilakukan dengan cepat. Preparat yang dihasilkan adalah preparat tidak permanen. Pada umumnya metode tanpa asetolisis dilakukan diawal pengamatan untuk mengetahui karakteristik umum dari spora yang diamati, terutama bagian eksin. Kelemahan dari metode ini adalah preparat yang tidak bisa disimpan terlalu lama dan hasil morfologi spora yang kurang jelas, terutama bagian dalam (intin) yang menunjukkan ornamentasi.

#### 3.1.1. Metode tanpa asetolisis untuk pengamatan dengan mikroskop cahaya.

Alat dan bahan dalam pembuatan preparat ini adalah sebagai berikut :

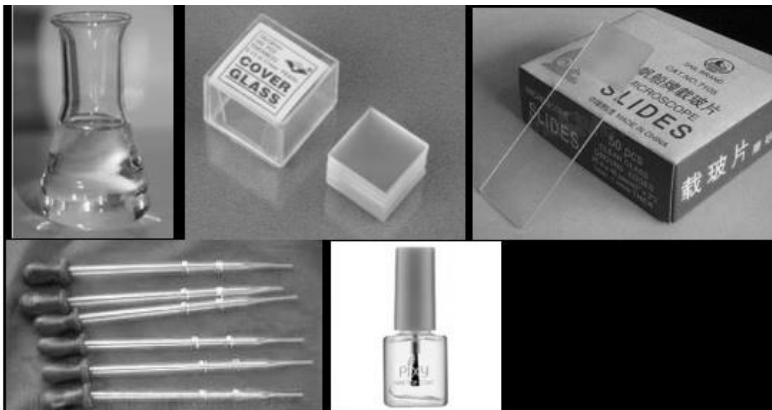
- a. Larutan Gliserin
- b. Spora yang akan diamati
- c. Gelas benda dan Gelas penutup
- d. Pipet tetes
- e. Scalpel dan jarum preparat



## f. Mikroskop

Gambar 3.1. menyajikan alat dan bahan yang digunakan. Adapun cara kerja dari pengamatan spora tanpa asetolisis adalah :

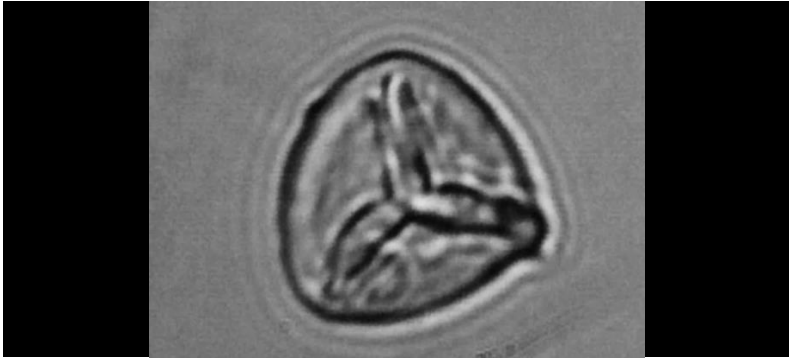
1. Spora yang akan diamatai diletakan pada gelas benda dengan menggunakan scalpel atau jarum preparat. Usahakan spora diletakan berdekatan untuk memeeudahkan pengamatan. Gunakan jarum preparat untuk memindahkan posisi spora apabila diinginkan.
2. Teteskan 1 tetes larutan gliserin pada spora. Jangan terlalu banyak meneteskan gliserin karena akan menjauhkan posisi spora sehingga akan menyulitkan waktu pengamatan
3. Tutup spora yang sudah ditetesi gliserin dengan gelas penutup
4. Olesi cat kuku bening pada tepi gelas penutup.
5. Amati di bawah mikroskop cahaya diawali dengan menggunakan perbesaran paling kecil.



Gambar 3.1. Alat dan bahan yang digunakan dalam pengamatan spora menggunakan metode tanpa asetolisis (dari kiri ke kanan : larutan gliserin, gelas penutup, gelas benda, pipet tetes, cat kuku bening) (Gambar dari berbagai sumber)



Contoh gambar spora menggunakan metode tanpa asetolisis dan diamati menggunakan mikroskop cahaya disajikan pada gambar 3.2. Pada gambar tersebut dapat dilihat bahwa spora masih diselubungi lapisan luar yang terlihat transparan.



