

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan dan Hewan Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Januari-Juli 2014.

3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam penelitian eksperimental yang menggunakan metode RAL (Rancangan Acak Lengkap). Perlakuan yang digunakan yaitu perbedaan pemberian konsentrasi ion logam Fe^{2+} pada media subkultur kalus pegagan (*Centella asiatica*) yaitu 0, 90, 100, dan 110 μM dengan 4 kali ulangan sehingga didapatkan 16 percobaan.

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

$$\text{F0} = 0 \quad \mu\text{M}$$

$$\text{F1} = 90 \quad \mu\text{M}$$

$$\text{F2} = 100 \quad \mu\text{M}$$

$$\text{F3} = 110 \quad \mu\text{M}$$

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat-alat

Alat yang digunakan antara lain oven, gelas ukur, pipet, *beaker glass*, timbangan analitik, lemari es, pH meter, *hot plate and magnetic stirrer*, botol kultur, plastik tahan panas, karet, autoklaf, tisu, lampu *flouresence*, *Laminar Air Flow* (LAF), *disposable syringe*, alat diseksi (pinset, *blade*, scalpel), cawan petri, lampu bunsen, korek api, *alumunium voil*, *wrap plastic*, rak kultur dan kertas label.

3.3.2 Bahan-bahan

Bahan utama yang digunakan adalah bagian daun muda nomor 1, 2 dan 3 dari tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebagai eksplan yang akan ditanam pada media. Bahan untuk sterilisasi adalah detergen, aquades, fungisida, alkohol 70%, alkohol 90 %, desinfektan, aquades steril dan antiseptik. Media dasar yang digunakan adalah media MS (Murashige & Skoog). ZPT yang digunakan yaitu 2,4-D dikombinasikan dengan air kelapa. Bahan-bahan lain untuk pembuatan media adalah gula dan agar-agar.

3.4. Langkah Kerja

3.4. 1 Sterilisasi Alat-alat

a. Sterilisasi basah

1. Alat-alat direndam dengan tipol selama 1 hari 24 jam
2. Setelah 24 jam alat-alat tersebut digosok dan dibilas dengan air mengalir, bilasan terakhir menggunakan aquades.

3. Dimasukkan ke dalam oven untuk dikeringkan pada suhu 50°C sampai kering
4. Dikeluarkan dari oven dan kemudian satu per satu alat dibungkus dengan *aluminium foil*
5. Dimasukkan ke dalam autoklaf untuk disterilkan dengan suhu 121°C pada tekanan 1 atm selama 30 menit.
6. Dikeluarkan dari autoklaf dan dimasukkan kembali ke oven untuk dikeringkan dengan suhu 50°C sampai kering.

b. Sterilisasi Kering

1. Alat-alat direndam dengan tipol selama 1 hari (24 jam).
2. Setelah 24 jam alat-alat tersebut digosok menggunakan penggosok cuci.
3. Dibilas dengan air mengalir, bilasan terakhir menggunakan aquades.
4. Dimasukkan ke dalam oven untuk dikeringkan pada suhu 50° sampai kering.
5. Dikeluarkan dari oven dan kemudian satu per satu alat dibungkus dengan *aluminium foil*.
6. Dimasukkan ke dalam oven untuk disterilkan dengan suhu 125°C selama 3 jam.

3.4.2 Pembuatan Media

a. Induksi Kalus

1. Dimasukkan 2, 21 g media MS; 15 g gula; 5 ml 2,4-D dan air kelapa 50 ml ke dalam gelas beker dan diletakkan di atas *hot plate*.
2. Ditambahkan aquades sampai volume 500 mL, kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer*.

