

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

1. Penelitian di Lapangan

Penelitian di lapangan telah dilakukan pada bulan Juli 2013. Penelitian dilakukan pada dua lokasi yaitu; di Desa Negara Ratu Kecamatan Natar dan Taman Kupu-Kupu Gita Persada, Desa Sumber Agung, Kecamatan Kemiling.

2. Penelitian di Laboratorium

Analisis pollen dan kandungan protein pollen baik sampel dari lapangan maupun sampel yang didapat pada kotak sarang lebah madu (*Apis cerana*) dilakukan pada bulan Agustus 2013 - Januari 2014 di Laboratorium Botani Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah buku catatan, alat tulis, kamera digital untuk dokumentasi, mikroskop untuk mengamati sampel pollen, mikrometer untuk mengukur pollen, alat perlindungan tubuh dari sengatan lebah, sentrifus untuk menghomogenkan sampel, tabung reaksi untuk wadah sampel, *water bath* digunakan untuk penangas, batang gelas, kaca objek, spektrofotometer

untuk mengukur kadar kandungan protein pollen, gelas ukur, kertas saring, timbangan neraca untuk menimbang pollen, corong gelas, dan lain-lain.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pollen yang dikoleksi dari bunga di sekitar lokasi kotak sarang dan pollen dari kotak sarang lebah madu (*A. cerana*), asam asetat glasial, alkohol absolut, akuades, asam sulfat pekat, *gliserin jelly* (gelatin 15 g, akuades 17,5 ml, gliserin pekat 15 ml, penol 0,7 g), dan safranin 1% untuk pewarnaan proses *Acetolysis*.

C. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif, yang dilakukan dalam tiga tahap, yaitu: Tahap I persiapan koloni lebah madu (*A. cerana*) serta pengambilan sampel pollen dari bunga mekar di lapangan dan pada kotak sarang lebah, Tahap II analisis pollen menggunakan metode *Acetolysis*, dan Tahap III analisis kandungan protein pollen menggunakan metode Biuret dengan Uji T ($\alpha = 0,05$). Berikut tahap-tahap penelitian yang dilakukan:

1. Tahap I

1.1 Persiapan koloni lebah madu (*A. cerana*)

Koloni *A. cerana* yang digunakan dalam penelitian berasal dari peternakan lebah madu Binaan Apiari Pramuka Kwartir Lampung. Koloni *A. cerana* berada di dalam kotak dengan ukuran 20x20x40 cm dan 25x25x50 cm. Tiga koloni *A. cerana* diletakkan di sekitar perkebunan warga Desa Negara Ratu pada 3 titik penempatan yang berbeda dengan minimal jarak antara 1 kotak

dengan kotak yang lain 10 m. Mewakili lokasi yang tidak kaya akan sumber pakan lebah madu.

Tiga koloni *A. cerana* di Taman Kupu-Kupu Gita Persada (mewakili lokasi yang sudah diperkaya oleh pakan lebah madu) pada lokasi berbeda dengan jarak sekitar 10 m antar kotak sarang. Setiap koloni diletakkan dekat dengan tanaman sumber pakan lebah madu (*A. cerana*).

1.2 Sampel pollen bunga tanaman dan pollen dari kotak sarang

Pengambilan sampel pollen dari bunga mekar dikoleksi pada radius 700 m dari kotak sarang dengan menggunakan metode survei. Pollen langsung diambil dari bunga mekar yang berada pada radius yang telah ditentukan dipakai untuk identifikasi pollen yang terdapat pada kotak sarang. Sampel pollen bunga mekar yang didapat dari Desa Negara Ratu berjumlah 18 jenis pollen bunga tanaman, sedangkan di Taman Kupu-Kupu Gita Persada didapat 11 jenis pollen bunga mekar yang empat diantaranya ada jenis pollen bunga mekar yang sama di Desa Negara Ratu. Pollen yang diambil pada kotak sarang pada kedua lokasi diambil dari 10 pot pollen pada setiap kotak sarang.

2. Tahap II

2.1 Pengamatan struktur morfologi pollen dari bunga mekar dan analisis pollen pada kotak sarang dengan metode *Acetolysis*

Pengamatan struktur morfologi pollen bunga mekar serta analisis sampel pollen pada kotak sarang menggunakan metode *Acetolysis* secara deskriptif.

