

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Percobaan

Penelitian ini termasuk dalam penelitian eksperimental yang menggunakan metode deskriptif kualitatif dan kuantitatif. Perlakuan yang digunakan yaitu perbedaan pemberian konsentrasi ion logam Cu^{2+} pada media subkultur kalus purwoceng (*Pimpinella alpine* Molk.) yaitu 0, 20, 30, dan 40 μM .

Perlakuan konsentrasi ion logam Cu yang di gunakan terdiri dari 4 taraf:

E0 = kontrol (0 mg)

E1 = Cu 0 μM

E2 = Cu 20 μM

E3 = Cu 30 μM

E4 = Cu 40 μM

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Plant Physiology and culture jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan April 2012 sampai November 2012.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat-alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas ukur, Erlenmeyer, cawan petri, batang pengaduk, botol kultur, alat-alat seksi (scalpel, pinset, gunting), LAF (Laminar air flow), timbangan analitik, pipet, alat sterilisasi (autoklaf, lampu spiritus, dan penyemprot alkohol), pH meter, lemari pendingin, rak kultur, thermometer, lampu fluorescence, lux meter, kertas label, plastic, karet, hot plate, kertas tissue, aluminium foil, alat kromatografi kolom (lampiran 8).

3.3.2 Bahan-bahan

Bahan penelitian meliputi eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kalus dari tanaman Purwoceng (*Pimpinella alpine* Molck.) yang diinduksi pada media 2,4-D. Bahan untuk sterilisasi adalah detergen cair, alkohol 70%, Clorox 5,25%, dan aquades steril. Media MS (Murashige & Skoog), ZPT berupa 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid) dengan konsentrasi 6 mg/l dan ion logam Cu^{2+} dengan konsentrasi yaitu 0, 20, 30, dan 40 μM (lampiran 8).

3.4 Langkah Kerja

3.4.1 Sterilisasi alat

1. Alat-alat *dissecting* set (scalpel, pinset, gunting), alat-alat gelas dan logam dicuci dengan detergen dan dibilas dengan air bersih beberapa kali kemudian kering anginkan

2. Kemudian alat set (scalpel, pinset, gunting) disterilisasikan dengan alkohol 90% dan dibakar dengan nyala api spiritus setiap kali akan digunakan di LAF
3. Alat-alat gelas ditutup aluminium foil, sedangkan alat-alat logam dan cawan petri dibungkus dengan kertas, kemudian disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 20 menit.

3.4.2 Pembuatan Media

Pembuatan media induksi kalus sebanyak 1 liter dilakukan dengan mengisikan stok mikronutrien dan makronutrien MS 4,43 gr/lt kedalam beaker glass beserta zat pengatur tumbuhnya berupa 2,4-D dengan konsentrasi 6 mg/L dan gula 30gr kemudian ditambah dengan aquades.

Keasaman media diatur pada pH5,8 dengan menggunakan pH meter, jika pH kurang dari 5,8 maka ditambahkan larutan NaOH 0,1 N dan jika pH lebih dari 5,8 maka media ditambahkan HCl 0,1 N. Pada medium tersebut ditambahkan agar 8 gr. Selanjutnya medium dipanaskan sampai mendidih dan diaduk, kemudian diangkat. Kemudian medium diisikan ke dalam botol kultur sebanyak 20ml. Setiap botol ditutup dengan plastik dan diikat dengan menggunakan karet.

Pembuatan media sub kultur untuk menginduksi metabolit sekunder dengan menggunakan ion logam Cu^{2+} dengan konsentrasi yaitu 0, 20, 30, dan 40 μM yang disubstitusikan dalam media induksi kalus.

3.4.3 Sterilisasi Media

Media dalam setiap botol kultur disterilisasi dengan cara autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

3.4.4 Sterilisasi Ruang Tanam

Laminar air flow disemprot dengan alkohol 70% terlebih dahulu. Kemudian alat-alat yang dimasukkan ke dalam LAF juga harus disemprot dengan alkohol 70% dahulu. Selanjutnya ruang tanam disterilisasi dengan sinar UV selama 1 jam sebelum LAF digunakan, ketika LAF digunakan maka sinar UV harus dimatikan. Saat LAF digunakan maka blower dihidupkan.

3.4.5 Tahap Induksi Kalus

1) Sterilisasi eksplan

Daun yang berasal dari tunas aksilar purwoceng pada tanaman induk dicuci dengan detergen di bawah aliran air selama 30 menit. Eksplan direndam dalam larutan bayclean 10% atau clorox 10% selama 30 menit, aquades steril 3 kali masing-masing 3 menit.

2) Penanaman eksplan

Eksplan yang sudah disterilisasikan ditanam dalam media MS dengan penambahan ZPT 2,4-D 6 mg/l dan diinkubasi selama 4 minggu. Penanaman dilakukan secara aseptik dalam LAF (*Laminar air flow*).

3) Tahap pemeliharaan

Botol-botol yang telah terisi eksplan diletakkan dalam rak kultur dan disemprot dengan Alkohol 70% setiap 3 hari sekali.

