

### BAB III

#### METODE PENELITIAN

##### 3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan 3 ulangan. Faktor pertama adalah jenis eksplan tumbuhan Puwoceng yang digunakan yaitu daun dan tangkai daun (petiol) serta perbedaan konsentrasi zat pengatur tumbuh IBA (*Indole Butiryc Acid*) pada media MS yang terdiri dari 4 taraf yaitu IBA pada konsentrasi 0 mg/l; 3 mg/l; 5 mg/l dan 7 mg/l. Pada penelitian ini terdapat 8 unit perlakuan sehingga secara keseluruhan terdapat 24 unit percobaan. Setiap botol kultur diisi eksplan dengan berat daun 0.04 gram sedangkan petiol 0.02 gram.

Jenis pertama yaitu eksplan (E) terdiri dari 2 macam:

E1 = Daun muda

E2 = Tangkai daun (petiol)

Faktor kedua yaitu Kosentrasi IBA (K) terdiri dari 4 taraf:

K0 = kontrol (0 mg/l IBA)

K3 = IBA konsentrasi 3 mg/l

K5 = IBA konsentrasi 5 mg/l

K7 = IBA konsentrasi 7 mg/l

Tabel 3.1 Kombinasi perlakuan antara jenis eksplan dan konsentrasi IBA:

Jenis Eksplan	Konsentrasi			
	K0	K3	K5	K7
E1	E1K0	E1K3	E1K5	E1K7
E2	E2K0	E2K3	E2K5	E2K7

### 3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-Oktober 2012, bertempat di laboratorium *Plant Physiology and Culture* Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

### 3.3 Alat dan Bahan

#### 3.3.1 Alat-alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas ukur, beaker glass, cawan petri, spatula pengaduk, botol kultur, alat-alat diseksi (scapel, pinset, gunting), "*Laminar Air Flow Cabinet*", timbangan analitik, pipet tetes, alat sterilisasi (autoklaf, lampu spiritus, penyemprot alkohol (*hand sprayer*)), pH meter, lemari pendingin, rak kultur, thermometer, lampu fluorescence, lux meter, kertas label, plastik, karet, hot plate dan stirer, kartas tissue, aluminium foil, waterbath, bejana elusi, vakum, pipa kapiler (lampiran 13).

#### 3.3.2 Bahan-bahan

Bahan-bahan yang digunakan meliputi eksplan berupa tanaman Purwoceng (daun muda dan tangkai daun) yang diperoleh dari desa Ranupane gunung Bromo, Tengger dan Semeru (Lumajang). Media MS (Murashige & skoog), ZPT IBA (*Indole Buterik Acid*), gula dan agar. Bahan untuk sterilisasi adalah detergen cair, alcohol 70 % dan 96%, Bayclin 10%, 20% dan 30%, Betadine 1% aquades steril serta bahan untuk mencuci alat yaitu Tipol (lampiran 13).

Bahan kimia uji metabolit sekunder KOH p.a. (Lachema, CR), n-hexane untuk analisis bagan, metanol p.a. ISO, diethyl eter GR ACS (MERCK), ethanol untuk UV spectroscopy, isopropyl alcohol p.a. (Lachema, CR), silica gel untuk column chromatography SILPEARL kapasitas serapan 61% H<sub>2</sub>O, pH 6–7, ukuran partikel 25 µm (Sklárny Kavalier, CR), hexamethyl disilazan (HMDS) purum >98%, trimethyl chlorsilan (TMCS) puriss. >99%, pyridine purum >99 % (Fluka).

### **3.4 Metode Penelitian**

#### **3.4.1 Sterilisasi Alat**

Sterilisasi Alat-alat merupakan salah satu tahapan yang sangat penting dalam proses kultur jaringan karena sterilitas adalah hal utama dalam kultur jaringan. Tahapan dalam proses sterilisasi alat adalah sebagai berikut:

1. Alat-alat *dissecting set* (scalpel, pinset, gunting), alat-alat dari gelas dan logam direndam terlebih dahulu selama  $\pm 1 \times 24$  jam dengan tipol
2. Dicuci dengan detergen dan dibilas dengan air bersih beberapa kali kemudian dikering anginkan
3. Alat-alat logam kemudian dibungkus dengan aluminium foil dan dimasukkan dalam oven untuk sterilisasi selama 180 menit
4. Alat-alat gelas (cawan petri) dibungkus dengan kertas atau aluminium foil dan dimasukkan dalam plastik, kemudian disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121° C selama 60 menit

5. Alat-alat logam *dissecting set* (pinset, gunting, scapel) disterilisasi dengan alkohol 90%, selanjutnya dimasukkan dalam LAF (untuk UV) dan dibakar dengan nyala api spiritus setiap kali akan digunakan di LAF
6. Alat-alat dari gelas dimasukkan dalam LAF untuk di UV sebelum digunakan pada proses penanaman

