

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk menjelaskan hubungan sebab-akibat antara satu variabel dengan variabel lainnya (Saluky, 2013). Penelitian ini menggunakan metode rancangan acak lengkap lengkap (RAL) dengan 2 faktor perlakuan yaitu jenis eksplan dan variasi kombinasi zat pengatur tumbuh (ZPT). Eksplan yang digunakan adalah daun dan batang muda *Morinda citrifolia* L. dewasa. Setiap jenis eksplan ditanam dalam medium MS (Murashige & Skoog) dengan 12 kombinasi ZPT 2,4D dan kinetin. Masing-masing kombinasi dilakukan dengan 3 kali ulangan.

Data yang diambil dalam penelitian ini berupa data kuantitatif dan kualitatif. Data kuantitatif meliputi waktu inisiasi dan rerata pertambahan berat segar (mg/hari). Data kualitatif meliputi morfologi kalus dan ada tidaknya kandungan senyawa fenolik dan antrakuinon yang dianalisis secara kualitatif.

Variabel bebas dan variabel terikat pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

Variabel bebas	: Jenis eksplan, konsentrasi ZPT
Variabel terikat	: Ada tidaknya kandungan senyawa fenolik dan antrakuinon secara kualitatif, rerata pertambahan berat segar kalus (mg/hari), waktu inisiasi, dan morfologi kalus.

Perlakuan konsentrasi ZPT pada *Morinda citrifolia* L. dilakukan dengan 3 pengulangan. Banyaknya pengulangan minimal didapatkan dari rumus Federer (1977) dengan perhitungan berikut.

$$\begin{aligned}(T - 1)(n - 1) &\geq 15 \\(12 - 1)(n - 1) &\geq 15 \\(11)(n - 1) &\geq 15 \\11n - 11 &\geq 15 \\11n &\geq 15 + 11 \\n &\geq 22/11 = 2\end{aligned}$$

Nursolihat, 2016

ANALISIS METABOLIT SEKUNDER KALUS HASIL KULTUR EKSPLAN DAUN DAN BATANG MENGKUDU

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

Keterangan : T = Jumlah Perlakuan, n = Jumlah Pengulangan

Tabel 3.1 Kombinasi 2,4 D dan kinetin pada medium MS untuk induksi kalus dari eksplan batang

Kinetin 2,4 D	1	1,25	1,5
1	BDK ₁	BDK ₂	BDK ₃
1,25	BDK ₄	BDK ₅	BDK ₆
1,5	BDK ₇	BDK ₈	BDK ₉
1,75	BDK ₁₀	BDK ₁₁	BDK ₁₂

Tabel 3.2 Kombinasi 2,4 D dan kinetin pada medium MS untuk induksi kalus dari eksplan daun

Kinetin 2,4 D	1	1,25	1,5
1	DDK ₁	DDK ₂	DDK ₃
1,25	DDK ₄	DDK ₅	DDK ₆
1,5	DDK ₇	DDK ₈	DDK ₉
1,75	DDK ₁₀	DDK ₁₁	DDK ₁₂

B. Populasi dan Sampel

1. Populasi : Seluruh kalus *Morinda citrifolia* L. hasil induksi kalus
2. Sampel : Kalus yang diuji kualitatif kandungan senyawa fenolik dan antrakuinon.

C. Prosedur Penelitian

1. Persiapan dan Pembuatan Medium MS (Murashige & Skoog)

Persiapan dan pembuatan medium MS diawali dengan pembuatan larutan stok. Setiap larutan stok medium disimpan pada botol gelap di dalam kulkas. Komponen makronutrien, ZPT dan vitamin setiap zat dibuat stok secara terpisah. Untuk komponen mikronutrien, setiap zat dilarutkan secara bersama-sama kecuali komponen Fe-EDTA. Pembuatan stok ini akan mempermudah dalam

penimbangan dan pembuatan medium. Komposisi medium MS tertera pada Lampiran 1.

