

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini termasuk penelitian eskperimental yang menggunakan Rancangan acak lengkap (RAL) faktorial dengan 2 faktor yaitu:

1. Faktor pertama: konsentrasi ZPT 2,4 D yang terdiri dari 3 taraf perlakuan yaitu (0,25 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L).
2. Faktor kedua varietas dan galur kedelai yang berbeda yaitu galur kedelai (K/IAC 100-1039, IAC 100 K/1061, K/IAC 100-1030) dan varietas Grobogan sebagai pembanding.

#### **3.2 Variabel Penelitian**

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

##### **3.2.1 Variabel bebas**

Variable bebas pada penelitian ini adalah ZPT 2,4 D dengan konsentrasi yang berbeda serta genotipe kedelai yang berbeda yaitu: IAC-100/K-1061, K/IAC-100/1039, K/IAC-100/1030, dan varietas Grobongan.

##### **3.2.2 Variabel terikat**

Variabel terikat dalam penelitian merupakan variabel yang dapat diukur yaitu: warna kalus, tekstur kalus, berat kalus dan produksi senyawa isoflavon kalus kedelai.

### 3.2.3 Variabel terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah ZPT 2,4 D, suhu, cahaya, medium MS, pH.

### 3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli 2011 hingga September 2011 di laboratorium *Genetic and Plant Tissue Culture* Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang.

### 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, bejana elusi, vakum, pipa kapiler.

#### 3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: medium MS jadi, hormon 2,4-D, aquades steril, agar, bahan sterilisasi yaitu

alkohol 70%, spiritus, teepol, detergen sunlight, dan suclin 10%. Bahan buffer PH: NaOH 0,1 N dan HCl 0,1 N. bahan eksplan: biji kedelai yang diperoleh dari Balai Penelitian Kacang-kacangan dan Umbi-umbian (Balitkabi) Malang, kotiledon kedelai yang diperoleh dari kecambah yang ditumbuhkan secara *in vitro*. Bahan ekstraksi: 1 ml methanol 80%, HCL 2 ml, Etil asetat, aquades, methanol 0,25 ml, eluen (toluen: dietil eter: asam asetat).

### **3.5 Prosedur Kerja**

#### **3.5.1 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 dan kemudian dikeringkan.
2. Kemudian alat-alat *dissecting set* (scalpel, pinset, gunting) disterilisasi dengan alcohol 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 autoclave dengan suhu 121° 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 sebanyak 30 ml.

Pembuatan media induksi dilakukan dengan mengisikan media MS jadi kedalam elenmeyer ditambahkan aquades sampai mencapai volume 1 liter. 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 dan ditambahkan zat pengatur tumbuh 2,4-D dengan tiga konsentrasi yang berbeda (0,5 mg/L, 0,5 mg/L, 0,5 mg/L) pada media. 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 autoclaf pada suhu 121° C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

### **3.5.4 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% terlebih dahulu. Selanjutnya ruang tanam disterilisasi dengan sinar UV selama 1 jam sebelum LAF digunakan, ketika LAF digunakan maka sinar UV harus dimatikan kemudian blower dihidupkan.

### 3.5.5 Sterilisasi dan Perkecambahan Biji

Perkecambahan diawali dengan sterilisasi biji kedelai (IAC-100/K-1061, K/IAC-100/1039, K/IAC-100/1030, dan varietas Grobongan.), yaitu meliputi : biji diambil, kemudian dicuci dengan detergen dan dibilas dengan air mengalir. Kemudian 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. Kemudian biji tersebut direndam dengan Clorox 20% selama 1 menit. Kemudian dilakukan pencucian 3 kali dengan aquades steril. Biji kedelai yang sudah steril ditanam dalam media perkecambahan selama 7 hari. Kotiledon hasil perkecambahan dipergunakan sebagai eksplan untuk induksi kalus.

### 3.5.6 Inisiasi dan Pemeliharaan Eksplan

Sebelum ditanam, eksplan kotiledon hasil perkecambahan kedelai yang telah steril diletakkan dalam *petridish* steril yang telah dilapisi kertas tissue/kertas serap steril untuk menyerap aquades. Kemudian dipotong-potong di atas petridish dengan ukuran 0,5 cm dan ditanam dalam media induksi kalus. Eksplan yang telah ditanam dalam botol kultur diatur pada rak-rak kultur. Selanjutnya eksplan diinkubasi dalam ruang kultur pada suhu 28°C selama 3 minggu.

### 3.5.7 Pengamatan Morfologi Kalus

Pengamatan morfologi kalus dilakukan hari ke 21 setelah tanam, untuk warna dan struktur kalus diamati pada awal mulai muncul kalus sampai 14 hari setelah tanam. Pengamatan berat kalus dilakukan dengan cara mengukur berat

akhir kalus pada 21 setelah tanam yaitu dengan cara menimbang berat masing-masing kalus.

### **3.5.8 Analisis Kandungan Senyawa Isoflavon Kalus Kedelai**

Analisis kandungan senyawa isoflavon dilakukan dengan menggunakan metode Kromatografi lapis kolom (KLC) di Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang.

### **3.6 Analisis Data**

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