

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Percobaan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial yaitu pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D (1 mg/L, 2 mg/L, dan 3 mg/L) pada media MS yang merupakan faktor pertama dan pemberian PEG 6000 (0 mg/L, 5 mg/L, 15 mg/L, dan 25 mg/L) yang merupakan faktor kedua. Dengan demikian, dalam penelitian ini terdapat 4 X 3 kombinasi atau 12 kombinasi dengan 3 ulangan. Sehingga secara keseluruhan terdapat 36 unit.

Faktor pertama adalah konsentrasi 2,4-D yang terdiri dari 3 taraf:

K1 = 2,4-D dengan konsentrasi 1 mg/L

K2 = 2,4-D dengan konsentrasi 2 mg/L

K3 = 2,4-D dengan konsentrasi 3 mg/L

Faktor kedua adalah konsentrasi PEG 6000 yang terdiri dari 4 taraf:

P1 = PEG 6000 dengan konsentrasi 0 mg/L

P2 = PEG 6000 dengan konsentrasi 5 mg/L

P3 = PEG 6000 dengan konsentrasi 15 mg/L

P4 = PEG 6000 dengan konsentrasi 25 mg/L

Tabel (3.1) kombinasi konsentrasi ZPT 2,4-D dan konsentrasi PEG 6000

Konsentrasi PEG 6000 mg/L	Konsentrasi 2,4-D mg/L		
	K1	K2	K3
P1	K1P1	K2P1	K3P1
P2	K1P2	K2P2	K3P2
P3	K1P3	K2P3	K3P3
P4	K1P4	K2P4	K3P4

3.2. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli 2013 hingga bulan September 2013 di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan 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 autoklaf, oven, lampu spiritus, botol penyemprot alkohol, gelas ukur, beaker glas, sendok kecil, stirer, hot plate, timbangan analitik, PH meter, gelas arloji kecil, pipet tetes, botol kultur, cawan petri, karet, plastik, kertas label, bulpoin, alat dissecting (pinset, skalpel, mata pisau skalpel), aluminium foil, cling wrap, tissue, rak kultur, AC, lampu fluorescence, lux meter, lemari pendingin, (alat uji kimia), labu takar, penumbuk porselen, spatula, pipet ukur, erlenmeyer, corong, kertas saring, sentrifuge, HPLC Shimadzu, rotary evaporator, filter 0,45 μm polytetrafluoroethylene.

3.3.2. Bahan-Bahan

Bahan-bahan yang digunakan untuk menunjang penelitian ini adalah eksplan daun dari tanaman *Stevia rebaudiana* yang diinduksi pada media 2,4-D, detergen cair, fungisida 75%, bayclen (30%, 20%, dan 10%), betadin 5 tetes, alkohol (70% dan 95%), spiritus, media MS (4.43 gr), gula (30 gr), agar (7 gr), ZPT berupa 2,4-D dengan konsentrasi 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L mg/L, dan PEG 6000 dengan konsentrasi 0 mg/L, 5 mg/L, 15 mg/L, 25 mg/L, acetonitrile, HCl, metanol, asam asetat glasial.

3.4. Langkah Kerja

Langkah kerja dalam penelitian ini ada beberapa tahap sebagai berikut:

3.4.1. Sterilisasi Alat

1. Alat-alat dissecting (pinset, scalpel) serta alat gelas dicuci dengan deterjen dan dibilas dengan air kran, kemudian direndam dengan tepol dan air selama 24 jam. Setelah itu di keringkan menggunakan oven selama 2 jam
2. Alat-alat dissecting (pinset, scalpel) dibungkus dengan aluminium foil dan di masukkan dalam plastik tahan panas. Alat gelas (cawan petri) dibungkus dengan kertas dan dimasukkan dalam plastik tahan panas. Serta tissue juga dimasukkan dalam plastik tahan panas

kemudian disterilisasi dalam autoklaf dengan tekanan 1,5 atm selama 60 menit pada suhu 121⁰C.

3. Alat-alat dissecting (pinset dan scalpel) dimasukkan dalam alkohol 95% dan di bakar dengan bunsen sebelum digunakan di LAF (Laminar Air Flow). Begitu juga dengan alat gelas (cawan petri), disemprot dengan alkohol 70% dan di keringkan dengan tissue, serta di bakar dengan bunsen sebelum digunakan untuk tempat eksplan.

3.4.2. Pembuatan Media

Media yang digunakan untuk induksi kalus adalah media 1 MS dengan penambahan ZPT 2,4-D dan PEG 6000, gula, serta agar sebagai pematat.

Tahap dalam membuat media 1 MS dalam 1 liter air adalah sebagai berikut:

1. Aquades disiapkan sebanyak 1 Liter dalam beaker glass.
2. ZPT 2,4-D 1 mg, 2 mg, dan 3 mg dan PEG 6000 0 mg/L, 5 mg/L, 15 mg/L, dan 25 mg/L dilarutkan dalam 1 liter aquades dalam masing-masing beaker glass.
3. Media MS ditimbang sebanyak 4,43 gr, serta gula ditimbang sebanyak 30 gr, kemudian ditambahkan ke dalam masing-masing beaker glass yang telah berisi aquades, PEG 6000 dan ZPT. Dihomogenkan dan diukur PH larutan media dengan PH meter, yaitu

- 5,8. Jika PH media terlalu asam maka ditambah dengan larutan NAOH dan jika terlalu basah PH media maka ditambahkan dengan larutan HCl.
4. Agar ditimbang sebanyak 7 gr dan ditambahkan dalam masing-masing beaker glass yang berisi aquades, PEG 6000, MS, gula, dan ZPT. Kemudian media dimasak pada hot plate dengan stirer hingga mendidih serta homogen.
 5. Media yang telah mendidih dituang ke dalam botol kultur \pm 20 ml, kemudian ditutup dengan pastik dan diikat dengan karet serta di beri kertas label.