### 3.4.2 Pembuatan Media

Media kultur jaringan terdiri dari beberapa komponen yang mendukung kehidupan eksplan yang dikultur. Tahapan dalam pembuatan media kultur (lampiran 12) adalah sebagai berikut:

1. Ditimbang Agar sebanyak 8 gram, media MS 4,43 gr, Gula 30 gr dan hormon IBA 3 mg, 5 mg dan 7 mg yang masing-masing dilarutkan dalam 1 liter media.
2. dilarutkan gula, media MS dan ZPT IBA dengan aquades hingga mencapai volume 1 liter di dalam beaker glass.
3. Keasaman media diatur pada pH 5,8 dengan menggunakan pH meter, jika pH kurang dari 5,8 maka ditambahkan dengan NaOH 0,1N dan jika pH lebih dari 5,8 maka media ditambahkan larutan HCl 0,1 N. pH terlalu rendah (asam) maka ditambah dengan NaOH.
4. Ditambahkan agar kemudian di panaskan di atas hot plate hingga mendidih dan dihomogenkan dengan menggunakan sterer.
5. Larutan yang telah mendidih dituang ke dalam botol kultur sebanyak 20 ml kemudian ditutup dengan plastik dan diikat dengan karet.

### 3.4.3 Sterilisasi Media

Media yang telah diisikan dalam setiap botol kultur disterilisasikan dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

### 3.4.4 Sterilisasi Ruang Tanam

Penanaman eksplan kultur kalus dilakukan di dalam LAF (*Laminar air flow*). Sebelum digunakan, LAF disterilkan dengan tahapan sebagai berikut:

1. Laminair Air Flow disemprot dengan alkohol 70% sebelum digunakan.
2. Bahan dan alat yang digunakan untuk sterilisasi eksplan dimasukkan ke dalam LAF, Kemudian UV alat dihidupkan ± selama 1 jam
3. Blower dan lampu kerja dinyalakan terlebih dahulu kemudian UV akan mati secara otomatis (Keadaan blower harus ON, untuk membantu menghindari kontaminasi pada saat menanam eksplan)
4. Bahan dan alat yang akan digunakan harus disemprot alkohol terlebih dahulu (setelah UV mati)
5. Penggunaan bunsen juga membantu menghindari kontaminasi, akan tetapi harus tetap menjaga suhu dalam ruang.

### 3.4.5 Tahap Penanaman

Tahap penanaman ini terdiri dari empat langkah yang harus dilakukan yaitu sebagai berikut:

- 1) Pemilihan Eksplan

Ekspan yang akan digunakan untuk kultur dipilih bagian daun dan tangkai daun yang masih muda karena daun yang masih muda tersebut memiliki tunas aksilar yang masih aktif membelah.

## 2) Sterilisasi eksplan

Sterilisasi eksplan dilakukan melalui 2 tahap sterilisasi yaitu sterilisasi tahap I yang dilakukan di ruang persiapan dan sterilisasi tahap II yang dilakukan di LAF. Tahapan sterilisasi adalah sebagai berikut:

- a) Tahap pertama yaitu sterilisasi luar, eksplan yang telah dipilih selanjutnya disterilkan dengan cara dicuci menggunakan detergen.
- b) Eksplan diletakkan di dalam botol dan diberi detergen dikocok agar bersih.
- c) Eksplan yang telah dicuci dengan detergen selanjutnya dibilas dengan menggunakan air mengalir sampai bersih.
- d) Eksplan yang telah dicuci hingga bersih selanjutnya direndam dalam larutan fungisida (0.75 gram dalam 250 ml aquades) selama 60 menit
- e) Tahap kedua yaitu sterilisasi dalam LAF, eksplan disterilkan dengan cara direndam menggunakan bayclin 30% selanjutnya 20% dan 10% masing-masing selama 10 menit
- f) Eksplan selanjutnya dibilas dengan menggunakan aquades steril sebanyak 3 kali masing-masing selama 3 menit
- g) Eksplan yang telah dibilas dengan aquades selanjutnya dicelupkan dalam larutan betadine 1%
- h) Eksplan siap untuk ditanam

### 3) Penanaman eksplan

Penanaman eksplan yang telah disterilkan dilakukan di dalam LAF (lampiran 12) dengan langkah-langkah sebagai berikut:

- a) Eksplan daun dan tangkai daun dipotong menggunakan scapell, untuk daun bagian tulang daun dibuang
- b) Diambil eksplan bagian yang helai daun dan petiol kemudian dipotong
- c) Daun dipotong dengan ukuran 5 mm X 5 mm dan petiol 10 mm
- d) Ditimbang eksplan daun dan petiol yang akan ditanam, daun 0.04 gram dan petiol 0.02 gram.
- e) Botol media disiapkan, dibuka tutup plastik media dan media disterilkan dengan api bunsen
- f) Eksplan diambil dengan pinset dan dimasukkan ke dalam botol kultur yang berisi media
- g) Botol kultur disterilkan kembali di dekat api bunsen dan ditutup dengan plastik kemudian diikat dengan karet gelang

### 4) Tahap pemeliharaan eksplan

Tahap pemeliharaan eksplan dilakukan setelah tahap penanaman eksplan. Eksplan dikeluarkan dari LAF selanjutnya diletakkan di rak-rak pemeliharaan eksplan, di dalam ruangan dengan suhu yang sesuai. Botol kultur yang telah berisis eksplan untuk pemeliharaannya agar terhindar dari kontaminasi lingkungan maka dilakukan penyemprotan dengan alkohol 3 hari sekali.

## 5) Pengamatan

Pengamatan eksplan hasil penanaman kultur dilakukan dalam tiga taraf pengamatan yaitu:

- a) Pengamatan setiap hari dilakukan untuk melihat ada atau tidaknya perkembangan dan munculnya kalus pertama kali pada eksplan. Selain itu juga untuk melihat apabila ada kontaminasi pada eksplan, dan hasil pengamatan didokumentasi.
- b) Pengamatan kedua yaitu pengamatan interval 2 minggu sekali untuk mengetahui tekstur dan warna kalus.
- c) Pengamatan ketiga yaitu pengamatan akhir yang dilakukan setelah 8 minggu penanaman, terdiri dari pengamatan prosentase eksplan membentuk kalus, berat kalus dan uji kadar stigmasterol serta sitosterol kalus yang terbentuk.

Parameter pengamatan:

- a. Pengamatan munculnya kalus pertama kali dinyatakan dalam HST (hari setelah tanam) yang ditandai dengan membengkaknya eksplan
- b. Pengamatan warna kalus yang dilakukan setiap hari dengan diamati perubahan warna yang terjadi pada setiap kalusnya.
- c. Pengamatan kontaminasi diamati secara langsung yang terjadi pada media dan eksplan yang dapat diakibatkan oleh mikroorganisme.
- d. Tekstur kalus diamati secara visual pada penampakan kalus yaitu melihat kalus remah/riabel, kalus kompak, dan kalus intermediate.

- e. Pengamatan prosentase kalus yang dilakukan dengan menghitung banyaknya eksplan yang membentuk kalus dibandingkan dengan total eksplan yang ditanam dilakukan di akhir pengamatan.

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

- f. Penimbangan berat kalus dilakukan setelah 8 minggu menggunakan timbangan analitik dengan cara destruktif (mengambil kalus dari botol kemudian ditimbang).

$$\text{Berat kalus/ulangan} = \frac{\text{Berat akhir} - \text{Berat eksplan awal setiap botol}}{\text{Jumlah kalus yang tumbuh pada setiap botol}}$$

$$\text{Rata-rata berat kalus} = \frac{\text{Jumlah berat kalus seluruh ulangan}}{\text{Ulangan}}$$

- g. Pengukuran kadar stigmasterol dan sitosterol dengan menggunakan metode kromatografi kolom.

#### 3.4.6 Uji Metabolit Sekunder (Stigmasterol dan Sitosterol)

Senyawa yang diuji dari hasil kalus tanaman Purwoceng yaitu stigmasterol dan sitosterol. Analisis dilakukan di laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang dengan menggunakan metode Kromatografi Kolom. Metode yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. 0,2 g kalus diekstrak dengan menggunakan methanol untuk membentuk fraksi methan, kemudian diekstrak kembali menggunakan n-hexane untuk memperoleh fraksi hexane.
2. Dimasukkan hasil ekstraksi ke dalam kolom (lampiran 14) yang berisi silica gel, 61% H<sub>2</sub>O, 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 ditambahkan dengan standard kemudian diabsorbansi menggunakan spektrofotometri (lampiran 14), hasil dianalisis.

### 3.5 Analisis Data

Data pengamatan berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif berupa pengamatan secara visual meliputi hari muncul kalus, morfologi kalus dan prosentase kalus, sedangkan data kuantitatif berupa berat kalus, kadar sitosterol dan stigmasterol. Data kualitatif dianalisis secara diskriptif dan data kuantitatif dianalisis dengan menggunakan analisis variansi (ANAVA) factorial untuk mengetahui adanya pengaruh jenis eksplan dan konsentrasi IBA pada pertumbuhan dan kadar metabolit sekunder (stigmasterol dan sitosterol) kalus Purwoceng dalam media MS. Apabila terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan dengan DMRT pada taraf 5%.