

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 (RAL) faktorial dengan 2 faktor perlakuan. Faktor pertama adalah lima konsentrasi elisitor kitosan yaitu 0; 0,25; 0,5; 0,75; dan 1 mg ml⁻¹. Faktor kedua adalah lama elisitasi, yaitu 0, 2, 4, dan 6 hari. Rancangan percobaan dapat diamati pada tabel Tabel 3.1.

Banyaknya pengulangan minimal didapatkan dari rumus Federer (1977) dengan perhitungan berikut :

$$(T-1)(n-1) \geq 15$$

$$(9-1)(n-1) \geq 15$$

$$8n \geq 15 + 8$$

$$n \geq 23/8$$

$$n \geq 2,88$$

Keterangan : T = Jumlah Perlakuan, n = Jumlah Pengulangan

Berdasarkan rumus tersebut, maka perlakuan konsentrasi kitosan pada *Morinda citrifolia* masing-masing dilakukan dalam 3 kali ulangan, sehingga secara keseluruhan menghasilkan 60 kombinasi perlakuan.

Data yang diambil dalam penelitian ini berupa data kuantitatif dan kualitatif. Data kuantitatif berupa kandungan senyawa antrakuinon *Morinda citrifolia* setelah dielisitasi dengan kitosan. Data kualitatif berupa morfologi kalus meliputi warna dan tekstur kalus. Variabel bebas dan variabel terikat pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Variabel bebas : Konsentarsi kitosan yang terdiri dari K0 (kontrol) = 0,0 mg/ml, K1 = 0,25 mg/ml, K2 = 0,5 mg/ml, K3 = 0,75 mg/ml, K4 = 1,0 mg/ml dan lama elisitasi terdiri dari L0 = 0 hari, L1 = 2 hari, L2= 4 hari, L3 = 6 hari
2. Variabel terikat : Kandungan senyawa antrakuinon

Dibawah ini merupakan tabel rancangan percobaan penelitian untuk perlakuan elisitasi pada kalus *M. citrifolia*.

Tabel 3.1. Tabel Rancangan Percobaan Penelitian

Perlakuan Hari ke	K0	K1	K2	K3	K4
L0	K0L0	K1L0	K2L0	K3L0	K4L0
L1	K0L1	K1L1	K2L1	K3L1	K4L1
L2	K0L2	K1L2	K2L2	K3L2	K4L2
L3	K0L3	K1L3	K2L3	K3L3	K4L3

Keterangan :

K0 : Konsentrasi elisitor 0,0 mg ml⁻¹
 K1 : Konsentrasi elisitor 0,25 mg ml⁻¹
 K2 : Konsentrasi elisitor 0,50 mg ml⁻¹
 K3 : Konsentrasi elisitor 0,75 mg ml⁻¹
 K4 : Konsentrasi elisitor 1,0 mg ml⁻¹

Keterangan :

L0 : Lama elisitasi 0 hari
 L1 : Lama elisitasi 2 hari
 L2 : Lama elisitasi 4 hari
 L3 : Lama elisitasi 6 hari

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari hingga bulan Agustus 2017 di Laboratorium Botani dan Laboratorium Riset Biologi Universitas Pendidikan Indonesia.

C. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat untuk: pembuatan larutan stok dan pembuatan media, penanaman eksplan, pembuatan elisitor, elisitasi, dan analisis kandungan senyawa antrakuinon. Alat yang digunakan tertera pada lampiran 1.

D. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan-bahan untuk: pembuatan larutan stok dan pembuatan media MS, penanaman eksplan, pembuatan elisitor, elisitasi, dan analisis kandungan senyawa antrakuinon. Bahan-bahan yang digunakan terlampir pada lampiran 1.