Gambar 3.2. Morfologi spora tumbuhan paku *Drynaria* sp. yang diamati menggunakan metode tanpa asetolisis dengan mikroskop cahaya (foto Afni Atika Marpaung)

### 3.1.2. Metode tanpa asetolisis untuk pengamatan dengan Scanning Electron Microscope (SEM).

Metode tanpa asetolisis untuk pengamatan menggunakan SEM pada dasarnya sama dengan pengamatan dengan mikroskop cahaya, karena tidak adanya proses pelisisan komponen non sporopolenin pada permukaan luar spora. Namun pada pengamatan menggunakan SEM, sampel spora yang segar dapat langsung diamati tanpa *coating* maupun dapat melalui proses *coating* terlebih dahulu. Coating bertujuan "mewarnai" permukaan spora yang akan diamati sehingga akan memberikan gambaran yang lebih baik. Bahan yang biasanya digunakan dalam proses *coating* adalah serbuk emas atau paladium. Spora yang diamati tanpa *coating* biasanya tidak terlalu jelas (Sofiyanti *et al.* 2017b)

Alat dan bahan yang digunakan adalah sebagai berikut (Gambar 3.3) :

1. Sampel spora yang sudah dipisahkan dari daun
2. Serbuk emas untuk *coating*
3. Sampel holder
4. Sputter coated (mesin *coating*)
5. SEM



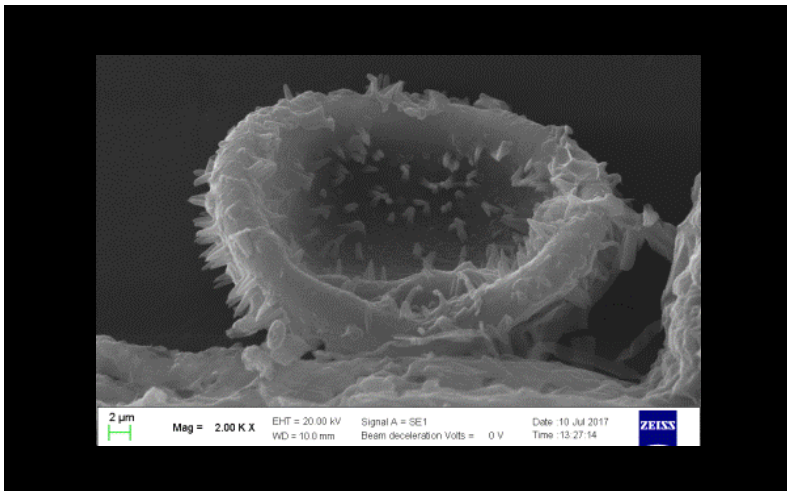
Gambar 3.3. alat dan bahan persiapan preparat spora tanpa aseptolisis untuk SEM (atas searah jarum jam : Sputter coated, serbuk emas, sample holder. Bawah : SEM) (Gambar dari berbagai sumber).



Adapun tahapan persiapannya adalah :

1. Sampel spora ditempel pada *sample holder* menggunakan *double tip*. Apabila akan menggunakan proses *coating* maka lanjutkan langkah 2, sedangkan pengamatan tanpa *coating* langsung ke langkah 3.
2. Apabila akan di *coating* maka letakan *sample holder* pada mesin Sputter Coated. Proses *coating* biasanya selama 30 menit.
3. Amati menggunakan SEM. Contoh spesimen spora paku yang diamati menggunakan SEM tanpa asetolisis tetapi menggunakan *coating* disajikan pada gambar 2.4.

(sumber : Li *et al.* 2016; Sofiyanti *et al.* 2017; Wang *et al.* 2017)



Gambar 3.4. Morfologi spora *Drynaria* sp. yang diamati dengan SEM dengan metode tanpa asetolisis dan menggunakan *coating*. Permukaan luar masih menunjukkan lapisan perispora yang beronamentasi ekinat (Foto : koleksi Nery Sofiyanti)





## 3.2. Metode Asetolisis

Menurut Jones, 2014 untuk identifikasi polen yang lebih akurat dapat menggunakan metode asetolisis. Karakteristik polen mudah dilihat dan mudah difoto. Polen dapat diletakkan pada posisi ekuatorial dan polar sehingga mudah diamati., sehingga polen mudah untuk diidentifikasi. Metode asetolisis melarutkan sebagian besar materi organik seperti protein, lemak, karbohidrat pada permukaan polen. Butir polen jadi mudah diwarnai, mudah difoto, dan sehingga mudah diidentifikasi. menggunakan jas lab. Larutan asetolisis yang berupa campuran asam sulfat dan asam asetat bersifat korosif.