Setelah pembuatan larutan stok, baru dibuat medium untuk induksi kalus. Medium yang digunakan untuk induksi kalus adalah medium MS padat dengan penambahan kombinasi ZPT 2,4 D dan kinetin (Tabel 3.1 dan 3.2). Untuk pembuatan medium satu liter, stok makronutrien, mikronutrien, vitamin dan 30 gram sukrosa dimasukan ke dalam gelas piala 1000 ml, kemudian ditambahkan akuades sampai 800 ml. Larutan dipanaskan dengan menggunakan *hot plate magenetic stirrer* sampai semua komponen terlarut dengan sempurna. Larutan MS 800 ml dibagi ke dalam 10 gelas piala 100 ml untuk 10 kombinasi ZPT masing-masing 80 ml. Setelah itu, dimasukan ZPT dan agar 0,8 gram untuk 100 ml MS kemudian ditambahkan akuades sampai volume 100 ml. pH diatur menjadi 5,6-5,8 dengan menggunakan pH meter ditambahkan beberapa tetes NaOH 1 N apabila terlalu asam atau HCl 1 N apabila terlalu basa. Setelah itu medium dipanaskan menggunakan bunsen sampai mendidih. Setiap 100 ml MS dituangkan ke dalam 10 botol kultur masing-masing 10 ml. Setiap Botol kultur ditutup dengan menggunakan alumunium foil kemudian disterilisasi autoklaf secara bersama-sama.

2. Sterilisasi Medium dan Alat dengan Autoklaf

Alat-alat yang akan digunakan serta medium penanaman MS disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121° C dan tekanan 1,5 atm. Alat-alat yang akan dimasukan ke dalam autoklaf dibungkus terlebih dahulu dengan menggunakan kerta HVS bekas. Setelah disterilisasi alat-alat dan medium disimpan pada ruang kultur.

3. Sterilisasi *Laminar Air Flow*

Sebelum sterilisasi dan penanaman eksplan di dalam *Laminar Air Flow* dilakukan, laminar dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70% kemudian *blower* laminar dibiarkan hidup untuk menyaring udara yang di dalam laminar selama 30 menit. Alat-alat yang akan digunakan untuk sterilisasi eksplan di dalam laminar, alat penanaman, serta medium MS dimasukan ke dalam laminar setelah

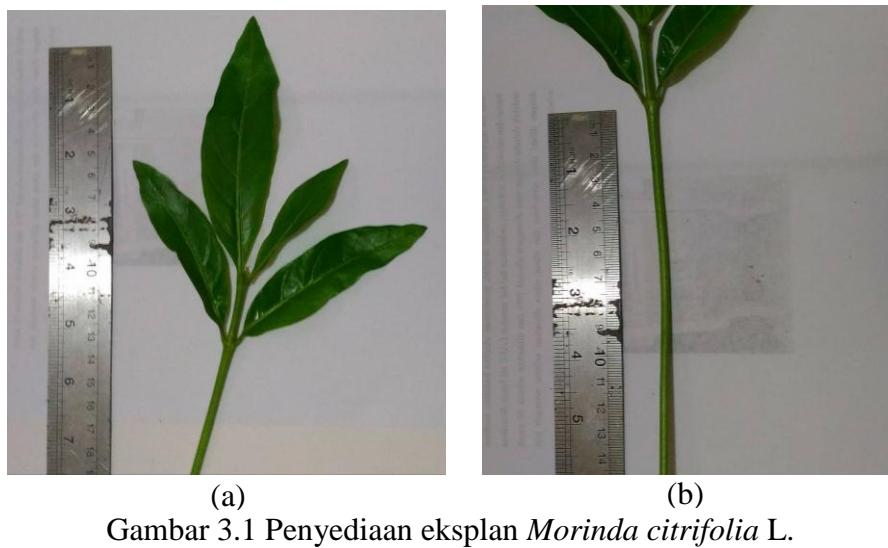
Nursolihat, 2016

**ANALISIS METABOLIT SEKUNDER KALUS HASIL KULTUR EKSPLAN DAUN DAN BATANG
MENGKUDU**

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

disemprot terlebih dahulu dengan alkohol 70%. Kaca laminar ditutup dengan kain gelap kemudian dilakukan sterilisasi dengan sinar *Ultra-violet* selama 1 jam.