E. Prosedur Penelitian

Prosedur dalam penelitian ini meliputi :

1. Persiapan

a. Pembuatan Larutan Stok

Larutan stok yang dibuat yaitu larutan stok makronutrien, mikronutrien, zat besi, vitamin, dan larutan stok zpt. Langkah pembuatan larutan stok tertera pada lampiran 2.

b. Pembuatan Media

Media yang digunakan untuk inisiasi kalus adalah media Murashige dan Skoog padat. Untuk pembuatan satu liter media, gelas piala diisi akuades steril sebanyak 500 ml dan diberi *magnetic stirrer*, simpan diatas *hot plate*. Selanjutnya 30 gram sukrosa, 20 ml larutan stok A (NH_4NO_3), 20 ml larutan stok B (KNO_3), 10 ml larutan stok C ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 10 ml larutan stok D ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dan KH_2PO_4), 5ml larutan stok E ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan Na_2EDTA), 1 ml larutan stok mikronutrien, 1 ml larutan stok vitamin dan 1 ml myo-inositol dimasukkan ke dalam gelas piala. Kemudian ditambahkan zpt 2,4-D dan kinetin 200 ppm dengan konsentrasi 1,75 : 1,5 masing-masing 8,75 ml dan 7,5 ml. Diaduk hingga larut merata menggunakan *magnetic stirrer*, larutan diterakan hingga 1000 ml. Setelah larutan merata, larutan diukur pH nya, pH di atur menjadi 5,7 - 5,8 dengan menggunakan pH meter. Caranya *probe* pH meter dibilas terlebih dahulu dengan akuades, lalu *probe* dikalibrasi menggunakan pH 7 sampai pH meter menunjukkan angka 7, kemudian *probe* dibilas lagi, dan *probe* dimasukkan ke dalam media. Apabila pH dibawah 5,7 maka ditambahkan beberapa tetes NaOH 1 N, dan apabila terlalu basa maka ditambahkan HCl 1 N, selanjutnya *probe* dibilas lagi dengan menggunakan akuades. Setelah selesai ditambahkan 8 gram bahan pematat media (agar) sambil diaduk dan dipanaskan di atas alat pemanas. Apabila larutan terlihat jernih dan sudah mendidih, pemanasan dihentikan. Larutan disaring dengan menggunakan saringan lalu dituangkan kedalam botol kultur, mulut botol ditutup rapat dengan menggunakan plastik bening tahan panas kemudian dililitkan karet pada leher botol. Selanjutnya dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121 °C tekanan 1 atm atau 15 psi

selama 20-40 menit. Setelah matang, media tanam disimpan di rak-rak pada ruang kultur.

c. Sterilisasi Medium dan Alat dengan Autoklaf

Alat-alat serta medium MS yang akan dipakai saat penanaman harus dalam keadaan steril. Alat tanam seperti pinset, *steril blade*, botol, *petridish*, terlebih dahulu disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121° C dan tekanan 1,5 atm. Alat-alat yang akan dimasukkan ke dalam autoklaf dibungkus terlebih dahulu dengan menggunakan kerta HVS bekas. Setelah disterilisasi alat-alat dan medium disimpan pada ruang kultur.

d. 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 ada di dalam laminar selama 30 menit. Alat-alat yang akan digunakan untuk sterilisasi eksplan di dalam laminar, alat penanaman, serta medium MS dimasukkan ke dalam laminar setelah disemprot terlebih dahulu dengan alkohol 70% (Gambar 3.1.). Kaca laminar ditutup dengan kain gelap kemudian dilakukan sterilisasi dengan sinar *Ultra-violet* selama 1 jam.



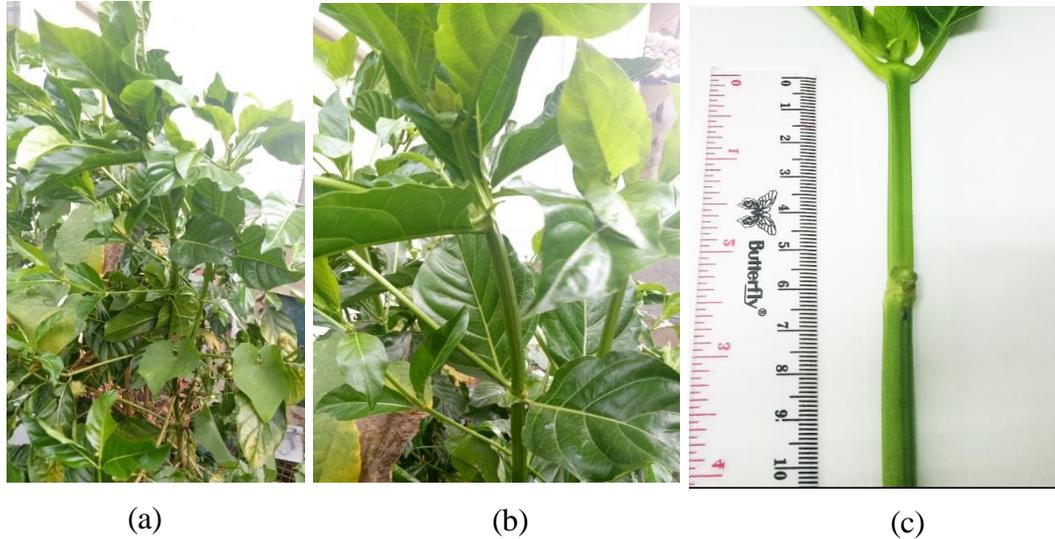
Gambar 3.1. Alat dan Bahan yang Digunakan untuk Sterilisasi dan Penanaman Eksplan