Pengamatan polen/spora dapat diamati secara akurat dengan teknik dan metode pengamatan dengan menggunakan mikroskop cahaya maupun SEM (Scanning Electron Microscope) dan TEM (Transmission Electron Microscope).

### 3.2.1. Metode Asetolisis untuk pengamatan menggunakan mikroskop cahaya

Pengerjaan polen dengan metode asetolisis harus menggunakan *fume hood*, pengaman wajah, dan Menurut Hesse *et al.*, 2009 metode asetolisis merupakan kombinasi antara tahap klorinasi dan asetilasi.

Alat dan abahan yang digunakan dalam pembuatan preparat dengan metode asetlisis adalah sebagai berikut :

1. Spora yang akan diamati
2. AAG (asam Asetat Glisial)
3. HCL
4. Aquades
5. Asam sulfat
6. Safranin
7. Glycerin
8. Fenol
9. Waterbath

10. Hand centrifuge
  11. Glassware : Tabung reaksi, test tube, pengaduk
- Gambar 3.5. menyajikan alat dan bahan yang digunakan.



Gambar 3.5. Alat dan bahan yang digunakan dalam metode Asetolisis untuk pengamatan menggunakan mikroskop cahaya (dari kiri ke kanan mulai dari atas : hand centrifuge, water bath, mikroskop cahaya, AAG, HCL , etanol, safranin, gliserin) (Gambar dari berbagai sumber).



Adapun tahapan kerja adalah sebagai berikut :

## I. Tahap klorinasi

- a. Sampel spora dipisahkan dari daun menggunakan jarum preparat atau scalpel dan dimasukkan ke dalam tes tube dan dimasukkan dalam asam asetat glasial (AAG). Setelah ditambah 3 – 4 tetes HCl diaduk dengan batang gelas, dipanaskan dalam water bath selama 3 menit.
- b. Sampel kemudian disentrifus, apabila menggunakan hand centrifuge sebanyak 100x putaran, cairannya dibuang perlahan lahan, agar endapan (spora) tidak ikut terbang, Kemudian endapan dicuci dengan aquades untuk menghilangkan asam asetat

## II. Tahap asetilasi.

- a. Sampel dari tahap klorinasi dimasukkan dalam campuran asam asetat glasial dengan asam sulfat dengan perbandingan 9 dengan 1 dan dipanaskan sampai 100<sup>0</sup> C selama 4 menit
- b. Sampel disentrifus, , kemudian cairannya dibuang
- c. Endapan dicuci dengan aquades
- d. Disentrifus
- e. Aquades dibuang dan endapannya dicampur dengan gliserin jelly dan safranin 1% dalam air

Catatan :

- apabila sentrifus menggunakan hand centrifuge sebanyak 100x putaran
- saat sentrifus dapat menggunakan botol falcon medium atau test tube. Apabila menggunakan test tube / tabung reaksi maka perlu diperhatikan bahwa tabung yang digunakan adalah tabung serukuran sedang karena apabila menggunakan tabung yang panjangny mencapai 20 cm lebih maka tabung tidak boleh saling bersilang saat disentrifuge dan dapat terlempar sehingga tabung dapat pecah.
- Pembuatan gliserin jelly
  - Gelatin : 150 gram
  - Gliserin pekat : 150 gram
  - Aquades : 175 cc