3.4.6 Tahap Subkultur

Kalus yang telah diinduksi selama 4 minggu kemudian di sub kultur pada media induksi metabolit sekunder yang telah ditambah dengan elisitor Cu dan diinkubasi selama 4 minggu. Kalus yang digunakan didapatkan dari induksi kalus pada media 6 mg/l yang telah diinduksi pada penelitian pendahuluan. Berikut langkah-langkahnya:

- a. Eksplan yang berkalus ditimbang dan dibagi pada masing-masing botol dengan berat yang sama yaitu 0,1g sebagai berat awal kalus
- b. Kalus dipotong kemudian ditanam pada media yang telah di tambah dengan ion logam Cu^{2+}
- c. Botol kultur ditutup dengan plastik wrap dan ditutup dengan plastik penutup serta di ikat dengan karet

3.4.7 Tahap pengamatan

Pengamatan dilakukan dengan 3 tahap:

- 1) Pengamatan dilakukan dua minggu untuk mengetahui perubahan warna kalus, dan tekstur kalus.
- 2) pengamatan dilakukan pada akhir minggu ke-4 tahap subkultur untuk mengetahui berat akhir kalus

- 3) Pengamatan juga dilakukan pada minggu ke-4 tahap sub kultur untuk diuji metabolit sekunder untuk mengetahui kadar stigmasterol dan sitosterol pada kalus purwoceng.

Parameter pengamatan:

- 1) Pengamatan warna kalus dan tekstur kalus yang dilakukan setiap dua minggu sekali dengan diamati perubahan warna dan tekstur yang terjadi pada setiap kalusnya.
- 2) Pengamatan kontaminasi dengan mengamati secara langsung yang terjadi pada media dan eksplan yang dapat diakibatkan oleh mikroorganisme.
- 3) Pengamatan berat kalus dilakukan secara destruktif setelah induksi kalus selama 4 minggu untuk mengetahui berat awal kalus dan pada minggu keempat tahap subkultur untuk mengetahui berat akhir kalus kemudian.
- 4) Tekstur kalus dapat diamati secara visual terhadap penampakan kalus yaitu dengan melihat kalus yang remah/riabel, kalus kompak, dan transparansi kalus baik pada tahap induksi kalus dan pada tahap induksi metabolit sekunder.
- 5) Pengamatan kandungan metabolit sekunder dengan menggunakan metode kromatografi kolom.

3.4.8 Tahap uji Fitokimia (Metabolit sekunder)

Pengujian senyawa fitokimia hasil metaboli sekunder dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi kolom. Kromatografi kolom merupakan alat yang digunakan untuk fraksinasi dan juga pemurnian suatu senyawa. Prinsip dari kromatografi kolom adalah pemisahan zat berdasarkan mekanisme adsorpsi, pembagian ion, pertukaran ion, afinitas dan perbedaan ukuran molekul. Sebagian adsorpsi, dapat dipergunakan alumina, silika gel, karbon adsorben, Mg Silikat Mg karbonat, pati, selulosa dan sebagainya. Sebagai eluennya misalnya air, metanol, etanol, aseton, dan sebagainya. Secara adsorpsi partikel padat dalam cairan akan cenderung mengabsorpsi atom, ion atau molekul pada permukaannya.

1) Alat-alat

bejana elusi, vakum, pipa kapiler

2) Bahan

KOH p.a. (Lachema, CR), n-hexane untuk analisis bagan, metanol p.a. ISO, diethyl eter GR ACS (semua dari MERCK), ethanol untuk UV spectroscopy, isopropyl alcohol p.a. (semua dari Lachema, CR), silica gel untuk column chromatography SILPEARL kapasitas serapan 61% H₂O, pH 6–7, ukuran partikel 25 µm (Sklárny Kavalier, CR), hexamethyl disilazan (HMDS) purum >98%, trimethyl chlorsilan (TMCS) puriss. >99%, pyridine purum >99 % (semua dari Fluka).

3) Cara kerja

Langkah-langkah yang harus dilakukan dalam pengujian fitokimia hasil metabolit sekunder ini adalah:

1. 0,2 g kalus diekstrak dengan menggunakan methanol untuk membentuk fraksi methan, kemudian diekstrak kembali menggunakan n-hexane untuk memperoleh fraksi hexane.
2. Dimasukkan hasil ekstraksi ke dalam kolom yang berisi silica gel, 61% H₂O, pH 6–7, ukuran partikel 25 µm (Sklárny Kavalier, CR), hexamethyl disilazan (HMDS) purum >98%, trimethyl chlorsilan (TMCS) puriss. >99%, pyridine purum >99 %.
3. Untuk menganalisis antara stigmasterol dan sitosterol, maka hasil ditunggu sesuai dengan standar waktu yang telah ditentukan.
4. Cairan yang telah ditampung ditambahkan dengan standard kemudian diabsorbansi menggunakan spektrofotometri.
5. Hasil dianalisis

3.5 Analisis Data

Data pengamatan berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif berupa pengamatan secara visual meliputi morfologi kalus, sedangkan data kuantitatif berupa berat kalus, kadar sitosterol dan stigmasterol. Data dianalisis dengan menggunakan analisis secara diskriptif untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian ion logam Cu²⁺ terhadap kandungan stigmasterol dan sitosterol pada kalus purwoceng secara in vitro.