4. Penyediaan Eksplan



Gambar 3.1 Penyediaan eksplan *Morinda citrifolia* L.
(a) Eksplan daun, (b) Eksplan batang

Eksplan yang digunakan adalah potongan jaringan batang dan daun *Morinda citrifolia* L.. Potongan daun diambil dari daun kedua dan ketiga yang lebar dan masih berwarna hijau muda, sedangkan potongan batang diambil dari batang muda yang belum keras dan berkayu, 10 cm dibawah pucuk. Eksplan daun dan batang diperoleh dari pohon *Morinda citrifolia* L. yang berada di parkiran gate II Universitas Pendidikan Indonesia (UPI).

5. Sterilisasi Eksplan

Seterilisasi Eksplan batang dan daun pada penelitian ini merupakan modifikasi dari metode yang digunakan oleh Kusumawati, *et al.* (2015). Tahapan pertama yaitu seterilisasi di luar laminar. Daun ke-2,3 dan batang 10 cm di bawah pucuk *Morinda citrifolia* L. dibersihkan dengan sikat gigi pada air mengalir sampai bersih, kemudian daun dipotong menjadi 3x3 cm dan batang dipotong menjadi 2 cm menggunakan pisau kecil lalu dimasukan ke dalam cawan petri. Daun dan batang yang telah dipotong dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Selanjunya, daun dan batang direndam dalam larutan detergen 2,5% selama 15 menit kemudian bilas dengan air mengalir sampai busa hilang. Setelah itu, daun Nursolihat, 2016

ANALISIS METABOLIT SEKUNDER KALUS HASIL KULTUR EKSPLAN DAUN DAN BATANG MENGKUDU

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

direndam dalam fungisida Benstar® dan bakterisida Agrep® 0,2 % masing-masing selama 30 menit sedangkan batang direndam dalam fungisida Benstar® dan bakterisida Agrep® 2 % masing-masing selama 60 menit kemudian dibiarkan di bawah air mengalir selama 30 menit.



Gambar 3.2 Sterilisasi eksplan di dalam *Laminar Air Flow*

Tahapan kedua adalah sterilisasi di dalam laminar. Daun dan batang pada cawan petri yang telah disterilisasi di luar laminar disemprot dengan alkohol 70% kemudian dimasukan ke dalam laminar yang telah disterilisasi UV (*ultra violet*) selama 1 jam. Daun dan batang dimasukan ke dalam Erlenmeyer 250 ml steril kemudian direndam dengan alkohol 70% selama 5 menit, Bayclin 50%, 25% dan 10% masing-masing 10 menit. Setelah itu daun dan batang dibilas dengan akuades yang disterilisasi autoklaf 2x sebanyak 3x masing-masing 10 menit.

6. Penanaman dan Induksi Kalus

Setelah dibilas akuades 3x, ekplan daun dipotong dengan menggunakan *steril blade* menjadi 2x1 cm dan eksplan batang dipotong menjadi 1,5 cm. Sebelum eksplan ditanam pada medium MS, eksplan yang telah dipotong dilukai terlebih dahulu. Daun dilukai dibagian abaksial sedangkan batang dilukai di bagian yang akan ditempelkan medium. Setelah itu eksplan dicelupkan terlebih dahulu dengan larutan Betadine yang telah diencerkan dengan akuades steril pada botol kecil kemudian dicelupkan kembali pada akuades steril. Setelah itu, eksplan ditanam pada medium kultur yang berisi MS padat. Masing-masing botol kultur berisi 2 atau 3 eksplan.