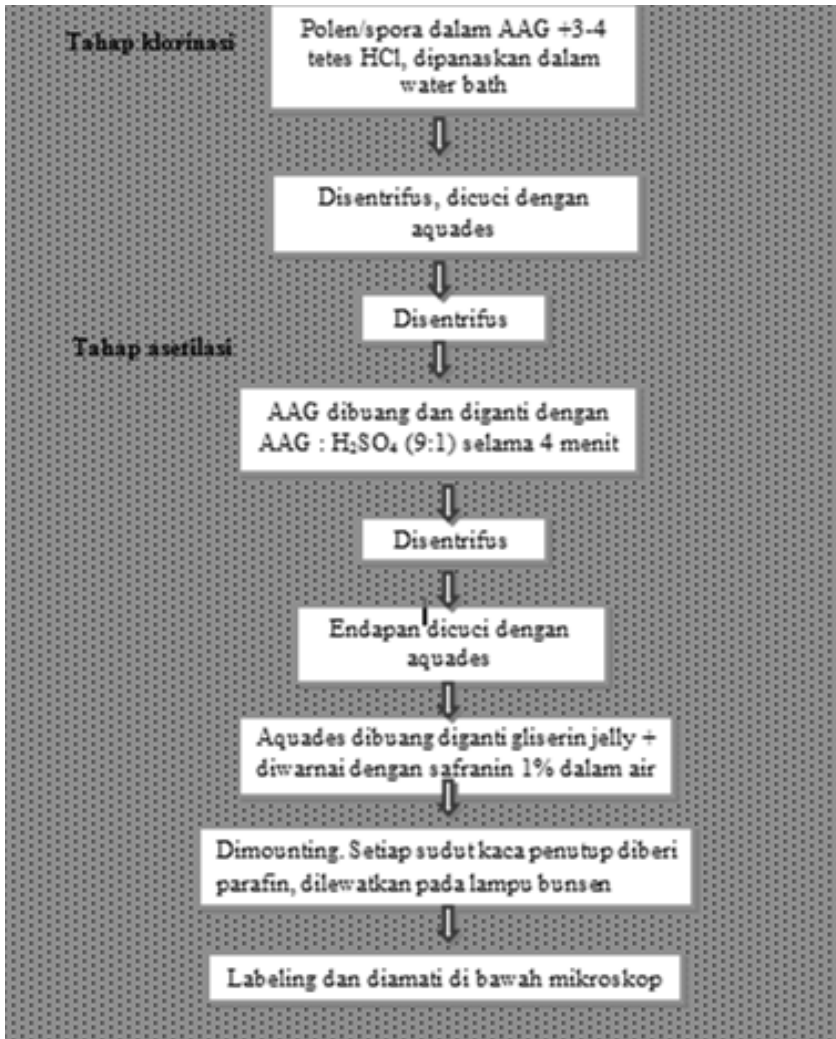


Phenol (crystal) : 7 gram  
Gelatin dilarutkan dalam air, phenol dan gliserin ditambahkan. Kemudian seluruhnya dicampur dan diaduk, serta disaring.

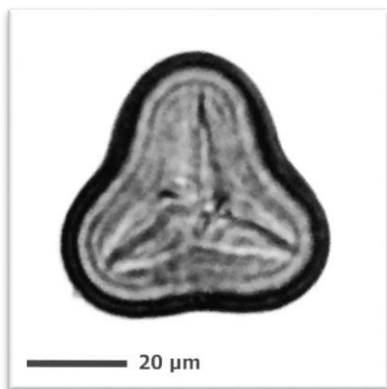
- f. Dimounting. Sampel yang sudah diberi gliserin jelly dan safranin diletakkan pada kaca obyek. Pada setiap sudut yang akan ditutup dengan kaca penutup diberi potongan parafin
- g. Kaca obyek dilewatkan pada lampu bunsen sampai parafin mencair dan kaca peutup menempel di kaca obyek
- h. Setelah kering, diberi label
- i. Diamati di bawah mikroskop

Bagan alir pembuatan preparat polen/spora dengan metode asetolisis disajikan pada gambar 3.6.

Gambar 3.7 merupakan contoh spora tumbuhan paku (*Lindsaea* sp.) dari hasil asetolisis yang diamati menggunakan mikroskop cahaya. Morfologi spora lebih bersih dan lebih jelas.



Gambar 3.6. Bagan alir pembuatan preparat dengan metode aseptolisis (Sumber : Hesse *et.al.*, 2009)



Gambar 3.7. Spora *Lindsaea* sp. hasil asetolisis yang diamati menggunakan mikroskop cahaya (Foto : Afni Atika Marpaung)

### 3.2.2. Metode asetolisis untuk pengamatan Scanning Electron Microscope (SEM)

Teknik pengamatan dengan SEM (scanning electron microscope), tidak dapat tergantikan dengan mikroskop cahaya. Banyak informasi yang diperoleh dengan menggunakan teknik ini, terutama ornamentasi polen/spora. Untuk pengamatan dengan SEM, asetolisis bukan merupakan metode optimal untuk membersihkan permukaan polen, karena sering menghancurkan detil apertura. Polen dengan dinding exin yang mudah hancur sehingga mudah rusak. Semua polen harus diamati dalam keadaan kering udara, akan menghasilkan informasi yang paling baik kira-kira pada saat polen antesis.

