

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan termasuk kedalam penelitian bersifat eksperimen yang bertujuan untuk menjelaskan hubungan sebab-akibat antara satu variabel dengan variabel lainnya (Saluky, 2013). Pada penelitian ini dicari medium dengan kombinasi zat pengatur tumbuh yang optimum untuk merespon pertumbuhan kalus yang berpotensi mengandung senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan *M. citrifolia* L. yang disusun dalam Rangkaian Acak Lengkap (RAL). Medium yang digunakan untuk induksi kalus dan pertumbuhan kalus *M. citrifolia* L. adalah medium *Murashige and Skoog* (MS) dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D yaitu 1; 1,25; 1,5 ; dan 1,75 mg/l, sedangkan untuk kinetin yaitu 1; 1,25; dan 1,5 mg/l yang disusun sebanyak 16 kombinasi seperti pada Tabel 3.1. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Berikut ini adalah Tabel variasi kombinasi zat pengatur tumbuh.

Tabel 3.1 Variasi Kombinasi Konsentrasi 2,4-D dan Kinetin pada Medium *Murashige and Skoog* (MS) untuk Induksi dan Pertumbuhan Kalus *M. citrifolia* L (mg/L)

| Kinetin(mg/L) 2,4-D (mg/L) | 1 | 1,25 | 1,5 |
|-------------------------------|----------|-------------|------------|
| 1 | 1,25 | 1 : 1,25 | 1 : 1,5 |
| 1,25 | 1,5 | 1,25 : 1,25 | 1,25 : 1,5 |
| 1,5 | 1,5 : 1 | 1,5 : 1,25 | 1,5 : 1,5 |
| 1,75 | 1,75 : 1 | 1,75 : 1,25 | 1,75 : 1,5 |

Data yang diambil berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif berupa data morfologi kalus meliputi warna dan tekstur kalus serta ada tidaknya kandungan senyawa fenolik dan antrakuinon. Data kuantitatif meliputi waktu pertama muncul kalus dan rerata pertambahan berat basah kalus (mg/hari). Uji kualitatif untuk senyawa fenolik dan antrakuinon dari kalus dan daun segar *M.*

citrifolia L. menggunakan uji fitokimia dengan menggunakan pereaksi FeCl_3 3% untuk mengetahui kandungan senyawa fenolik dan pereaksi KOH 10% yang digunakan untuk mengetahui senyawa antrakuinon (modifikasi dari Santi, *et al.*, 2008; Setyawaty, *et al.*, 2014).

Variabel bebas dan terikat pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Variabel bebas :Kombinasi zat pengatur tumbuh 2.4-D dan kinetin.
- b. Variabel terikat :Respon pertumbuhan kalus, morfologi (tekstur dan warna) kalus, berat basah kalus, dan kandungan metabolit sekunder senyawa fenolik dan antrakuinon.

Untuk perlakuan kombinasi zat pengatur tumbuh dilakukan dengan 12 perlakuan. Adapun jumlah pengulangan didasarkan paada perhitungan rumus Federrer (1997), yaitu sebagai berikut:

| | |
|--|---|
| $(t-1)(n-1) \geq 15$ $(12-1)(n-1) \geq 15$ $(11)(n-1) \geq 15$ $11n \geq 15+1$ $11n \geq 16$ $n = 2,3$ | <p>Keterangan:</p> <p>n = jumlah pengulangan</p> <p>t = jumlah perlakuan</p> <p>15 = faktor nilai derajat kebebasan</p> |
|--|---|

Berdasarkan perhitungan diatas maka banyaknya pengulangan yang harus dilakukan minimal tiga kali. Jika A adalah perlakuan, maka pengulangannya adalah A1, A2 dan A3. Banyaknya galat adalah 36 yang terdiri atas 12 perlakuan dan 3 pengulangan. Kalus yang diuji berumur 56 hari dari hasil penggabungan semua kombinasi. Kalus yang dipanen kemudian di ekstraksi dengan etanol absolut 95% dengan proses maserasi selama 3 hari serta kadar senyawa fenolik dan antrakuinon diuji dengan metode fitokimia secara kualitatif.

B. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Botani, Laboratorium Bioteknologi, dan Laboratorium Fisiologi Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA, Universitas Pendidikan Indonesia.

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini yaitu organ daun kedua dan ketiga dari tumbuhan *M. citrifolia* L. yang berasal dari lingkungan sekitar Universitas Pendidikan Indonesia. Sampel yang digunakan adalah kalus berwarna cokelat yang berasal dari bagian daun tumbuhan *M. citrifolia* L. yang ditanam pada medium perlakuan.