2. Inisiasi Kalus

a. Penyediaan Eksplan

Eksplan yang digunakan adalah potongan jaringan batang *Morinda citrifolia* (L.) (Gambar 3.2. (c)). Eksplan batang diperoleh dari pohon

Morinda citrifolia (L.) yang berada di samping FPTK UPI (Gambar 3.2.(a)). Potongan batang diambil dari batang muda yang belum keras dan berkayu, 5 cm dibawah pucuk (Gambar 3.2.(b)).



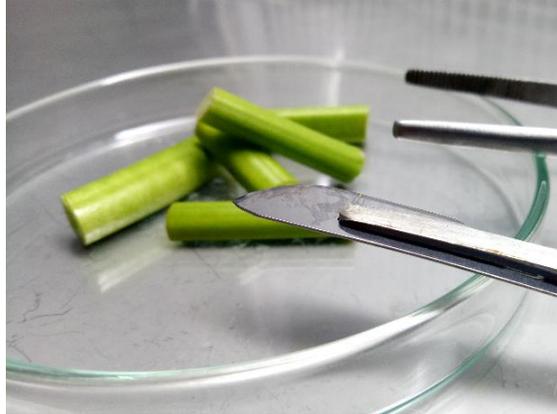
Gambar 3.2. Penyediaan Eksplan *Morinda Citrifolia*
(A) Sumber Eksplan Berasal dari FPTK, (B) Batang Muda
Morinda Citrifolia, (C) Eksplan Batang

b. Sterilisasi Eksplan

Seterilisasi eksplan batang pada penelitian ini merupakan modifikasi dari metode yang digunakan oleh (Kusumawati, dkk., 2015). Tahapan pertama yaitu seterilisasi di luar laminar. Batang 10 cm di bawah pucuk *Morinda citrifolia* dibersihkan dengan sikat gigi pada air mengalir sampai bersih, dipotong menjadi 2 atau 3 bagian menggunakan *steril blade* lalu dimasukkan ke dalam cawan petri (Gambar 3.3.). Batang yang telah dipotong dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Selanjutnya batang direndam dalam larutan detergen 2,5% selama 15 menit kemudian bilas dengan air mengalir sampai busa hilang. Setelah itu, batang direndam dalam fungisida Benstar® dan bakterisida Agrep® 2 % masing-masing selama 60 menit, kemudian dibiarkan di bawah air mengalir selama 30 menit.

Tahapan kedua adalah sterilisasi di dalam laminar. Batang pada cawan petri yang telah disterilisasi di luar laminar disemprot dengan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam laminar yang telah disterilisasi UV (*ultra violet*) selama 1 jam. Batang dipindahkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml steril

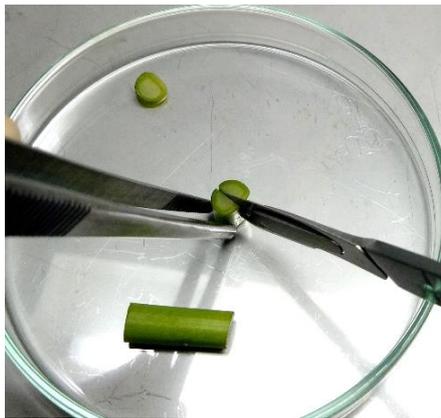
kemudian direndam dengan alkohol 70% selama 5 menit, Bayclin 40%, dan 20% masing-masing 10 menit. Setelah itu, batang dibilas dengan akuades steril 2x sebanyak 3x masing-masing 10 menit.