Menurut Halbritter (1998 *dalam* Hasse, 2009) hasil terbaik didapat dengan menggunakan 2,2-dimethoxypropane (DMP). Metode ini dapat digunakan untuk materi segar (yang dikoleksi pada saat antesis) dan untuk sampel herbarium setelah direhidrasi dalam air.

Antera segar diletakkan kedalam kantong yang dibuat dari kertas filter dan segera dimasukkan dalam 2,2-dimethoxypropane (setetes 0,2 m HCl dimasukkan dalam 30 ml DMP) setelah 20-30 menit dalam DMP (sampai 24 jam) sampel dipindahkan dalam aseton murni selama beberapa menit. Sampel polen yang sudah kering dimounting pada



stub dengan menggunakan double tape, dilapisi emas dan diamati dengan SEM

Selain metode di atas, pembuatan preparat spora menggunakan metode aseptik untuk diamati menggunakan SEM dapat juga dilakukan dengan metode berdasarkan Sofiyanti *et al.* (2015). Adapun alat dan bahan yang digunakan adalah :

- a. Glutaraldehyd 2 %
- b. Alkohol berseri (50, 60, 70, 80, 90, 100%)
- c. Aquades
- d. Sputter coated
- e. CPD (Critical Point Dryer)
- f. Serbuk Emas
- g. SEM
- h. Cawan petri

Cara kerja pembuatan preparat adalah sebagai berikut :

- a. Rendam spora dalam glutaraldehyd selama 24 jam di dalam botol flakon. Tujuan dari kegiatan ini adalah melakukan fiksasi.
- b. Masukkan dalam alkohol berseri masing masing selama 2 menit. Proses dehidrasi bertujuan mengeluarkan semua kandungan air dari dalam sampel.
- c. Buang larutan dan masukan sampel spora dalam *porous pot*.
- d. Masukkan *porous pot* dalam mesin CPD dan keringkan selama 30 menit.
- e. Keluarkan sampel dari porous pot dan susun diatas sampel holder
- f. Letakan sampel holder dalam Sputter Coated untuk proses coating
- g. Lakukan pengamatan menggunakan SEM.

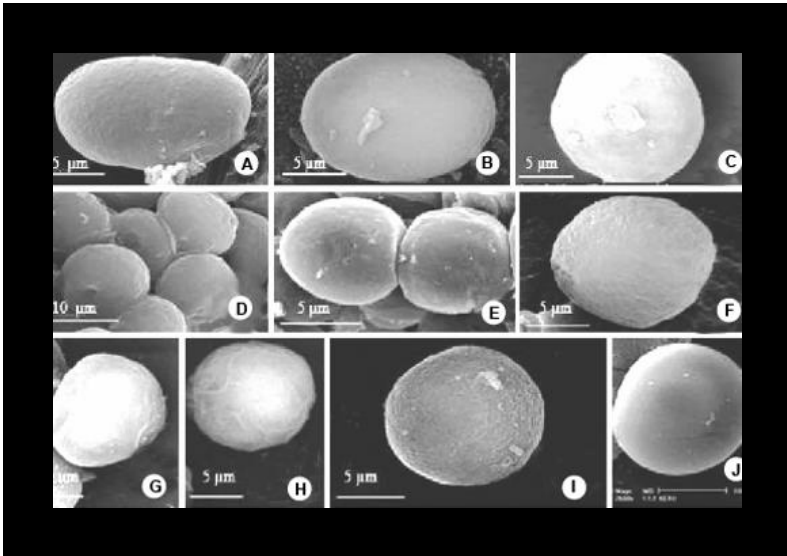


Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang  
 1. Dilarang memperjualbelikan, menyewakan, atau menggunakan karya ilmiah ini tanpa izin penciptanya.  
 2. Dilarang menggunakan atau menyebarkan materi ini dalam bentuk apapun tanpa izin Universitas Riau.  
 3. Pengutipan harus menyebutkan sumber, penulisan, penemuan, karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau ringkasan suatu masalah.  
 4. Pengutipan harus untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya tulis, di dalam bentuk apapun tanpa izin Universitas Riau.  
 5. Dilarang menggunakan atau menyebarkan materi ini dalam bentuk apapun tanpa izin Universitas Riau.



