

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial yang terdiri dari 2 faktor. Faktor yang pertama yaitu macam konsentrasi ZPT 2,4-D (konsentrasi 0,25 gr/L, 0,5 gr/L dan 1 gr/L) dan faktor kedua yaitu varietas kedelai (Detam, Willis, Tanggamus dan Anjasmoro) untuk membedakan kandungan isoflavon berdasarkan warna dan ukuran biji.

#### **3.2 Tempat dan Waktu**

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium penelitian *Genetic and plant culture* Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang, pada bulan Juni-Juli 2011.

#### **3.3 Variabel Penelitian**

Pada penelitian ini terdapat 3 variabel, yaitu: variabel bebas, variabel terikat, dan variabel terkontrol.

### 3.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ZPT 2,4-D dengan konsentrasi yang berbeda (0,25 mg/L, 0,5 mg/L dan 1 mg/L) serta Varietas kedelai yang berbeda yaitu: Detam, Anjasmoro, Tidar dan Wilis.

### 3.3.2 Variabel Terikat

Variable terikat dalam penelitian merupakan variable yang dapat diukur yaitu: pertumbuhan kalus, warna kalus dan produksi senyawa isoflavon kalus kedelai.

### 3.3.3 Variabel Terkendali

Variable terkendali pada penelitian ini adalah adalah suhu, cahaya, medium MS, dan pH.

## 3.4 Alat dan Bahan Penelitian

### 3.4.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: gelas piala, gelas ukur, elenmeyer, cawan petri, batang pengaduk, botol kultur, alat-alat diseksi (scalpel, pinset, gunting) “*Laminair Air Flow Cabinet*”, timbangan analitik, pipet, alat sterilisasi (autoclaf, lampu spiritus, dan penyemprot alcohol (*hand sprayer*)), pH meter, lemari pendingin, rak kultur, alat pemotret, thermometer, lampu flouresence, lux meter, kertas label, plastic, karet, hot plate, kertas tissue, korek api, aluminium foil, waterbath, dan bejana elusi.

### **3.4.2 Bahan**

Larutan stok makronutrien medium MS, larutan stok mikronutrien medium MS, larutan stok sumber besi, larutan stok zat pengatur tumbuh 2,4-D (0,25 gr/L, 0,5 gr/L dan 1 gr/L), aquades, agar, larutan stok mikronutrien (sukrosa, vitamin, asam amino), bahan sterilisasi (alkohol 70%, spiritus, tepol, detergen sunlight, dan sunclin 10%), bahan buffer pH (NaOH 0,1 N dan HCl 0,1 N) dan bahan eksplan: biji kedelai yang diperoleh dari koleksi Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian (Balitkabi) Malang.

## **3.5 Prosedur Kerja**

### **3.5.1 Sterilisasi Alat**

Alat-alat dissecting set (scalpel, pinset, gunting) dan alat-alat dari gelas atau logam dicuci dengan detergen dan dibilas dengan air bersih beberapa kali kemudian dikering anginkan. Kemudian alat-alat dissecting set (pinset, gunting, scalpel) disterilisasi dengan alkohol 90% dan dibakar dengan nyala api spiritus setiap kali akan digunakan di LAF. Lalu Alat-alat gelas ditutup aluminium foil, sedangkan alat-alat logam dan cawan petri dibungkus dengan kertas, kemudian disterilkan dalam autoklaf dengan suhu  $121^{\circ}$  C selama 20 menit.

### 3.5.2 Pembuatan Media

Pembuatan media perkecambahan dilakukan dengan cara melarutkan agar batang sebanyak 8,5 gram dengan aquades hingga mencapai volume 1 liter kedalam elenmeyer. Larutan agar dipanaskan di atas hot plate hingga mendidih sambil dilarutkan dengan *sterrer*. Larutan mendidih dituangkan kedalam botol kultur. Pembuatan media induksi dilakukan dengan mengisikan media MS jadi kedalam elenmeyer sebanyak 500 ml aquades ditambahkan. Keasaman media diatur pada pH 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 larutan HCl 0,1 N. Pada medium tersebut ditambahkan agar 8 g (tidak dibuat stok). Selanjutnya medium dipanaskan sampai mendidih dan diaduk, kemudian diangkat. Kemudian medium diisikan kedalam botol kultur sebanyak 20 ml. Setiap botol ditutup dengan plastik dan diikat menggunakan karet.