D. Prosedur Penelitian

1. Penyediaan Eksplan

Eksplan yang digunakan adalah bagian daun kedua dan ketiga tumbuhan *M. citrifolia* L. yang diperoleh dari lingkungan sekitar Universitas Pendidikan Indonesia (Gambar 3.1). Daun yang digunakan memiliki kriteria yang khusus yaitu daun muda dengan permukaan daun lebar, berwarna hijau muda dan sehat serta tidak cacat.



Gambar 3.1. Eksplan daun *M. citrifolia* L

2. Pembuatan Larutan Stok Makronutrien, Mikronutrien, Besi, dan Vitamin serta Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

Untuk membuat medium terlebih dahulu diharuskan membuat larutan stok. Larutan stok yang dibuat berupa unsur makronutrien, mikronutrien, besi, vitamin dan zat pengatur tumbuh. Hal ini dimaksudkan untuk mempermudah dalam penimbangan karena biasanya dalam pembuatan medium jumlah unsur-unsur zat yang digunakan dalam jumlah sedikit. Sedangkan untuk unsur sukrosa dan agar-agar dapat langsung ditimbang karena kedua unsur tersebut diperlukan dalam jumlah banyak sehingga dalam penimbangan tidak sulit. Untuk membuat larutan stok unsur makronutrien, mikronutrien, besi dan vitamin ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik dengan komposisi yang telah ditentukan pada Tabel 1.3. (Lampiran 1).

Bahan-bahan yang telah ditimbang kemudian dimasukkan satu persatu kedalam *beaker glass pyrex* 500 ml yang berisi 300 ml aquadest kemudian di aduk. Larutan stok yang sudah jadi kemudian ditambahkan aquadest sampai volumenya mencapai 500 ml. Larutan stok yang telah dibuat dimasukkan kedalam botol gelap dan ditutup dengan rapat menggunakan alumunium foil. Pada botol yang berisi larutan tersebut diberi label nama zat, tanggal pembuatan dan komposisi yang terdapat dalam larutan tersebut. Larutan stok tersebut disimpan didalam lemari es. Sebagai catatan, setiap kali memasukkan bahan kimia harus segera dilarutkan dalam aquadest sekitar 100-200 ml atau untuk bahan yang sukar larut dalam aquadest seperti komponen besi (Na_2EDTA dan $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) maka perlu ditambahkan beberapa tetes HCL, kemudian untuk melarutkannya dengan cara digoyang-goyang atau diaduk dengan perlahan atau bisa juga menggunakan *magnetic stirer*, lalu ditambahkan aquadest sampai mencapai volume yang diinginkan. Bahan yang akan dilarutkan tidak boleh dimasukkan secara bersamaan, karena dapat terjadi presipitat (endapan) (Hendrayono dan Wijayani, 1994).

Selain unsur makronutrien, mikronutrien, besi dan vitamin dibuat juga stok untuk zat pengatur tumbuh. Biasanya zat pengatur tumbuh dibuat dengan kepekatan 1-10 mg/l. Dalam penelitian ini zat pengatur yang digunakan adalah 2,4-D dan kinetin. Larutan stok dibuat sebanyak 100 ml dengan konsentrasi 200 ppm yang

diencerkan dari 2000 ppm. Zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik sebanyak 0,2 gram (200 mg). Setelah ditimbang bahan zat pengatur tumbuh tersebut dilarutkan dengan aquadest kira-kira sebanyak 50-70 ml didalam *beaker glass pyrex*. Larutan tersebut sambil diaduk dan ditetesi sedikit larutan NaOH 1N dengan hati-hati sampai larutan jernih. Kemudian ditambahkan aquadest sampai volumenya mencapai 100 ml. setelah selesai dengan ditandai warna larutan tersebut jernih lalu dipindahkan kedalam botol stok. Botol tersebut ditutup rapat dengan aluminium foil dan diberi label nama zat pengatur tumbuh, komposisi zat pengatur tumbuh dan tanggal pembuatan. Larutan stok tersebut disimpan didalam lemari es.

