

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Mei – Juli 2014.

3.2 Rancangan penelitian

Penelitian ini termasuk dalam penelitian eksperimental yang menggunakan metode RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan 4 perlakuan dan 4 ulangan. Perlakuan yang digunakan yaitu perbedaan pemberian konsentrasi ion logam Cu^{2+} pada media subkultur kalus Pegagan (*Centella asiatica* L.Urban) yaitu 0, 30, 35 dan 40 μM .

Perlakuan konsentrasi ion Cu^{2+} yang digunakan terdiri dari 4 taraf :

Cu0 = kontrol (0 μM)

Cu1 = 30 μM

Cu2 = 35 μM

Cu3 = 40 μM

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 diseksi (scalpel, pinset, gunting), LAF (*Laminar Air Flow*), timbangan analitik, pipet, autoklaf, lampu bunsen, penyemprot alkohol, pH meter, lemari pendingin, rak kultur, AC (*Air Conditioner*), lampu fluorescence, oven, kertas label, plastik, karet, *hot plate and magnetic stirrer*, kertas tisu, aluminium foil, alat wrap plastik, rak kultur, kertas label dan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

3.3.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan adalah bagian daun muda nomor 1,2 dan 3 dari tanaman pegagan (*Centella asiatica* L.Urban) sebagai eksplan yang ditanam pada media. Subkultur kalus pegagan (*Centella asiatica* L.Urban) hasil kombinasi dari 2,4-D 1mg/l dan air kelapa 10%. Bahan untuk sterilisasi adalah detergen, aquades, fungisida, alkohol 70%, alkohol 90%, desinfektan, aquades steril dan betadin. Bahan media yang digunakan adalah media MS (Murashige & Skog), agar-agar, ZPT dan gula. ZPT yang digunakan yaitu 2,4-D dikombinasikan dengan air kelapa, ion Cu^{2+} 0, 30, 35 dan 40 μM .

3.4 Langkah Kerja

3.4.1 Sterilisasi Alat

Adapun langkah kerja dalam sterilisasi alat adalah :

1. Alat-alat diseksi (scalpel, pinset, gunting), alat-alat gelas dan botol kultur dicuci dengan detergen cair dan dibilas dengan air bersih.
2. Direndam alat-alat diseksi, alat-alat gelas dan botol kultur yang telah bersih didalam tipol selama 1 x 24 jam.
3. Kemudian dibilas alat-alat diseksi, alat-alat gelas dan botol kultur dengan air bersih.
4. Dikering anginkan alat-alat diseksi, alat-alat gelas dan botol kultur dengan oven selama 2 jam dengan suhu 120°C.
5. Alat-alat diseksi dibungkus dengan alumunium foil lalu dimasukkan dalam plastik sedangkan alat-alat gelas ditutup dengan plastik, kemudian disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 20 menit

3.4.2 Pembuatan Media

3.4.2.1 Pembuatan Media Induksi kalus

Adapun langkah kerja dalam pembuatan media induksi kalus sebanyak 1 liter dilakukan dengan cara:

1. Media MS ditimbang sebanyak 4,43 gr, gula sebanyak 30 gr dan agar-agar 7 gr.
2. Bahan-bahan seperti media MS, gula dan ZPT dimasukkan pada 1 liter aquades lalu dihomogenkan dengan *stirer* diatas *hot plate*

3. Setelah homogen, diukur pH sebesar 5,8 dengan pH meter, jika pH kurang dari 5,8 maka ditambahkan larutan NaOH 0,1 N dan jika pH lebih dari 5,8 maka ditambahkan HCl 0,1 N.
4. Kemudian ditambahkan agar- agar 7 gr
5. Setelah itu, dipanaskan dan diaduk hingga mendidih kemudian diangkat.
6. Media diisikan kedalam 60 botol kultur masing-masing sebanyak 20 ml.
7. Kemudian botol kultur yang berisi media ditutup dengan plastik dan diikat karet.

3.4.2.2 Pembuatan Media Subkultur

Pembuatan media subkultur untuk menginduksi metabolit sekunder dengan menggunakan Cu^{2+} dengan konsentrasi yaitu 0, 30, 35 dan 40 μM yang disubstitusikan dalam media induksi kalus.

3.4.3 Sterilisasi Media

Media dalam botol kultur disterilkan dengan cara dimasukkan kedalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

3.4.4. Sterilisasi Ruang Tanam

Adapun langkah kerja dalam sterilisasi ruang tanam adalah :

- a. Lantai pada ruang inisiasi dipel dengan karbol yang telah dicampur dengan air.
- b. Setelah itu, lantai dipel dengan karbol murni
- c. Kapas diberi formalin kemudian diletakkan di pojok – pojok ruangan

- d. Meja LAF (*Laminar Air Flow*) dibersihkan dengan alkohol 70% kemudian dinyalakan sinar UV selama 1 x 24 jam
- e. Setelah 1 x 24 jam, dimatikan sinar UV dan sebelum melakukan inisiasi dibersihkan lagi meja LAF (*Laminar Air Flow*) dengan alkohol 70%.