Pengamatan struktur morfologi pollen bunga mekar menggunakan mikroskop

compound (1 Skala = 2,5 μm , perbesaran 400x) dan diukur diamatarnya, diambil foto untuk digunakan sebagai acuan identifikasi jenis-jenis pollen yang berasal dari kotak sarang. Kemudian masing-masing kotak sarang diambil 10 pot pollen untuk dianalisis jenis-jenis pollennya. Setelah itu menghitung persentase jenis-jenis pollen yang telah didapat.

Perhitungan kalibrasi mikrometer, diameter pollen, dan persentase pollen menggunakan rumus berikut;

$$1 \text{ Skala Okuler} = \frac{\text{skala objektif yang berhimpit}}{\text{skala okuler yang berhimpit}}$$

$$1 \text{ Skala Okuler} = 0,01 \times \frac{1}{4}$$

$$= 0,0025 \text{ mm}$$

$$= 25 \mu\text{m}$$

$$\text{Diameter pollen} = \text{skala} \times 2,5 \mu\text{m}$$

$$\text{Persentase pollen (\%)} = \frac{\text{Jumlah Pollen Setiap Jenis}}{\text{Total Keseluruhan Pollen}} \times 100 \%$$

3. Tahap III

3.1 Analisis kandungan protein pollen dengan metode biuret

Sampel pollen diambil pada kotak sarang lebah madu dari kedua lokasi penelitian. Pada masing-masing lokasi diambil 10 pot pollen setiap kotak sarang lebah madu (dengan jumlah seluruhnya 60 pot pollen). Kemudian, setiap pot pollen ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi, setelah itu diberi larutan Biuret sebanyak 30 ml setiap pot

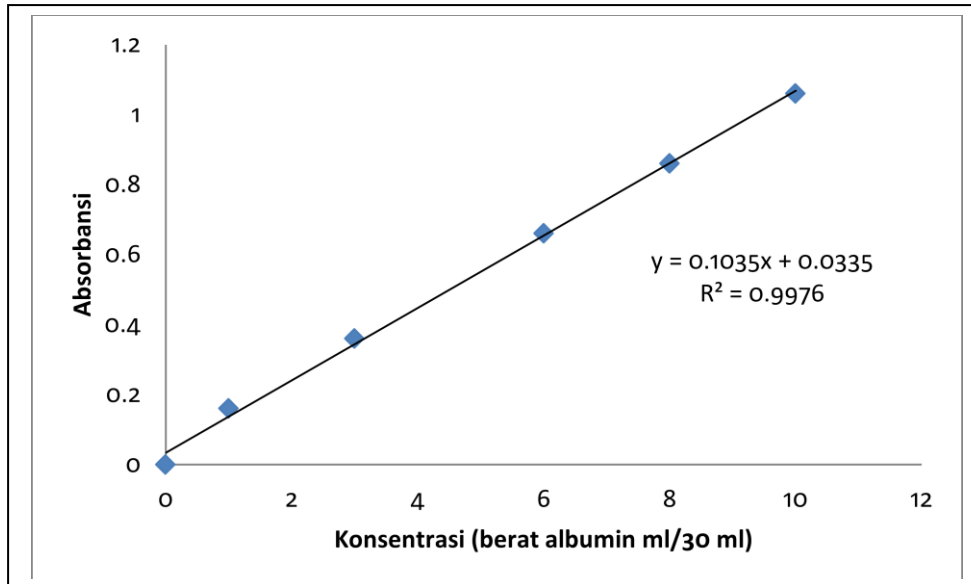
pollennya, selanjutnya sambil diaduk, amati perubahan warnanya.

Pengukuran nilai absorbansi protein pollen diukur dengan menggunakan spektrofotometer (λ 540 nm).

Metode Biuret adalah suatu metode yang digunakan untuk menganalisis protein secara kuantitatif yang memanfaatkan reaksi biuret dengan mengidentifikasi ikatan peptida yang terdapat pada protein pollen. Ikatan peptida adalah ikatan yang terjadi antara satu molekul asam amino dengan asam amino lainnya.