Gambar 3.3. Eksplan Batang dipotong menjadi 2 atau 3 Bagian

c. Penanaman eksplan

Setelah dibilas akuades 3x, eksplan batang dipotong menjadi 1 cm kemudian disayat menjadi 2 bagian (Gambar 3.4.). Sebelum eksplan ditanam pada medium MS, eksplan yang telah dipotong dilukai terlebih dahulu. Batang dilukai di dibagian yang akan kontak langsung dengan medium (Gambar 3.5).



Gambar 3.4. Eksplan Batang dipotong menjadi 2 Bagian



Gambar 3.5. Eksplan Batang dilukai terlebih dahulu

Setelah itu eksplan dicelupkan terlebih dahulu ke dalam larutan *Betadine* yang telah diencerkan dengan akuades steril pada botol kecil kemudian dicelupkan kembali pada akuades steril. Setelah itu, eksplan

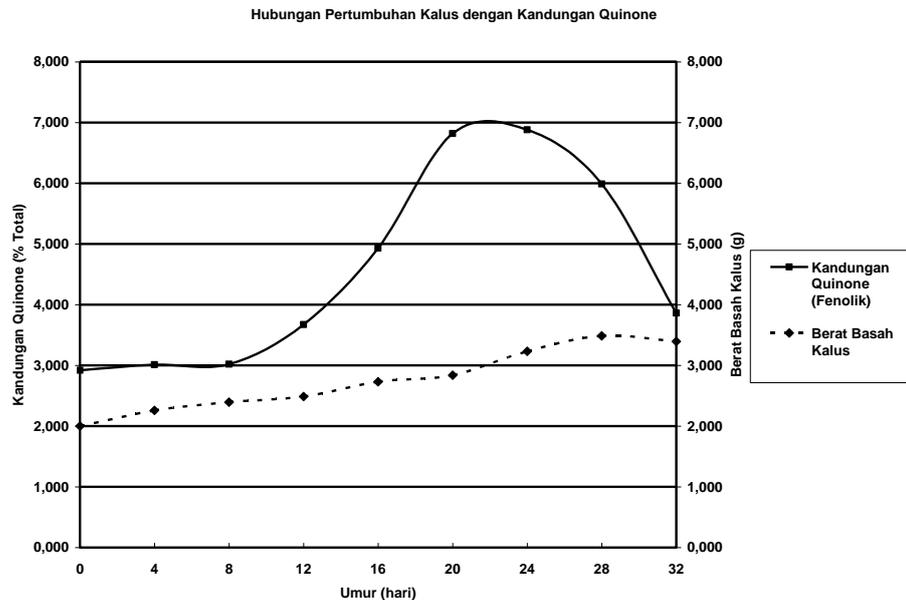
ditanam pada medium kultur yang berisi MS padat. Masing-masing botol kultur berisi 2 atau 3 eksplan.

d. Subkultur Kalus

Kalus yang dihasilkan dari medium induksi disubkultur pada medium yang sama setelah kalus berumur 16 minggu atau sebagian besar eksplan tertutup kalus. Subkultur juga dilakukan saat mulai nampak tanda-tanda kalus kekurangan nutrisi. Kalus disubkultur sebanyak dua kali untuk menyiapkan sel agar siap diberi perlakuan elisitor.

e. Pengukuran Kurva Tumbuh Kalus

Kurva tumbuh kalus diperoleh dari penelitian sebelumnya (Purwianingsih & Hamdiyati, 2007). Pengukuran kurva tumbuh dilakukan dengan cara kalus subkultur pertama dipindahkan ke medium baru, kemudian dilakukan pengukuran pertambahan berat dengan interval 4 hari selama 32 hari. Berdasarkan data tersebut dibuat kurva pertumbuhan kalus.



Gambar 3.6. Kurva Pertumbuhan Kalus *M. Citrifolia* (Purwianingsih & Hamdiyati, 2007)

Hubungan pertumbuhan kalus dengan kandungan kuinon (Gambar 3.6.) dapat digunakan untuk menentukan kapan elisitasi dilakukan. Berdasarkan kurva tumbuh tersebut ditentukan waktu elisitasi pada saat

kalus berada pada fase pertumbuhan eksponensial yaitu pada hari ke-19 setelah subkultur .