Gambar 3.8. Alat dan bahan untuk pegamatn spora menggunakan Metode asetolisis untuk pengamatan Scanning Electron Microscope (SEM). (Atas dari kiri ke kanan : Sputter coated, CPD. Tengah : SEM. Bawah dari kiri ke kanan : porous pot, glutaraldehid, etanol, serbuk emas) (Gambar dari berbagai sumber)

Gambar 3.9 Menyajikan contoh polen yang dibuat dengan metode asetolisis dan diamati menggunakan SEM. Lapisan intin tampak jelas, sedangkan eksin (perispore) sudah mengalami pelisisan sehingga tidak terlihat lagi.



Gambar 3.9. Contoh preparat polen hasil asetolisis yang diamati menggunakan SEM (Gambar : Sofiyanti *et al.* 2012).

### 3.2.3. Metode asetolisis untuk pengamatan Transmission Electron Microscope (TEM)

Pengamatan polen/spora dengan menggunakan TEM, dapat digunakan lebih dari satu protokol fiksasi dan pewarnaan. Berikut ini protokol umum yang digunakan.

1. Fiksasi. Antera dimasukkan dalam larutan 2% glutaraldehid dalam 0,1 M bufer fosfat (pH 7,4) selama 8 – 18 jam pada suhu ruang





2. Setelah dicuci dalam bufer dan air destilat, sampel difiksasi akhir dalam 2%  $\text{OsO}_4$  dengan 0.8% bufer phosphate kalium ferrosianid ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ) dengan perbandingan (2:1) selama 8 jam pada suhu  $6^\circ \text{C}$ .
3. Sampel dicuci dengan air destilat
4. Dehidrasi dengan 2,2 DMP dilanjutkan dengan aseton murni
5. Diembing dengan epoxy resin
6. Dilakukan proses pemotongan resin dengan ketebalan 80-100 nm
7. Irisan polen diwarnai dengan metode:
  - a. U+Pb (Pewarnaan Uranyl Acetate-Lead Citrate)  
 Pada beberapa spesies pewarnaan ini kurang memuaskan. Pewarnaan dilakukan dengan meletakkan kedalam larutan uranyl acetate (Leica Ultrastain-1) selama 45 menit, kemudian diikuti Pb sitrat ((Leica Ultrastain-2) selama 1 menit.
  - b. TCH+SP, PA+TCH+SP (Pewarnaan Thiocarbohidrazide-Silver Proteinate (Tch+Sp) dan Pewarnaan periodic acid-Thiocarbohidrazide silver Proteinate  
 Endexin merupakan lapisan dinding polen yang sering salah tafsir. Penggunaan teknik pewarnaan TEM (uranil asetat dan P sitrat), ektaksin dan endexin mudah dibedakan. Endexin densitas elektronnya lebih tinggi daripada ektaksin. Pada beberapa spesies, endexin tipis dan kurang kompak atau diskontinu, perbedaan dua lapisan ini tidak jelas. Endexin dapat dibedakan dari ektaksin dan intin dengan pewarnaan thiocarbohidrazide-silver proteinate (TCH+SP) dimana sampel difiksasi dalam osmium. Atau dengan pewarnaan periodic acid-thiocarbohidrazide-silver proteinate (PA+TCH+SP) dimana sampel difiksasi tanpa osmium. Endexin akan pekat terwarnai setelah pewarnaan dengan TCH+SP, ini menunjukkan senyawa lipid, dan setelah diwarnai dengan PA+TCH+SP menjadi tembus pandang, kecuali bagian intin, karena intin bereaksi positif dengan polisakarida.  
 Karakter morfologi endexin, ketebalannya bertambah mendekati aperture.