3.4.5 Tahap Induksi Kalus

3.4.5.1 Sterilisasi eksplan

Daun muda pegagan (*Centella asiatica* L.Urban) diambil dan dicuci dengan deterjen dan dikocok kemudian dibilas dengan air mengalir sampai bersih, dibilas lagi dengan aquades. Daun muda yang telah bersih direndam dalam fungisida 300mg/L selama 60 menit. Sterilisasi selanjutnya dilakukan di LAF (*Laminar Air Flow*) dengan cara : eksplan direndam dengan Chlorox 1.56%, 1.04%, dan 0.52% masing-masing selama 10 menit, lalu dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali, dan terakhir direndam pada larutan betadine selama 1 menit.

3.4.5.2 Penanaman eksplan

Eksplan yang telah disterilisasi dipotong 0.5cm x 0,5 cm hingga 1cm x 1cm kemudian ditanam pada media MS dengan penambahan ZPT 2,4-D kombinasi air kelapa dan diinkubasi selama 4 minggu. Penanaman dilakukan secara aseptik dalam LAF (*Laminar Air Flow*).

3.4.5.2 Tahap pemeliharaan

Botol–botol kultur yang telah terisi eksplan diletakkan dalam rak kultur dan disemprot dengan alkohol 70% setiap 3 hari sekali. Suhu ruang yang digunakan adalah $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dengan lama pencahayaan 16 jam/hari dengan lampu *flouresence*.

3.4.6 Tahap Subkultur

Kalus yang telah diinduksi selama 4 minggu kemudian di subkultur pada media induksi metabolit sekunder yang telah ditambah dengan elisitor Cu^{2+} dan diinkubasi selama 4 minggu. Kalus yang digunakan didapatkan dari induksi kalus pada media kombinasi 2,4-D 1 mg/l dan air kelapa 10% 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 0,1 g sebagai berat awal kalus
- b. Kalus dipotong kemudian ditanam pada media yang telah ditambah dengan Cu^{2+}
- c. Botol kultur ditutup dengan plastik *wrap* dan ditutup dengan plastik penutup serta diikat dengan karet

3.4.7 Tahap Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada minggu keempat tahap subkultur untuk di uji metabolit sekunder untuk mengetahui kadar asiatikosida dan madekasosida pada kalus pegagan.

Parameter pengamatan :

1. Pengamatan warna kalus dan tekstur kalus yang dilakukan setiap dua minggu sekali dengan diamati perubahan warna dan tekstur yang terjadi setiap kalusnya.
2. Pengamatan kontaminasi dengan mengamati secara langsung yang terjadi pada media dan eksplan yang 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.
4. Tekstur kalus dapat diamati secara visual terhadap penampakan kalus yaitu dengan melihat kalus yang remah atau *friable*, kalus kompak, dan transparansi kalus baik pada tahap induksi kalus dan pada tahap induksi metabolit sekunder.
5. Pengamatan kandungan metabolit sekunder dengan menggunakan HPLC

3.4.8 Tahap Uji Fitokimia (Metabolit sekunder)

Pengujian senyawa fitokimia hasil metabolit sekunder dilakukan dengan menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau yang sering disebut dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Adapun langkah-langkah uji HPLC sebagai berikut :

- a. Sampel diambil sebanyak 0,2 g kemudian dihaluskan, ditempatkan dalam Erlenmeyer bertutup

- b. Ditambahkan dengan 10 ml aquabides, diaduk dengan menggunakan stirer selama 2 jam pada suhu ruang.
- c. Larutan dilarutkan dengan 10 ml metanol grade HPLC 80% dalam air
- d. Disaring dengan perangkat saring dengan filter 0,45 μm *polytetrafluoroethylene* (Alltech associates, Deerfield, IL)
- e. Dianalisis dengan HPLC
- f. Komponen asiatikosida dan madekasosida dapat dilihat dari kurva yang terbentuk dengan waktu retensi (RT) yang sesuai dengan standar yang digunakan
- g. Kadar asiatikosida dan madekasosida dalam sampel ditentukan dengan menggunakan perbandingan luas kurva sampel dengan luas kurva standar yang telah diketahui konsentrasinya (dilakukan otomatis oleh alat)

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 dan kadar asiatikosida dan madekasosida. Data kualitatif dianalisis dengan menggunakan analisis secara diskriptif. Sedangkan data kuantitatif dianalisis menggunakan uji statistik ANOVA *One Way*. Bila terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan uji DMRT pada taraf 5 %.