3. Persiapan Bahan Elisitor

Pada penelitian ini digunakan elisitor kitosan yang berasal dari kulit udang windu (Gambar 3.7.). Kitosan dihasilkan setelah melalui beberapa tahapan yaitu pengeringan dan ekstraksi.



Gambar 3.7. Kulit Udang Windu

Metode ekstraksi kitin dari kulit udang menggunakan metode (Alfiah, 2013), sebagai berikut:

a. Pengeringan

Cangkang kulit udang diperoleh dari restoran Bali Seafood Bandung. Kulit udang yang digunakan adalah udang windu (*Penaeus monodon*). Kulit udang dipisahkan dari bagian tubuh lainnya seperti kaki dan ekor. Bagian kulit udang yang dipakai adalah kulit bagian tubuh dan kepala. Mula-mula kulit udang direbus, dicuci dengan air mengalir sampai bersih (Gambar 3.8). Selanjutnya kulit udang dikeringkan dibawah sinar matahari. Setelah kering, kulit udang digiling menggunakan blender sampai halus dan diayak menggunakan ayakan 0,25 mm.



Gambar 3.8. Pencucian Kulit Udang

b. Ekstraksi Kitin dari Kulit Udang menjadi Kitosan

1) Demineralisasi

Demineralisasi bertujuan untuk menghilangkan senyawa CaCO_3 . Serbuk kulit udang ditambahkan dengan larutan HCl 1,5 M dengan perbandingan 1; 15 (b/v). Campuran dipanaskan pada suhu 70-80 °C selama 4 jam sambil diaduk pada 50 rpm menggunakan homogenizer. Padatan dari serbuk kulit udang kemudian dipisahkan, dengan cara disaring. Setelah disaring, padatan yang diperoleh dicuci dengan akuades untuk menghilangkan HCl yang tersisa. Pencucian dengan akuades ini dilakukan sampai pH netral. Pengukuran pH dilakukan dengan mencelupkan kertas pH indikator pada bagian serbuk kulit udang dalam kondisi basah. Padatan dikeringkan dengan oven pada suhu 70 °C selama 24 jam. Sehingga diperoleh serbuk kulit udang tanpa mineral. Selanjutnya serbuk kulit udang ditimbang untuk mengetahui beratnya.

2) Penghilangan Protein(Deproteinasi)

Deproteinasi bertujuan untuk menghilangkan kandungan protein pada kitin. Deproteinasi dilakukan dengan menambahkan NaOH 3,5 % dengan perbandingan 1: 10 (b/v). Campuran serbuk kulit udang tanpa mineral dengan NaOH 3,5 % selanjutnya dipanaskan pada suhu 65-70 °C selama 4 jam. Proses ini dilakukan sambil diaduk pada 50 rpm menggunakan homogenizer dan termometer sebagai pengukur suhunya. Setelah 4 jam, padatan dipisahkan dari sisa campuran NaOH dengan cara disaring dan didinginkan, serta dicuci dengan akuades berkali-kali sampai pH netral. Pengukuran pH dilakukan dengan mencelupkan kertas pH indikator pada bagian serbuk kulit udang dalam kondisi basah, sehingga diperoleh kitin. Kitin yang diperoleh selanjutnya dikeringkan menggunakan oven pada suhu 90 °C selama 2 jam. Kemudian dilakukan penimbangan terhadap serbuk kitin kering yang merupakan hasil dari tahap deproteinasi.

3) Deasetilasi

Proses deasetilasi kitin menjadi kitosan, dilakukan dengan penambahan NaOH 60%. Serbuk kitin dari hasil tahap deproteinasi

dimasukan ke dalam gelas beaker dan ditambahkan arutan NaOH 60% dengan perbandingan 1:20. Proses deasetilasi ini dilakukan pada suhu 120 °C, digunakan termometer sebagai pengukur suhunya. Proses ini berlangsung selama 4 jam, serta menggunakan homogenizer pada kecepatan 50 rpm. Setelah 4 jam, padatan dipisahkan dari sisa campuran NaOH dengan cara disaring dan didinginkan serta dicuci dengan akuades berkali-kali sampai pH netral. Pengukuran pH dilakukan dengan mencelupkan kertas pH indikator pada bagian serbuk kitin dalam kondisi basah. Selanjutnya, padatan yang sudah netral tersebut dikeringkan pada suhu 70-80 °C menggunakan oven selama 24 jam. Setelah serbuk kering (Gambar 3.5.) tahap selanjutnya adalah dilakukan karakterisasi kitosan dengan spektrofotometer fir. Uji FTIR dilakukan di Laboratorium Instrumen Kimia UPI untuk mengetahui derajat deasetilasi dari serbuk kitosan. Derajat deasetilasi dapat diketahui berdasarkan nilai absorbansi gugus fungsi dengan menganalisis spektra hasil FTIR.