- Pewarnaan PA+TCH+SP (lokalisasi netral polisakarida). Irisan polen dengan ketebalan 80-100 nm dari sampel yang difiksasi tanpa osmium ditempatkan pada grid emas dan dimasukkan dalam 1% PA selama 45 menit, 0,2% TCH selama 8-15 jam dan 1% SP selama 30 menit.
- Pewarnaan TCH+SP (deteksi lipid tidak jenuh). Irisan polen dengan ketebalan 80-100 nm dari sampel yang difiksasi dengan osmium ditempatkan pada grid emas dan dimasukkan dalam 0,2% TCH selama 8-15 jam dan 1% SP selama 30 menit
- c. PA+TCH+SP (short)

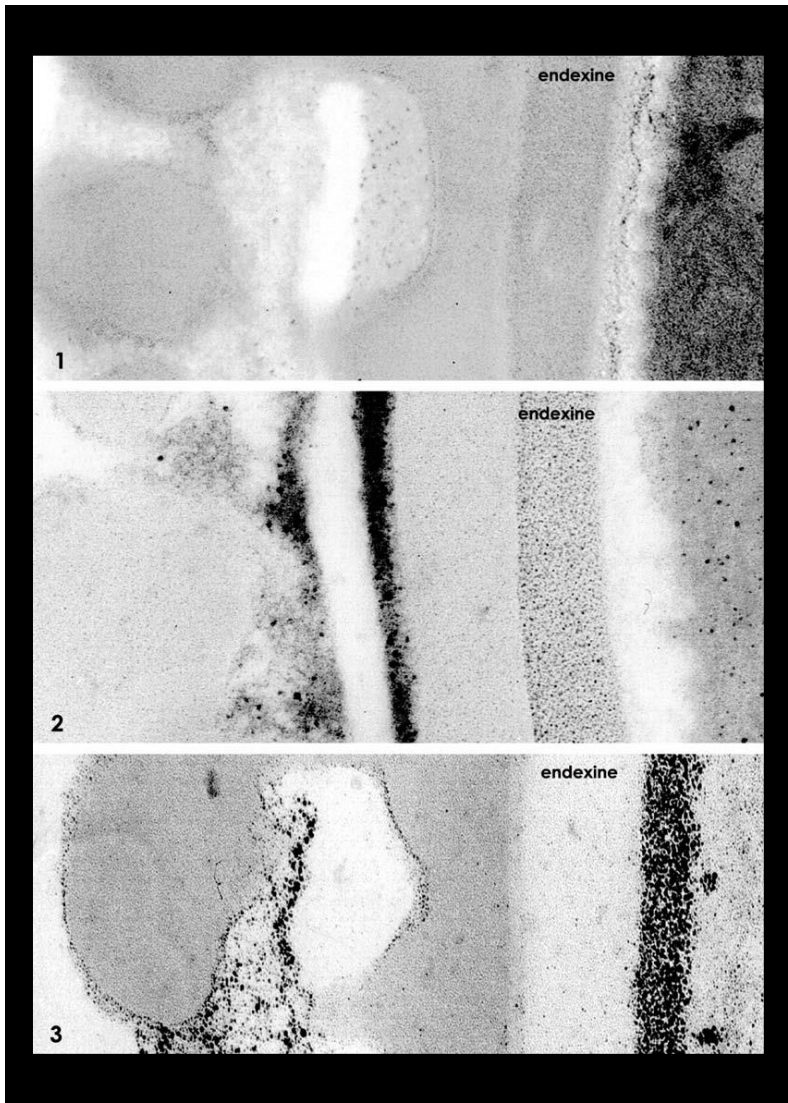
Uji Thiery yang dimodifikasi.

Metode ini efektif terutama setelah sampel difiksasi dengan osmium dan potassium ferrocyanide. Etode ini bagus untuk peningkatan kontras antara sitoplasma dan dinding polen.

Irisan polen dengan ketebalan 80-100 nm dikumpulkan pada grid emas dan diwarnai dengan 1% periodic acid (PA) selama 10 menit, 0.2 % thiocarbohydrazide (TCH) selama 15 menit, dan 1% silver proteinate (SP) selama 10 menit. Semua tahapan pengerjaan dilakukan pada suhu kamar. Setelah tahap pewarnaan dengan Pa dan SP, irisan polen secara intensif dicuci dengan air destilat; stelah pewarnaan dengan TCH,dicuci dengan asam asetat dilanjutkan dengan air destilat.

Hasil perwarnaan dinding polen dengan tiga jenis perwarnaan disajikan pada gambar 3.10





Gambar 3.10. Irisan polen dengan dengan pewarnaan: 1. U+Pb, 2. TCH+SP, 3. PA+ TCH+SP (Hesse *et al.* 2009)