BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan menggunakan dua faktor. Faktor pertama adalah, jenis eksplan (E) yang terdiri dari 2 taraf perlakuan. Faktor kedua adalah konsentrasi 2,4-D (*2,4-Dichlorophenoxyacetic acid*) (K) yang terdiri dari 4 taraf perlakuan. Perlakuan dalam penelitian ini adalah hasil kombinasi antar faktor dari seluruh taraf perlakuan. Dengan demikian, dalam penelitian ini terdapat 2 X 4 kombinasi atau 8 kombinasi dengan 3 kali ulangan. Dengan demikian dalam penelitian secara keseluruhan terdapat 24 kombinasi perlakuan per-unit percobaan.

Faktor I adalah jenis eksplan (E) yang terdiri dari 2 taraf:

E1 = eksplan daun muda

E2 = eksplan tangkai daun (petiol)

Faktor II adalah konsentrasi 2,4-D (K) yang terdiri dari 3 taraf:

K0 = kontrol (0 mg 2,4-D)

K2 = 2,4-D dengan konsentrasi 2 mg/L

K4 = 2,4-D dengan konsentrasi 4 mg/L

K6 = 2,4-D dengan konsentrasi 6 mg/L

Tabel 3.1 Kombinasi perlakuan antara jenis eksplan dan konsentrasi 2,4-D:

Jenis Eksplan	Konsentrasi			
	K0	K2	K4	K6
E1	E1K0	E1K2	E1K4	E1K6
E2	E2K0	E2K2	E2K4	E2K6

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan April – Oktober 2012. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Plant Physiology and Culture, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Kimia Analisis Universitas Muhammadiyah Malang.

3.3 Alat dan Bahan

Alat alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi, gelas beaker, gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri steril, lampu spiritus, alat-alat dissecting set (gagang scalpel dan pisau scalpel steril, gunting, pinset steril (berbagai ukuran), Laminar Air Flow (LAF), neraca analitik, pH meter, hand sprayer, autoclave, hot plate stirer, pengaduk dari gelas, magnetik stirrer, sarung tangan, botol kultur, lemari pendingin, rak kultur, thermometer, lampu neon, lux meter, kertas label, karet, plastik, kertas tissue, aluminium foil, waterbath, bejana elusi, vakum, dan pipa kapiler, alat pemotret.

Bahan-bahan yang digunakan dalam kultur jaringan purwoceng adalah: eksplant daun muda dan tangkai daun (petiol) yang diperoleh dari Ranu Pani, Lumajang, Jawa Timur. Bahan untuk sterilisasi yaitu detergen, clorox 10 % dan baycline, alkohol 70%, spiritus dan aquades stereril. Media MS (Murashige & skoog), agar swallow, 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid), HCl, KOH. Bahan untuk uji metabolit sekunder KOH p.a., n-hexan, metanol p.a. ISO, diethyl eter GR ACS, ethanol untuk UV spectroscopy, isopropyl alcohol p.a, silica gel untuk colom chromatography SILPEARL kapasitas serapan 61% H₂O, pH 6–7,

ukuran partikel 25 μm , hexamethyl disilazan (HMDS) purum >98%, trimethyl chlorsilan (TMCS) puriss. >99%, pyridine purum >99 % (Lampiran 19).

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Sterilisasi Alat

1. Alat-alat *dissecting set* (scalpel, pinset, gunting), alat-alat dari gelas dan logam dicuci dengan detergen dan dibilas dengan air bersih beberapa kali kemudian dikering anginkan (Lampiran 2).
2. Kemudian alat-alat *dissectingset* (pinset, gunting, scalpel) disterilisasi dengan alcohol 96% dan dibakar dengan nyala api spirtus setiap kali akan digunakan di LAF.

3.4.2 Pembuatan Media

Pembuatan media induksi kalus sebanyak 1 liter, dilakukan dengan melarutkan MS 4,43 gram ke dalam beker glass beserta zat pengatur tumbuh 2,4,D (0 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L dan 6 mg/L) dan 30 gram sukrosa. Sebanyak 500 ml aquades ditambahkan kemudian diaduk hingga homogen dan ditambah hingga 1 liter.

Tingkat keasaman diatur pada pH 5,8 dengan menggunakan pH meter, jika pH kurang dari 5,8 maka ditambah dengan NaOH 1 N dan jika pH lebih dari 5,8 maka media ditambah larutan HCl 1 N. Pada medium tersebut ditambahkan agar 8 gram (tidak dibuat stok). Selanjutnya medium tersebut dimasak hingga hampir mendidih dan media diisikan ke dalam botol kultur sebanyak 20 ml, setiap botol

ditutup dengan plastik dan diikat menggunakan karet. Skema kerja dapat dilihat pada (Lampiran 3).

a. Sterilisasi Media

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

b. Sterilisasi Ruang Tanam

Laminar Air Flow disemprot dengan alkohol 70% terlebih dahulu. Kemudian alat-alat yang dimasukkan kedalam LAF juga harus disemprot dengan alkohol 70% terlebih dahulu. Selanjutnya ruangan di UV selama 1 jam sebelum LAF digunakan, ketika LAF digunakan sinar UV harus dimatikan dan blower dihidupkan.