3. Diukur pH larutan media dalam beaker glass (pH 5,6-5,8). pH diatur dengan HCl 1 N atau KOH 1 N.
4. Ditambahkan 15 g agar.
5. Larutan media dididihkan dalam *beaker glass* sambil terus diaduk.
6. Larutan media MS dituangkan ke dalam 25 botol kultur, masing-masing botol sebanyak 20 mL.
7. Botol kultur ditutup dengan plastik tahan panas dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm, selama 15 menit.
8. Botol berisi media MS diinkubasi dalam ruang inkubator selama minimal 3 hari.

b. Sub kultur

Pembuatan media subkultur untuk menginduksi metabolit sekunder dengan menggunakan ion logam Fe^{2+} dengan konsentrasi yaitu 0, 90, 100, dan 110 μM yang didistribusikan 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

1. *Laminar Air flow* disemprot dengan alkohol 70% terlebih dahulu.
2. Kemudian alat-alat yang dimasukkan ke dalam LAF juga harus disemprot dengan alkohol 70% dahulu.
3. 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

a. Sterilisasi eksplan di luar LAF

1. Daun muda pegagan (*C. asiatica*) diambil dan dicuci dengan deterjen
2. Daun yang telah dicuci dimasukkan ke dalam botol kultur berisi larutan deterjen dan dikocok.
3. Kemudian dibilas dengan air mengalir sampai bersih.
4. Dibilas dengan aquades
5. Daun muda yang telah bersih direndam dalam 300mg/L fungisida selama 60 menit.

b. Sterilisasi eksplan di dalam LAF

1. Daun muda pegagan direndam dalam larutan disinfektan 30%, 20%, dan 10%, masing-masing 10 menit.
2. Dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali, masing-masing 3 menit.
3. Dichelupkan kedalan larutan antiseptik.

c. Penanaman Eksplan

1. Eksplan dipotong dengan ukuran 5 mm x 5 mm.
2. Eksplan ditanam dalam botok kultur berisi media MS yang telah ditambahkan ZPT dan air kelapa. Selanjutnya botol segera ditutup dengan wrap plastik dan plastik yang diikat dengan karet gelang.
3. Diulangi langkah di atas untuk semua unit percobaan dan diinkubasi selama 4 minggu. Penanaman dilakukan secara aseptik dalam LAF (*Laminar Air Flow*)

d. 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 subkultur pada media induksi metabolit sekunder yang telah ditambahkan dengan elisitor Fe^{2+} dan diinkubasi selama 4 minggu. Kalus yang digunakan didapatkan dari induksi kalus pada media yang telah diinduksi pada penelitian pendahuluan. Berikut langkah-langkahnya :

1. Eksplan yang berkalus ditimbang dan dibagi pada masing-masing botol dengan berat yang sama yaitu 0,1 g sebagai berat awal kalus.
2. Kalus dipotong kemudian ditanam pada media yang telah ditambahkan dengan ion logam Fe^{2+}

3. Botol kultur ditutup dengan plastik wrap dan ditutup dengan plastik penutup serta ikat dengan karet.

3.4.7 Tahap Pengamatan

Pengamatan dilakukan dengan tiga 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 subkultur untuk diuji metabolit sekunder untuk mengetahui kadar asiaticosida dan madecassosida pada kalus pegangan.

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 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 atau riabel, kalus kompak, dan trasparansi kalus baik pada tahap induksi kalus dan pada tahap induksi metabolit sekunder.
5. Pengamatan kandungan metabolit sekunder dengan menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau yang sering disebut dengan *High Performance Liquid Cromatography* (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 Cromatography* (HPLC). Adapun langkah-laangkah uji HPLC sebagai berikut:

1. Sampel diambil sebanyak 0,1 g kemudian dihaluskan, ditempatkan dalam elemeyer tertutup.
2. Ditambahkan dengan 10 ml aquabides, diaduk dengan menggunakan *stirrer* selama 2 jam pada suhu ruang.
3. Larutan dilarutkan dengan 10 ml metanol grade HPLC 80% dalam air.
4. Disaring dengan perangkat saring dengan filter 0,45 μm polytetrafluoroethylene (Alltech associates, Deerfield, IL).
5. Dianalisis dengan HPLC

6. Komponen asiitikosida dan madekasosida dapat dilihat dari kurva yang terbentuk dengan waktu retensi (RT) yang sesuai dengan standar yang digunakan.
7. 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, kadar asiatikosida dan madekasosida. Data kualitatif dianalisis dengan menggunakan analisis secara diskriptif. Sedangkan data kuantitatif dianalisis menggunakan uji statistik ANAVA *One Way*. Bila terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan uji DMRT pada taraf 5 %.