3. Pembuatan medium *Murashige and Skoog* (MS)

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium *Murashige and Skoog* (MS) dengan penambahan berbagai konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin. Medium yang dibuat sebanyak 1 liter. Untuk membuat medium terlebih dahulu disiapkan alat-alat dan bahan-bahan yang digunakan (Lampiran 1). Unsur-unsur makronutrien, mikronutrien, vitamin, dan unsur besi (Lampiran 2) yang telah dibuat larutan stock dimasukkan kedalam *beaker glass pyrex* 1 liter dengan jumlah yang telah ditentukan. Kemudian ditambahkan aquadest sebanyak 300 ml lalu ditambahkan sukrosa sebanyak 30 gram dan dicampurkan dengan larutan tersebut dengan menggunakan *magnetic stier* dan dipanaskan menggunakan *hot plate*. Setelah larutan homogen, dipindahkan kedalam gelas ukur 1 liter *pyrex* dan ditambahkan aquadest sampai volumenya mencapai 800 ml. Larutan tersebut dituangkan kedalam 12 *beaker glass* 100 ml masing-masing dimasukkan 80 ml larutan. Dimasukkan zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin dengan hitungan yang telah di tentukan. Setelah larutan tercampur, ditambahkan aquadest sampai volumenya mencapai 100 ml pada masing-masing *beaker glass* 100 ml.

Larutan medium diukur pH-nya hingga mencapai 5.7 atau 5.8 dengan menggunakan pH meter digital dengan sesekali ditambahkan NaOH 1N atau HCL 1 N. Agar-agar sebanyak 8 gram dimasukkan kedalam larutan medium. Larutan medium dipanaskan diatas labu spirtus (bunsen) dengan sesekali diaduk sampai semuanya berwarna bening atau hingga mendidih. Medium dituang kedalam botol

medium kultur sekitar 10 ml per botolnya. Botol yang berisi medium diberi label dan ditutup rapat dengan menggunakan aluminium foil. Setelah itu, medium dalam botol disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1.5 atm selama 15 menit.



Gambar 3.2. Pembuatan Medium MS (*Murashige and Skoog*)

4. Sterilisasi medium, alat dan eksplan.

1. Medium

Medium yang telah dimasukkan ke dalam botol kultur disterilisasi pada suhu 121°C dengan tekanan 1.5 atm selama 15 menit menggunakan autoklaf.

2. Peralatan

- 1). Alat-alat yang digunakan untuk penanaman, sterilisasi eksplan, seperti cawan petri, labu erlenmeyer, *beaker glass* 1 liter dan 50 ml, skalpel, pinset, serta kertas saring dibungkus dengan menggunakan kertas buram atau HVS. Adapun bahan yang disterilisasi yaitu aquadest. Alat-alat dan bahan-bahan tersebut kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1.5 atm selama 15 menit. Untuk aquadest disterilisasikan dua kali.
- 2). *Laminar air flow cabinet* (L AFC) yang merupakan tempat berupa *box* atau ruangan yang didalamnya terdapat udara yang teralirkan selalu dalam keadaan bersih. Alat ini digunakan ketika sterilisasi eksplan, penanaman eksplan kedalam

Annisa Nur Fazrina, 2016

ANALISIS METABOLIT SEKUNDER KALUS *Morinda citrifolia* L. PADA MEDIUM MURASHIGE AND SKOOG (MS) DENGAN PENAMBAHAN ZAT PENGATUR TUMBUH 2.4-D DAN KINETIN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

medium kultur dan sub-kultur. Sebelum melakukan hal-hal tersebut LAFC ini harus disterikan terlebih dahulu dengan cara disemprot alkohol 70% dan dibiarkan selama 60 menit dengan diberi sinar ultraviolet dan aliran udara dibiarkan selama setengah jam sebelum penanaman.



Gambar 3.3 Alat-alat dan bahan-bahan untuk sterilisasi eksplan dan penanaman dalam *Laminar air flow cabinet* (LAFC)

5. Sterilisasi eksplan daun *M. citrifolia* L.

Eksplan daun *M. citrifolia* L. sebelum ditanam terlebih dahulu harus dibersihkan. Permukaan eksplan daun dibersihkan dan digosok secara perlahan di air mengalir sampai daun bersih dari kotoran maupun debu dari udara lingkungan. Setelah eksplan daun bersih, kemudian direndam larutan detergen 2% selama 15 menit. Setelah direndam dengan detergen kemudian dibersihkan di air mengalir selama 15 menit. Selanjutnya ekplan daun direndam larutan benstar[®] 0.5 g/l selama 30 menit. Setelah itu, direndam juga dengan larutan agrep[®] 1 g/l selama 30 menit. Setelah perendaman selesai, dilanjutkan di air mengalir selama 30 menit. Selanjutnya sterilisasi dilakukan didalam laminar.