Nursolihat, 2016

ANALISIS METABOLIT SEKUNDER KALUS HASIL KULTUR EKSPLAN DAUN DAN BATANG MENGIKUDU

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

7. Ruang Kultur



Gambar 3.3 Botol-botol kultur yang telah di tanami oleh eksplan

Eksplan daun dan batang yang telah ditanam dalam botol-botol kultur disimpan pada rak yang telah dibersihkan dengan alkohol 70% dengan penyinaran terus menerus selama 24 jam menggunakan lampu neon Phillips TLD 18 Watt dengan intensitas cahaya 1500 lux. Suhu ruangan kultur yang digunakan adalah 26°C. Rak-rak kultur di semprot dengan alkohol 70% dan formalin 5% dua hari sekali.

8. Penimbangan Berat Basah Kalus



Gambar 3.4 Penimbangan Berat Basah Kalus

Penimbangan berat basah kalus dilakukan di dalam laminar secara aseptik dan steril. Kalus yang akan ditimbang dikeluarkan dari dalam botol kultur kemudian diletakan di atas cawan petri steril yang disimpan di atas timbangan yang telah dibersihkan dengan alkohol 70%. Sebelum penimbangan kalus, timbangan dikalibrasi terlebih dahulu dengan menekan tombol *rezero*.

9. Ekstraksi

Sampel kalus yang akan dianalisis diekstraksi dengan menggunakan metode ekstrasi maserasi dan *ultrasound* dengan menggunakan pelarut ethanol 95 %. Metode yang digunakan merupakan modifikasi dari Paranthaman, *et al.* (2012). Sampel daun segar, batang segar, kalus dari eksplan dan batang dikeringkan dengan menggunakan oven suhu 60°C selama tiga hari. Kalus, daun dan batang segar yang telah kering kemudian digerus dengan menggunakan mortar dan alu sampai halus. Sampel kering direndam dalam ethanol 95% dengan perbandingan (1: 50 w/v) selama 24 jam pada gelas piala 100 ml. Tiga jam pertama sampel disonikasi dengan menggunakan *ultrasonic cleaner* 50 KHz selama 48 menit.



Gambar 3.5 Proses ekstraksi maserasi dengan ethanol 95 %

Setelah 24 jam proses maserasi, sampel disaring menggunakan kertas saring Whatman no. 42 yang telah dibasahi dengan ethanol 95% sampai jenuh dan ditaburi 0,2 gram Na₂SO₄. Endapan hasil saringan direndam kembali dengan

ethanol 95% selama 24 jam kemudian disaring kembali dengan kertas saring. Hasil saringan kedua dicampurkan dengan hasil saringan pertama kemudian diuapkan dalam waterbath 65°C sampai semua ethanol dalam sampel menguap. Sampel yang telah diuapkan dilarutkan kembali dengan ethanol 95% sampai 10 ml kemudian disimpan pada botol vial.

