

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah desain eksperimen. Menurut Nasution (2009) desain eksperimen yaitu penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek peneliti serta adanya kontrol. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui konsentrasi *Indole-3-butyric acid* (IBA) mana yang dapat menginduksi akar pada medium Murashige & Skoog (MS). Konsentrasi IBA yang digunakan pada penelitian ini adalah 10^{-5} mg/L, 10^{-6} mg/L, dan 10^{-7} mg/L. Dari medium dengan perbedaan konsentrasi tersebut kemudian diamati pertumbuhan akar yang dapat mensintesis metabolit sekunder. Setiap konsentrasi zat pengatur tumbuh IBA dilakukan ulangan sebanyak lima kali. Tiap pengulangan diwakili oleh satu botol kultur, yang masing-masing berisi satu potong kalus.

B. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi tanaman *Eurycoma longifolia* Jack. diperoleh dari Hutan Kalimantan.

2. Sampel

Sampel yang digunakan berupa kalus yang berasal dari daun *Eurycoma longifolia* Jack yang ditanam dalam medium MS dengan penambahan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) 2,4-D dan Kinetin.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fisiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI Bandung. Penelitian ini dimulai pada bulan Maret 2010 sampai dengan Maret 2011.

D. Alat dan Bahan Penelitian

Alat, bahan, dan komposisi medium MS (Murashige & Skoog, 1962) yang digunakan pada penelitian ini terlampir dalam **Lampiran 1**.

E. Cara Kerja

1. Penyediaan Kalus

Kalus berasal dari kultur daun yang ditanam pada medium MS dengan penambahan ZPT 2,4-D dan Kinetin masing-masing 2 mg/L.

2. Pembuatan Larutan Stok

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium MS (Murashige & Skoog, 1962). Dalam pembuatan medium, terlebih dahulu dibuat larutan stok untuk makronutrien, mikronutrien, NaFeEDTA, vitamin (Myo-

inositol, Glycine, Nicotinic acid, Pyridoxine HCL, Thiamin HCL), larutan N-organik, dan larutan stok untuk zat pengatur tumbuh (ZPT) yaitu IBA (*Indole Butyric Acid*). Masing-masing larutan stok dilarutkan dalam kepekatan 5 sedangkan untuk ZPT dibuat dengan konsentrasi 10^{-3} .

3. Pembuatan Medium

Seluruh larutan stok dipipet dan dimasukkan kedalam *beaker glass*, selanjutnya dimasukkan sukrosa 30 g/L kemudian digenapkan dengan menambahkan akuades hingga mencapai volume yang diinginkan. Larutan medium dipisahkan kedalam *beaker glass* kecil, kemudian tambahkan ZPT sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan. Medium dibuat menjadi pH $5,7 \pm 0,1$ dengan penambahan 0,1 N NaOH dan 0,1 N HCL. Setelah pH yang diinginkan tercapai, dimasukkan agar sebanyak 8 g/L kedalam larutan medium. Selanjutnya medium dipanaskan sehingga seluruh agar larut, kemudian masing-masing sebanyak 10 ml media dituangkan kedalam botol kultur, ditutup *aluminium foil*, diikat dengan karet, kemudian disterilisasi. Sterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C pada tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Medium kemudian disimpan dalam suhu kamar sampai digunakan.

4. Sterilisasi

a. Medium

Botol kultur yang telah berisi medium kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15

menit. Dengan tekanan yang cukup, uap air dapat membunuh semua mikroorganisme (Pierik, 1987).

b. Alat

Alat-alat yang disterilisasi untuk penanaman eksplan yaitu cawan petri berisi kertas saring, skalpel, botol yang berisi akuades, pinset, spatula, gelas ukur 100 ml, tabung erlenmeyer 250 ml, dan botol untuk alkohol 70%. Semua alat dibungkus dengan menggunakan kertas. Botol akuades dan tabung erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil. Seluruh alat ini disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5atm selama 15 menit.

Laminar air flow cabinet yang digunakan sebagai tempat penanaman eksplan disterilisasi dengan menggunakan alkohol 70%, kemudian diberi sinar UV selama 15 menit.

5. Perbanyak Kalus

Kalus yang telah berhasil ditumbuhkan pada medium MS dengan penambahan ZPT 2,4-D dan Kinetin dengan konsentrasi masing-masing 2 mg/L (**Gambar 3.1**) dipindahkan kedalam medium yang sama untuk perbanyak kalus.

6. Induksi Akar

Kalus (berwarna putih kecoklatan) yang berasal dari hasil perbanyak (**Gambar 3.1**) dipindahkan kedalam medium induksi, yaitu medium MS

dengan penambahan ZPT IBA dengan konsentrasi IBA 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7} mg/L.



Gambar 3.1 Kalus Hasil Perbanyakan.

7. Penyimpanan di Ruang Kultur

Botol yang telah berisi kalus, diletakkan di rak-rak yang berapa dalam ruang kultur tanpa penyinaran atau dalam keadaan gelap dengan temperatur kamar.