Prinsip reaksi biuret adalah reaksi antara tembaga sulfat dalam alkali dengan senyawa yang berisi dua atau lebih ikatan peptida seperti protein yang memberikan warna ungu biru yang khas. Warna biru yang dihasilkan menunjukkan reaksi positif adanya protein. Reaksi ini masih bersifat kuantitatif. Reaksi Biuret ini bersifat spesifik, artinya hanya senyawa-senyawa yang mengandung ikatan peptida saja yang akan bereaksi dengan pereaksi Biuret. Warna dalam reaksi reagen akan berubah menjadi violet dengan kehadiran dari protein dan berubah menjadi biru ketika dikombinasikan dengan rantai pendek polipeptida, sehingga warna akhir yang ditunjukkan adalah biru keunguan. Sampel dimasukkan ke dalam spektrofotometer dan didapat nilai kandungan absorbansi protein pollen tersebut dihubungkan dengan persamaan garis kurva standar albumin ($y = 0,103x + 0,033$, $R^2 = 0,997$) menghasilkan nilai kandungan protein pollen (mg protein/mg pollen). Persamaan garis kurva standar albumin dilihat pada

Gambar 3 sebagai acuan perhitungan nilai kandungan protein pollen dan rumus perhitungan nilai kandungan protein dapat dilihat sebagai berikut;



Gambar 3. Persamaan garis kurva standar albumin

$$y = 0,103x + 0,033, \text{ dan } R^2 = 0,997$$

$$0,421 = 0,103x + 0,033$$

$$0,127 = 0,103x$$

$$x = \frac{0,127}{0,103}, x = 3,767 \text{ mg protein/100 mg pollen}$$

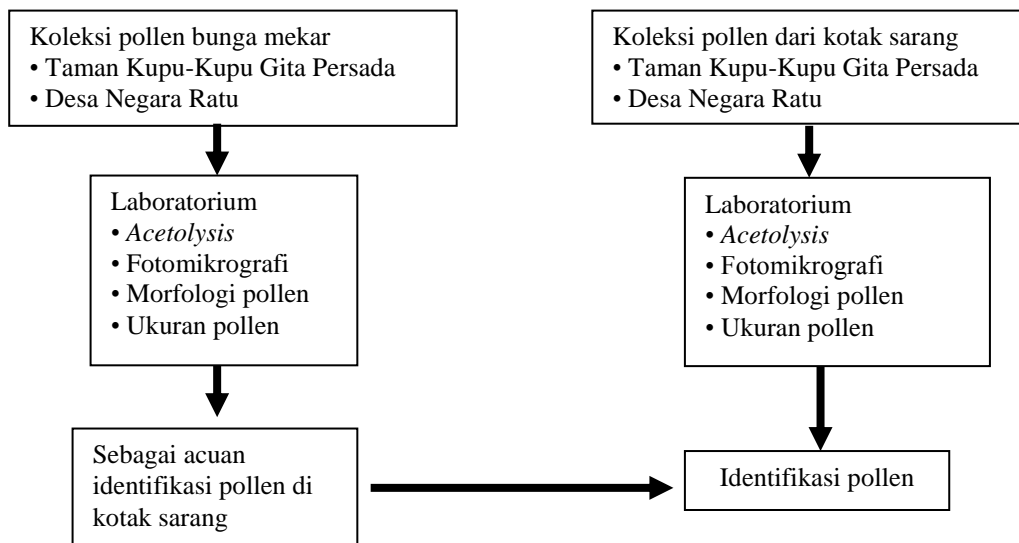
Keterangan : y = nilai absorbansi pollen dan x = Nilai kandungan protein pollen

D. Analisis Data

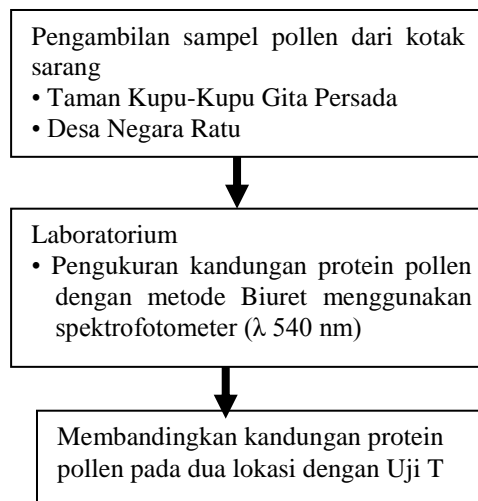
Data analisis pollen yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan jenis, ukuran, dan bentuk pollen yang dikunjungi lebah madu (*A. cerana*) pada kedua lokasi penelitian. Pollen yang diambil dari kotak sarang pada kedua lokasi dibandingkan kandungan proteinnya dengan uji T ($\alpha = 0,05$).

E. Diagram Alir Penelitian

Diagram alir penelitian analisis pollen dapat dilihat pada Gambar 4 dan diagram alir analisis kandungan protein pollen pada dua lokasi yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 5 berikut;



Gambar 4. Diagram alir analisis pollen



Gambar 5. Diagram alir analisis kandungan protein pollen dari kotak sarang pada dua lokasi yang berbeda