4) Penentuan Derajat Deasetilasi

Hasil uji FTIR menunjukkan nilai absorbansi dari gugus fungsi pada sampel. Adapun derajat deasetilasi ditentukan untuk mengetahui seberapa besar kitin yang sudah berubah menjadi kitosan. Derajat deasetilasi kitosan ditentukan berdasarkan rumus :

$$DD = 100 - [(A_{1655}/A_{3450}) \times 100 / 1,33] \text{ (Khan, 2002)}$$

4. Proses Pelarutan Elisitor Kitosan

Serbuk kitosan yang sudah diketahui derajat deasetilasinya ditimbang sebanyak 1 gram. Serbuk kitosan tersebut dilarutkan dalam asam asetat glasial 1% sebanyak 80 ml pada suhu 40 °C selama 30 menit diatas *hot plate*. Kemudian larutan diterakan sampai 100 ml, kemudian kembali dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Didapatkan kitosan dengan konsentrasi dengan konsentrasi 10 mg/ml, untuk konsentrai 0,25, 0,5, 0,75, dan 1 mg/ml dilakukan dengan cara pengenceran menggunakan akuades steril (Lampiran 3).

5. Elisitasi

Elisitasi dilakukan dengan menambahkan elisitor dengan konsentrasi yang merupakan modifikasi dari Baque, dkk. (2012) yaitu 0,25; 0,5; 0,75; dan 1

mg/ml. Pada kalus kontrol ditambahkan akuades steril. Elisitor disuntikan pada kalus, masing-masing sebanyak 0,5 ml untuk setiap 2 gram kalus (Purwianingsih & Hamdiyati, 2007). Kalus yang akan dielisitasi adalah kalus yang telah mengalami 2 kali subkultur (Purwianingsih & Hamdiyati, 2007). Pemanenan hasil elisitasi dilakukan hari ke- 0, 2, 4, dan 6 hari setelah elisitasi.