8. Pengamatan dan Penentuan Hasil untuk Ekstraksi

Pengamatan dilakukan secara visual, pada konsentrasi IBA yang menghasilkan respon pembentukan akar. Setelah terbentuk akar $\pm 4 - 8$ minggu, kemudian kalus berakar diambil untuk dianalisis kandungan metabolit sekundernya.

9. Ekstraksi Metabolit Sekunder

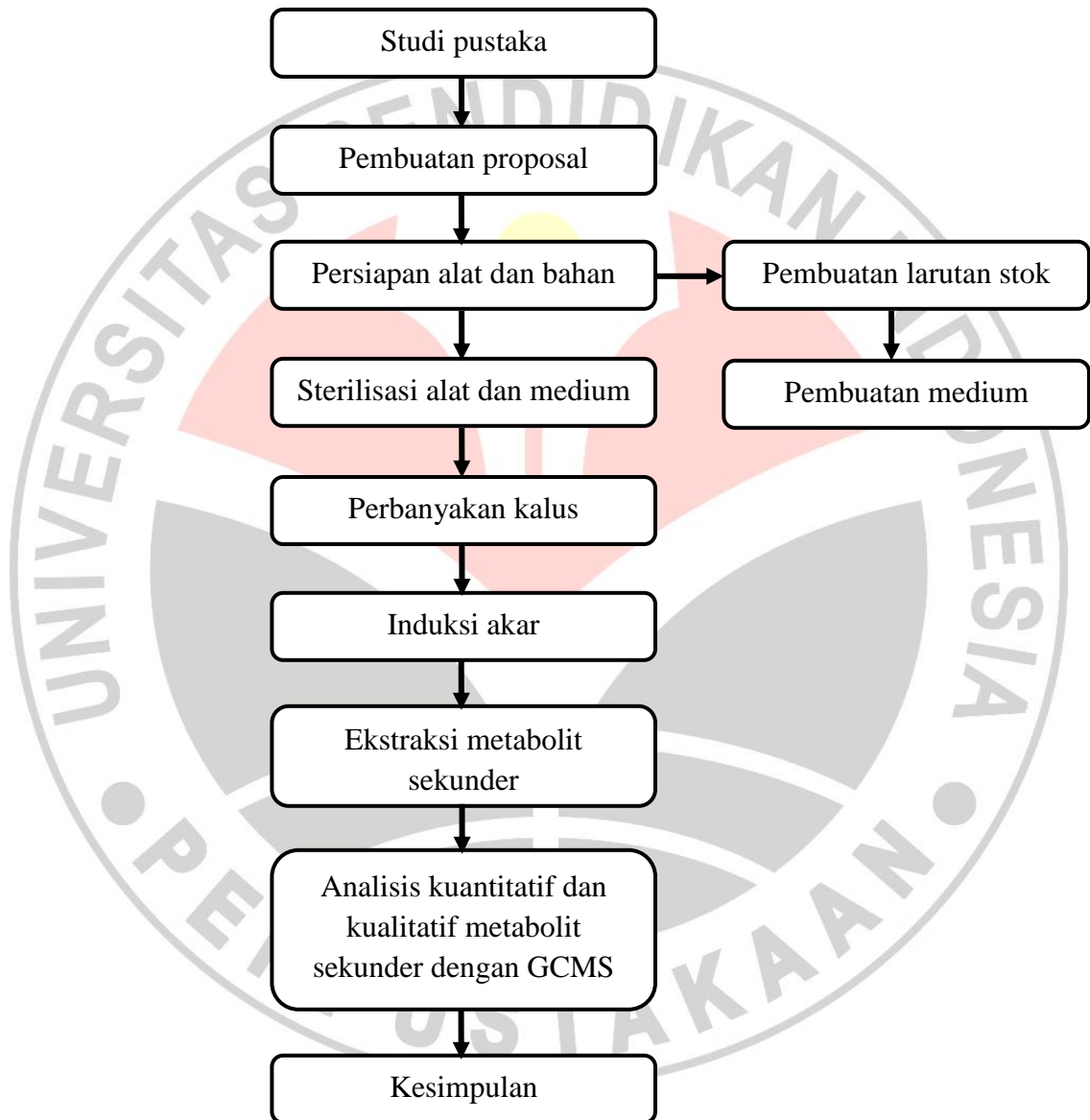
Kalus yang telah berakar dikeluarkan dari botol kultur, kemudian berat basah ditimbang sebanyak 1 gram dan dikeringkan menggunakan *freeze dry*, selanjutnya diekstraksi. Sampel yang telah kering dihaluskan dan dimasukkan kedalam botol vial kemudian ditambah dengan heksan (perbandingan sampel dengan pelarut 1 : 10), selanjutnya di *shaker* semalam dan disaring dengan menggunakan kertas saring (Harborne, 1987).

10. Analisis Kualitatif dengan GCMS

Hasil dari ekstraksi dianalisis kandungan metabolit sekundernya dengan menggunakan alat GCMS (*Gas Chromatography-Mass Spectrofotometer*).

F. Alur Penelitian

Adapun alur dari penelitian ini dapat dilihat pada **Gambar 3.2** alur di bawah ini.



Gambar 3.2 : Alur Penelitian