Eksplan daun yang sudah bersih direndam dalam alkohol 70% selama 3 menit, setelah itu dibilas dengan aquadest steril. Selanjutnya direndam dalam bayclin[®]

Annisa Nur Fazrina, 2016

ANALISIS METABOLIT SEKUNDER KALUS *Morinda citrifolia* L. PADA MEDIUM MURAHSHIGE AND SKOOG (MS) DENGAN PENAMBAHAN ZAT PENGATUR TUMBUH 2.4-D DAN KINETIN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

50%, 20%, 10% dan 5% masing-masing direndam selama 10 menit. Setiap kali perendaman dilakukan harus sambil di goyang-goyangkan. Setelah perendaman selesai dibilas 3 kali dengan aquadest steril dengan waktu masing-masing selama 10 menit. Eksplan daun kemudian dipotong-potong dengan ukuran 2x1 cm dan 1,5x1,5 cm menggunakan *steril blade* dan bagian abaksial daun dilukai. Daun yang sudah dipotong dicelupkan kedalam larutan betadin sebanyak 3-4 tetes yang telah diencerkan aquadest steril didalam cawan petri. Selanjutnya potongan daun dikeringkan dengan menggunakan kertas saring steril dan ditanam dalam botol kultur yang telah berisi medium MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh (Modifikasi dari Kusumawati, *et al.*, 2015).



Gambar 3.4. Sterilisasi Eksplan daun *M. citrifolia* L. didalam Laminar

6. Penanaman eksplan daun *M. citrifolia* L.

Potongan daun yang telah melalui serangkaian tahapan sterilisasi ditanam pada medium MS yang masing-masing telah ditambahkan zat pengatur tumbuh dengan 12 kombinasi perlakuan. Posisi daun yang ditanam pada medium secara horizontal dengan bagian abaksial daun mengenai medium tersebut. Penanaman dilakukan didalam alat *Laminar Air Flow Cabinet*. Semua pengerjaan dilakukan dalam kondisi aseptik. Eksplan daun yang telah ditanam pada medium disimpan pada rak penyimpanan kultur dan diinkubasi pada suhu $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ dengan pencahayaan lunak

24 jam terang (lampu neon phillips TLD 18 watt dengan jarak 50 cm dari dasar rak).

7. Induksi kalus dari daun *M. citrifolia* L.

Eksplan daun yang telah ditanam pada medium MS dengan berbagai kombinasi penambahan zat pengatur tumbuh dimaksudkan untuk menginduksi terjadinya pembentukan kalus. Pada tahap induksi kalus dilakukan pengamatan yang meliputi waktu saat munculnya kalus, tekstur dan warna kalus. Pengamatan dilakukan sejak awal penanaman hingga pembentukan kalus yang maksimal.

8. Penentuan Hasil Kalus yang di Uji Metabolit Sekunder



Gambar 3.5. Kalus dengan tekstur kompak dan berwarna kuning kecokelatan pada kombinasi zat pengatur tumbuh 2.4-D 1.75 mg/l dan kinetin 1.5 mg/l.

Dari berbagai variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh, eksplan daun yang diamati secara visual pada setiap konsentrasinya yaitu yang menghasilkan respon pembentukan kalus. Kalus yang berpotensi dalam produksi metabolit sekunder adalah kalus kompak atau meremah dan berwarna coklat (Rosyidah, *et al.*, 2014).

9. Penimbangan Berat Basah Kalus



Annisa Nur Fazrina, 2016

ANALISIS METABOLIT SEKUNDER KALUS *Morinda citrifolia* L. PADA MEDIUM MURAHSHIGE AND SKOOG (MS) DENGAN PENAMBAHAN ZAT PENGATUR TUMBUH 2.4-D DAN KINETIN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Gambar 3.6. Penimbangan berat basah kalus secara aseptik dilakukan dalam Laminar

Kalus yang telah cukup umur dan memiliki kriteria untuk dilakukan uji fitokimia terlebih dahulu ditimbang berat basah. Kalus yang ditimbang dikeluarkan dari botol kultur secara aseptik dan pengerjaannya dilakukan didalam laminar. Untuk mendapatkan berat basah kalus, maka kalus yang masih bersatu dengan eksplan daun dipisahkan antara kalus dan eksplan daunnya.