3.4.3. Sterilisasi Media

Media dalam setiap botol kultur diseterilisasi menggunakan autoklaf dengan tekanan 1,5 atm selama 20 menit pada suhu 121°C .

3.4.4. Sterilisasi Ruang Tanam

Sterilisasi ruang tanam yang pertama dilakukan adalah dipel lantai dengan wipol dihomogenkan dengan air, kemudian dipel lg dengan wipol murni, dan yang terakhir diberi formalin pada pojok-pojok ruangan dengan kapas atau tissue. Setelah itu laminar air flow disemprot alkohol 70% , kemudian baru disterilisasi dengan sinar UV selama 1 jam sebelum LAF digunakan, ketika LAF akan digunakan

maka sinar UV dimatikan dan blower serta lampu pada LAF dihidupkan.

3.4.5. Tahap Induksi Kalus

1. Sterilisasi Eksplan

Tiga daun dari tunas dipotong kemudian dicuci dengan air mengalir, setelah itu di rendam dalam larutan detergen cair selama 5 menit dan dibilas dengan air mengalir. Daun kemudian di rendam dalam larutan fungisida 75% selama 10 menit. Eksplan kemudian di letakkan dalam LAF dan direndam dengan larutan bayclin 30%, 20%, dan 10% masing-masing selama 10 menit, setelah itu dibilas dengan aquades 3 kali, dan terakhir eksplan disterilisasi dengan betadin 5 tetes dalam 100 ml aquades.

2. Penanaman Eksplan

Eksplan yang telah disterilisasi ditanam dalam media MS dengan penambahan ZPT 2,4-D (1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L) dan PEG 6000 (0 mg/L, 5 mg/L, 15 mg/L, 25 mg/L), serta diinkubasi selama 4 minggu. Hal ini dilakukan dalam kondisi yang aseptik dalam LAF (Laminar Air Flow).

3. Tahap Pemeliharaan

Eksplan yang telah di tanam dalam botol berisi MS dan ZPT dipindahkan ke dalam ruang inkubasi dan diletakkan dalam rak kultur serta di semprot dengan alkohol 70% setiap 3 hari sekali.

3.4.6. Tahap Pengamatan

Pengamatan dilakukan dengan 3 tahap:

1. Pengamatan dilakukan setiap hari untuk melihat ada atau tidaknya perkembangan dan munculnya kalus pertama kali pada eksplan, serta ada tidaknya kontaminasi pada eksplan.
2. Pengamatan kedua yaitu pengamatan interval 2 minggu sekali untuk mengetahui tekstur dan warna kalus.
3. Pengamatan ketiga yaitu pengamatan akhir yang dilakukan setelah 4 minggu penanaman terdiri dari pengamatan prosentase eksplan membentuk kalus, berat kalus dan uji kadar steviosida pada kalus *Stevia rebaudiana*.

Parameter pengamatan:

1. Pengamatan munculnya kalus pertama kali dinyatakan dalam HST (Hari Setelah Tanam) yang ditandai dengan pembengkakan eksplan.
2. Pengamatan warna kalus yang dilakukan setiap hari dengan diamati perubahan warna yang terjadi pada setiap kalusnya.
3. Pengamatan kontaminasi dengan mengamati secara langsung yang terjadi pada media dan eksplan yang dapat diakibatkan oleh mikroorganisme.
4. Tekstur kalus diamati secara visual pada penampakan kalus yaitu kalus remah, kalus kompak, dan kalus intermediet.

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

$$\% \text{ Eksplan berkalus} = \frac{\text{Eksplan berkalus tiap perlakuan}}{\text{Total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

6. Pengamatan berat kalus dilakukan secara destruktif pada minggu keempat menggunakan timbangan analitik untuk mengetahui berat akhir kalus kemudian.

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

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

7. Pengamatan kandungan metabolit sekunder (steviosida) dengan menggunakan metode HPLC atau KCKT.

3.4.7. 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 dengan mortal, 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 steviol glucoside dapat dilihat dari kurva yang terbentuk dengan waktu retensi (RT) yang sesuai dengan standar yang digunakan. Standar yang digunakan stevioside dan rebaudioside A.
- g. Kadar steviol glucoside 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, dan hari muncul kalus, sedangkan data kuantitatif berupa persentase kalus berat kalus, dan kadar steviosida. Data dianalisis dengan menggunakan analisis variansi (ANAVA) faktorial untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian ZPT 2,4-D dan PEG 6000 pada media MS terhadap kandungan steviosida pada kalus *Stevia rebaudiana* secara in vitro. Apabila terdapat perbedaan yang nyata maka dilanjut dengan DMRT pada taraf 5%.