### 3.5.3 Sterilisasi Media

Media dalam setiap botol kultur disterilisasi dengan cara di autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

### 3.5.4 Sterilisasi Ruang Tanam

Laminair Air Flow disemprot dengan alkohol 70% terlebih dahulu. Kemudian Alat-alat yang dimasukkan ke dalam LAF juga harus disemprot dengan alkohol 70% terlebih 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.

### **3.5.5 Persiapan dan Sterilisasi Eksplan**

Sterilisasi tahap I meliputi biji diambil, kemudian dicuci dengan detergen dan dibilas dengan air mengalir. Setelah itu biji direndam dalam Clorox 20% selama 20 menit kemudian dibilas 3 kali dengan aquades. Selanjutnya biji direndam lagi dengan Clorox 15% selama 15 menit dan dibilas 3 kali dengan aquades. Sterilisasi tahap II dilakukan setelah sterilisasi tahap I, meliputi biji tersebut direndam dengan Clorox 20% selama 1 menit. Kemudian dilakukan pencucian 3 kali dengan aquades steril.

### **3.5.6 Penanaman dan Pemeliharaan Eksplan**

#### **3.5.6.1 Penanaman Biji**

Eksplan biji yang telah steril sebelum ditanam diletakkan dalam petridish steril yang telah dilapisi kertas tissue atau kertas serap steril untuk menyerap aquades. Kemudian eksplan ditanam dalam media agar kosong dan eksplan yang telah ditanam dalam botol kultur diatur pada rak-rak kultur. Pada ruangan penyimpanan eksplan diberi penyinaran dengan lampu fluorescen 40 Watt dengan intensitas 1.000 Lux. Lalu eksplan diinkubasi dalam ruang kultur pada suhu 28<sup>0</sup>C dan kelembaban ruang 70% sampai muncul terjadi perkecambahan dan kotiledon muncul.

### **3.5.6.2 Inisiasi Kalus**

Kotiledon diambil dari benih yang telah dikecambahkan pada media kosong. Kotiledon dipotong bagian pinggir terlebih dahulu menggunakan scalpel di atas cawan petri. Kotiledon ditanam pada media dengan bagian adaksial berada pada bagian bawah atau menempel pada media. masing-masing botol diisi 1 kotiledon. Selanjutnya kotiledon di inkubasi dalam ruang kultur pada suhu 25<sup>0</sup>C dengan pencahayaan 36 watt dan kelembaban ruang 70% selama 2 minggu.

### **3.5.7 Pengamatan Kualitatif**

#### **3.5.7.1 Pengamatan Warna Kalus**

Warna kalus di amati mulai hari pertama sampai hari ke 28, dengan ketentuan warna kalus meliputi warna hijau, putih dan coklat.

#### **3.5.7.2 Tekstur Kalus**

Tekstur kalus di amati mulai hari pertama sampai hari ke 28, dengan ketentuan kalus berbentuk remah (*friable*), intermediet dan kompak (*non friable*).

### **3.5.8 Pengamatan berat Basah Kalus**

Berat basah kalus (g), di timbang menggunakan timbangan analitik untuk menentukan berat basah kalus sebelum melakukan pengamatan isoflavon.

### **3.5.9 Pengamatan Kuantitatif Analisis Kandungan Isoflavonoid kedelai**

#### **3.5.9.1 Pemisahan Dengan Kromatografi Lapis Kolom (KLK)**

Sampel dimaserasi dengan etanol yang berisi 0,1% asam asetat selama 24 jam, lalu saring dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan ditambahkan dengan enzim  $\beta$ -glucanase/ $\beta$ -xylanase. Kemudian disentrifuge pada kecepatan 13500 rpm selama 10 menit pada suhu 10 C. Ambil 10 ml supernatan kemudian dimasukkan dalam kolom kromatografi yang berisi alumina dan Na sulfat. Kemudian ditambah dengan 2 ml asetonitril yang didalamnya berisi asam asetat 0,1 % sebagai fase gerak. Tampung eluat yang didapat kemudian dilarutkan dengan asetonitril. Amati absorbansi pada panjang gelombang 365 nm. Sebagai standar penentuan kadar isoflavon, digunakan standar genistein dengan kisaran konsentrasi 0 – 0,01 mg/ml.

#### **3.5.10 Analisis Data**

Data dianalisis dengan menggunakan uji ANAVA (*Analisis Variasi*) bila terdapat perbedaan yang signifikan, uji lanjut dilanjutkan dengan uji Duncan pada selang kepercayaan 5%.