(a) kalus dengan eksplan daun

(b) eksplan daun

(c) Kalus

Gambar 3.7. Kalus yang dipisahkan dari eksplan daun

Kalus yang telah dipisahkan dari eksplan daun dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu $60 \pm 65^{\circ}\text{C}$ selama 3 hari sampai kondisi kalus mengering. Setelah kalus kering selanjutnya dilakukan preparasi kalus.

10. Ekstraksi Kalus



Gambar 3.8. Proses penggerusan kalus yang sudah kering menjadi serbuk halus

Untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder, maka kalus harus dipreparasi terlebih dahulu. Ekstraksi kalus dilakukan dengan menggunakan metode maserasi (perendaman). Kalus yang dipreparasi yaitu kalus yang berumur 56 hari dengan kalus yang berwarna cokelat dan tekstur kalus yang meremah. Kalus yang akan diekstrak terlebih dahulu ditimbang berat basahnya dan kalus tersebut dipisahkan dari daunnya. Kalus dipanaskan menggunakan oven pada suhu 60°C selama 2x24 jam hingga kalus tersebut kering. Kalus yang telah dioven ditimbang lagi untuk mengetahui berat kering kalus. Kalus yang sudah kering digerus dengan menggunakan alu dan mortar sehingga kalus berupa serbuk halus.

Serbuk kalus yang telah halus dimasukkan kedalam erlenmeyer sebanyak 2 gram. Serbuk kalus tersebut direndam dengan ethanol absolut 95% sebanyak 100 ml dengan waktu selama 12 jam. Pada 3 jam pertama sampel kalus disonikasi dengan menggunakan *ultrasonic cleaner* 50 KHz selama 48 menit dan dilanjutkan dengan menggunakan *shaker*. Setiap 12 jam sekali perendaman kalus diganti dengan ethanol absolut 95% dan di *shaker* pada kecepatan 200 rpm.



Gambar 3.9. Proses Penyaringan sampel kalus yang telah diekstraksi

Ekstrak berupa endapan yang telah direndam kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring whatman no 42. Kertas saring sebelum digunakan terlebih dahulu dibasahi dengan ethanol absolut 95% dan ditaburkan Na_2SO_4

sebanyak 0,2 gram untuk menghilangkan endapan dan mengikat air pada filtrat. Endapan hasil saringan direndam kembali dengan ethanol 95% selama 24 jam kemudian disaring kembali menggunakan kertas saring whatman no. 42. Hasil saringan kedua dicampurkan dengan hasil saringan pertama kemudian diuapkan dalam *waterbath* dengan suhu 65°C sampai ethanol dalam sampel menguap. Sampel kalus berupa pasta yang telah diuapkan dilarutkan kembali dengan ethanol 95% sampai mencapai volume 10 ml kemudian disimpan pada botol vial (modifikasi dari Pharanthaman *et al*, 2012).

11. Analisis Metabolit Sekunder

Kalus dan daun segar *M. citrifolia* L yang telah diekstraksi kemudian dianalisis kandungan metabolit sekunder dengan menggunakan uji fitokimia secara kualitatif. Untuk mengetahui kandungan senyawa fenolik dengan pereaksi FeCl₃3% dan untuk mengetahui kandungan senyawa antrakuinon dengan pereaksi KOH 10%.



Gambar 3.10. Ekstrak kering sampel kalus *M. citrifolia* L. hasil penguapan

Sampel kalus berupa pasta yang telah diencerkan ethanol 95% dan daun segar *M. citrifolia* L. yang telah diekstraksi diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Setelah itu untuk mengidentifikasi senyawa fenolik ditetaskan peraksi FeCl₃3% sampai terlihat perubahan warna. Indikator perubahan warna yang menandakan adanya kandungan senyawa fenolik ditandai dengan warna hijau kehitaman (Modifikasi Sangi, *et al.*, 2008).

Untuk mengidentifikasi senyawa antrakuinon, sampel kalus berupa pasta yang telah diencerkan ethanol 95% dan daun segar *M. citrifolia* L. yang telah diekstraksi diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditetaskan pereaksi KOH 10% yang telah dilarutkan metanol absolut sampai terlihat perubahan warna. Indikator perubahan warna yang menandakan adanya kandungan antrakuinon diindikasikan dengan warna filtrat kuning kecokelatan (Modifikasi Setyawaty, *et al.*, 2014; Marlina, *et al.*, 2005).