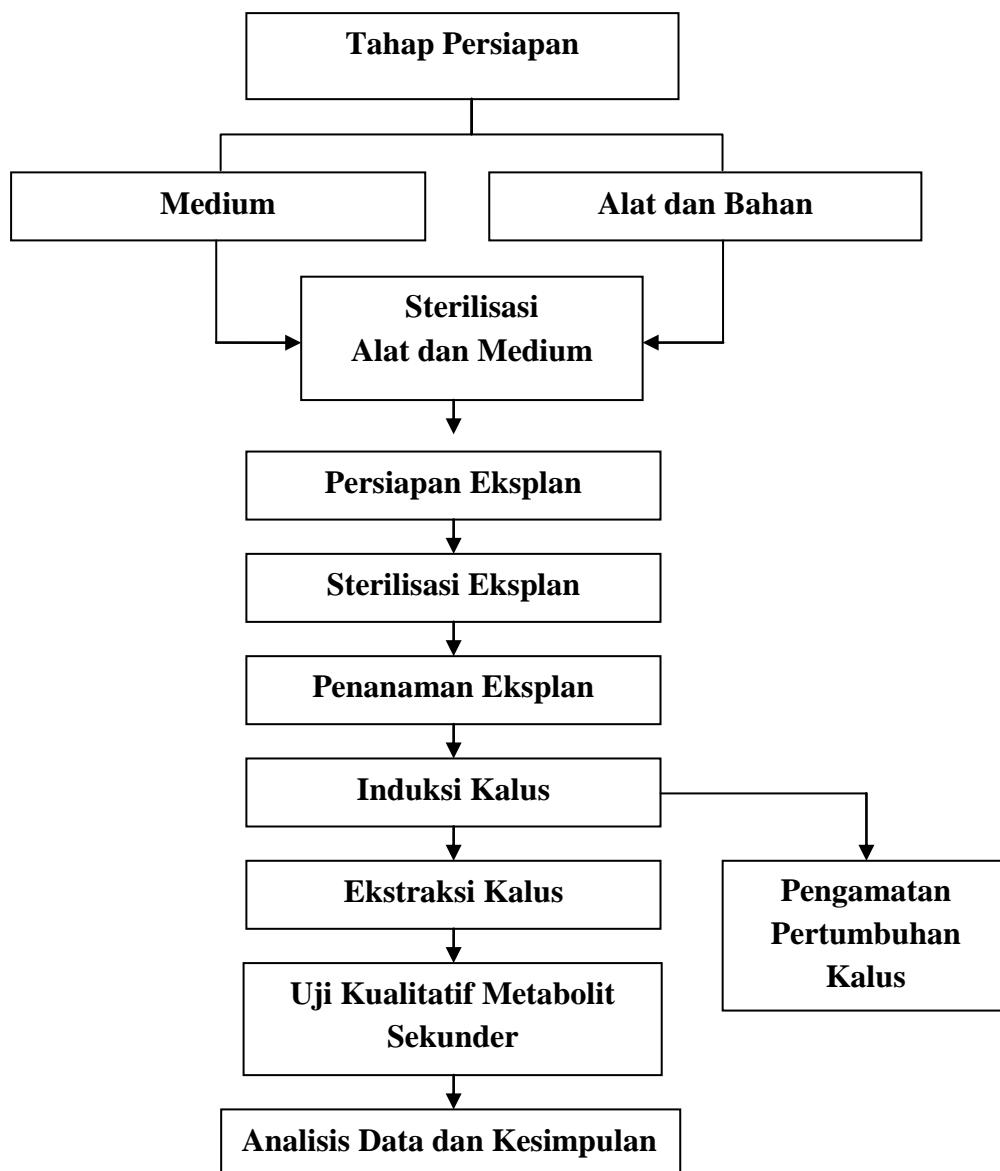
10. Analisis Kualitatif Senyawa Fenolik dan Antrakuinon

Sampel daun segar, batang segar, kalus daun dan batang yang telah di ekstraksi diencerkan kembali dengan ethanol 95%. Setiap 1 ml sampel dimasukan ke dalam tabung reaksi untuk masing-masing pengujian senyawa fenolik dan antrakuinon. Uji kualitatif fenolik pada sampel dilakukan dengan menambahkan larutan FeCl 3% sebanyak 1 ml. Uji kualitatif antrakuinon pada sampel dilakukan dengan menambahkan larutan KOH 10% sebanyak 1 ml (Modifikasi dari Setyawaty, *et al.*, 2014). Kemudian dilihat masing-masing perubahan warna pada sampel yang telah ditambah dengan pereaksi.

D. Analisis Data

Rerata pertambahan berat basah kalus (mg/hari) dari eksplan batang dan daun, dianalisis dengan uji statistik one way Anova pada tingkat kepercayaan 95%. Jika hasil uji Anova menunjukkan adanya perbedaan yang nyata, maka analisis dilanjutkan dengan uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) pada tingkat kepercayaan 95 % (p: 005).

E. Alur Penelitian



Bagan 3.1 Alur penelitian analisis metabolit sekunder kalus hasil kultur eksplan daun dan batang *Morinda citrifolia* L.