3.4.3 Tahap Penanaman

1) Sterilisasi Eksplan di Luar LAF

Daun muda dan tangkai daun (petiol) purwoceng dari tanaman induk dicuci dengan detergen di bawah aliran air selama 30 menit. Eksplan direndam dalam larutan fungisida 3 % selama 1 jam.

2) Sterilisasi Eksplan dalam LAF

Eksplan dibawa ke dalam LAF kemudian direndam dalam larutan baycline 10%, 20% dan 30% masing-masing selama 10-15 menit, dibilas dengan aquades steril 3 kali masing-masing selama 3 menit kemudian ditanam.

3) Penanaman Eksplan

Eksplan daun muda (daun pertama) yang sudah steril dipotong dengan ukuran $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ dengan berat (0,04 g) dan tangkai dipotong dengan $\pm 1-1,5\text{ cm}$ dengan berat (0,02 g) kemudian ditanam pada media MS yang sudah berisi beberapa konsentrasi 2,4-D dan diinkubasi selama 8 minggu. Untuk kontrol ditanam pada media MS tanpa 2,4-D dan diinkubasi selama 8 minggu. Penanaman dilakukan secara aseptik dalam *laminar air flow cabinet*.

4) Tahapan Pemeliharaan

Botol-botol yang telah berisi eksplan diletakkan dalam rak kultur dan disemprot dengan alkohol 70% tiap 3 hari sekali.

3.4.4 Tahapan Pengamatan

Pengamatan kontaminasi dan hari muncul kalus dilakukan setiap hari. Pengamatan morfologi meliputi warna dan tekstur kalus dilakukan setiap 2 minggu sekali, sedangkan pengamatan berat kalus dan kadar metabolit sekunder stigmasterol dan sitosterol dilakukan pada akhir pengamatan yaitu minggu ke-8.

a. Pengamatan setiap hari

Pengamatan pembentukan kalus dan kontaminasi dilakukan setiap hari.

1. Pengamatan dilakukan setiap hari yaitu saat muncul kalus pertama kali yang dinyatakan dalam HST (hari setelah tanam) yang

ditandai dengan membengkaknya eksplan dan munculnya bintik-bintik putih.

2. Pengamatan kontaminasi dilakukan dengan mengamati secara langsung dengan melihat ciri-ciri umum koloni mikroorganisme yang terbentuk.

b. Pengamatan setiap 2 minggu

Pengamatan tekstur, dan warna kalus dilakukan setiap dua minggu sekali.

1. Tekstur kalus diamati secara visual terhadap penampakan kalus. Tekstur kalus yang diamati yaitu kalus yang remah (*friable*), kalus kompak dan intermediet.
2. Warna kalus dilihat dengan mengamati warna yang terbentuk dan diamati perubahannya pada 2 minggu berikutnya.

c. Pengamatan 8 minggu

Pengamatan persentase pembentukan kalus dan kandungan metabolit sekunder dilakukan pada akhir pengamatan (minggu kedelapan).

1. Kegiatan penimbangan berat basah kalus dilakukan dengan menggunakan timbangan analitik. Berat kalus diamati secara destruktif.

Berat kalus total/botol = Berat kalus akhir - Berat eksplan yang ditanam

$$\text{Berat kalus} = \frac{\text{Berat Kalus Tiap botol}}{\text{sub ulangan yang muncul kalus}}$$

2. Presentase eksplan berkalus dihitung dari banyaknya eksplan yang membentuk kalus dibandingkan dengan total eksplan yang ditanam.

$$\% \text{ Eksplan berkalus} = \frac{\text{eksplan berkalus}}{\text{Total eksplan yang ditanam}} \times 100\%$$

3. Kandungan stigmasterol dan sitosterol dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi kolom. Kromatografi kolom digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa dalam jumlah yang banyak berdasarkan adsorpsi dan partisi. Kemasan adsorben yang sering digunakan adalah silika gel G-60, kieselgur, Al₂O₃, dan Diaion.

3.4.5 Tahapan Pengujian Stigmasterol dan Sitosterol

Senyawa yang diuji dari hasil kalus tanaman Purwoceng yaitu stigmasterol dan sitosterol. Metode yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. 0,1 g kalus diekstrak dengan menggunakan methanol untuk membentuk fraksi methan, kemudian diekstrak kembali menggunakan n-hexane untuk memperoleh fraksi hexane.
2. Dimasukkan hasil ekstraksi (fase eter) sebanyak 10 ml ke dalam kolom yang berisi silika 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 diambil sebanyak 50 μ l ditambahkan aquades sampai 1000 μ l kemudian diabsorbansi menggunakan spektrofotometri.
5. Hasil dianalisis sesuai dengan standard yang telah ditentukan.

3.5 Analisis Data

Data pengamatan berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif (warna kalus dan tekstur kalus) disajikan secara diskriptif. Data parameter kuantitatif persentase eksplan yang membentuk kalus disajikan dalam bentuk persentase. Untuk data kuantitatif berupa hari muncul kalus, persentase muncul kalus, berat kalus dan metabolit sekunder (stigmasterol dan sitosterol) dilakukan *analysis of variant* (ANOVA) sehingga diketahui pengaruh antar perlakuan, bila ada perbedaan nyata dilanjutkan uji DMRT pada taraf 5% untuk mengetahui jenis eksplan dan konsentrasi terbaik.