E. Analisis Data

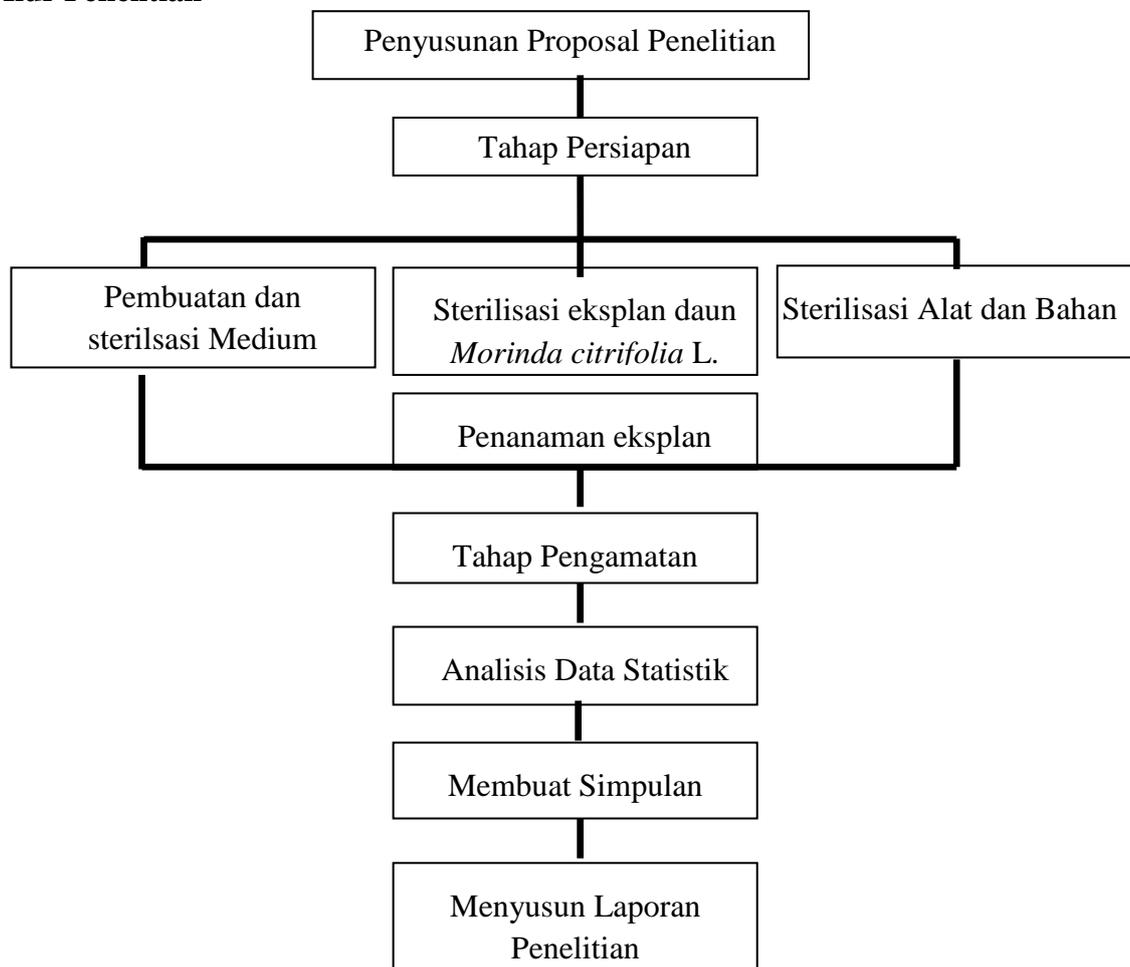
Presentase eksplan yang merespon pertumbuhan kalus dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\frac{\text{Jumlah eksplan yang tumbuh tiap perlakuan} \times 100}{\text{Jumlah ulangan tiap perlakuan}}$$

Analisis pertumbuhan kalus diwakili dengan berat basah kalus yang berumur 56 hari yang ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik, morfologi kalus dan waktu pertama muncul kalus. Untuk menguji teridentifikasinya kandungan fenolik dan antrakuinon dilakukan dengan uji fitokimia secara kualitatif.

Uji statistika yang digunakan untuk mengetahui pengaruh kombinasi zat pengatur tumbuh terhadap berat basah kalus menggunakan uji ANOVA, dan bila hasil diketahui beda nyata dilanjutkan dengan Uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) dengan tingkat signifikansi 95% ($p=0.05$) menggunakan software SPSS 16.0.

F. Alur Penelitian



Gambar 3.11. Alur Penelitian