6. Penetapan Kandungan Antrakuinon

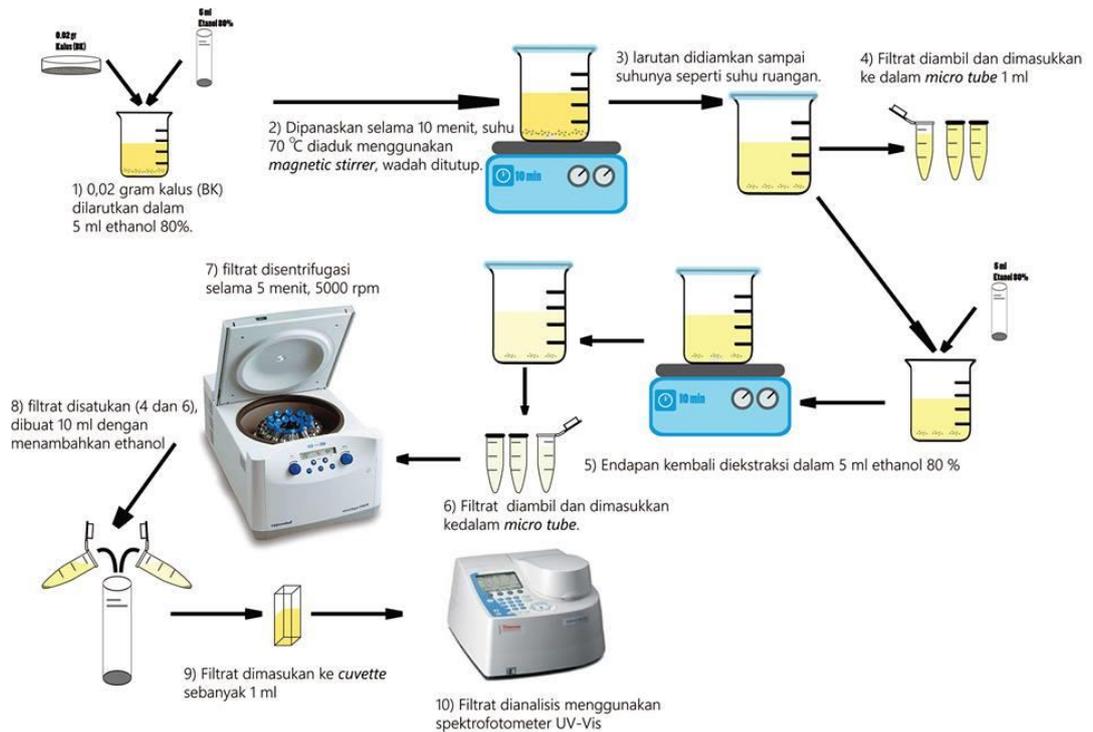
a. Ekstraksi Antrakuinon

Ekstraksi antrakuinon menggunakan metode yang dimodifikasi dari Hagendoorn (1994). Kalus *M. citrifolia* diambil dari eksplan dengan menggunakan *steril blade*. Kalus kemudian ditimbang untuk mengetahui berat basahnya kemudian di oven pada suhu 50 °C sampai diperoleh berat konstan, selanjutnya kalus digerus menggunakan mortar dan pestle hingga halus.

Kalus kering sebanyak 0,02 gram diekstraksi dalam 5 ml etanol 80% selama 10 menit di atas *hot plate* pada suhu 70 °C sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*, wadah terlebih dahulu ditutup menggunakan plastik *wrapping* untuk menghindari penguapan. Setelah 10 menit larutan didiamkan sampai suhu kembali seperti suhu ruangan. Filtrat diambil dan dimasukkan ke dalam *micro tube* 1 ml, kemudian endapan kembali diekstraksi dalam 5 ml ethanol 80 % dengan cara yang sama sampai warna kuning kalus hilang. Biasanya warna kuning kalus hilang hanya dengan 2x ekstraksi. Filtrat kembali diambil dan dimasukkan kedalam *micro tube*. Filtrat kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. Setelah disentrifugasi seluruh filtrat disatukan (filtrat dari hasil ekstraksi pertama dan kedua), dibuat sampai 10 ml dengan menambahkan ethanol 80%.

b. Pengukuran Kandungan Antrakuinon

Filtrat hasil ekstraksi diambil 1 ml kemudian dimasukkan kedalam kuvet. Nilai absorbansi dan kandungan antrakuinon diukur dengan spektrofotometer UV-visible (Genesys 10 UV) pada panjang gelombang 434 nm, dengan ethanol digunakan sebagai blanko. Kadar antrakuinon dihitung menggunakan kurva standar alizarin yellow.



Gambar 3.9. Langkah Penetapan Kandungan Antraquinon

c. Pembuatan Kurva Standar Alizarin

Alizarin (1,2-dihydroanthraquinone) adalah komponen utama antraquinon (Tripathi, 1997). Alizarin merupakan pewarna dalam hal ini alizarin kuning jika dilarutkan menghasilkan warna yang sama dengan filtrat hasil ekstraksi kalus yaitu kuning, sehingga alizarin digunakan sebagai larutan standar untuk membuat kurva standar. Kurva standar alizarin diperoleh dengan memasukkan nilai absorbansi larutan alizarin pada berbagai rentang konsentrasi, mulai dari 1 ppm sampai 10 ppm. Pertama dibuat larutan baku alizarin 10 ppm sebanyak 100 ml dengan menggunakan pelarut ethanol, selanjutnya dibuat variasi konsentrasi alizarin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 9 ppm sebanyak 10 ml dengan cara diencerkan. Kemudian setiap konsentrasi alizarin diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-visible (Genesys 10 UV) pada panjang gelombang 434. Nilai absorbansi dimasukkan ke dalam *microsoft excel* untuk pengolahan data, sehingga diperoleh persamaan kurva standar alizarin.

Persamaan kurva standar alizarin yang diperoleh sebagai berikut :

$$y = 0,0174 x + 0,0029$$

$$Y = 0,0174X + 0,0029$$

Dimana y = absorbansi sampel (nm), x = konsentrasi sampel (mg/ml)

d. Perhitungan Kandungan Antrakuinon

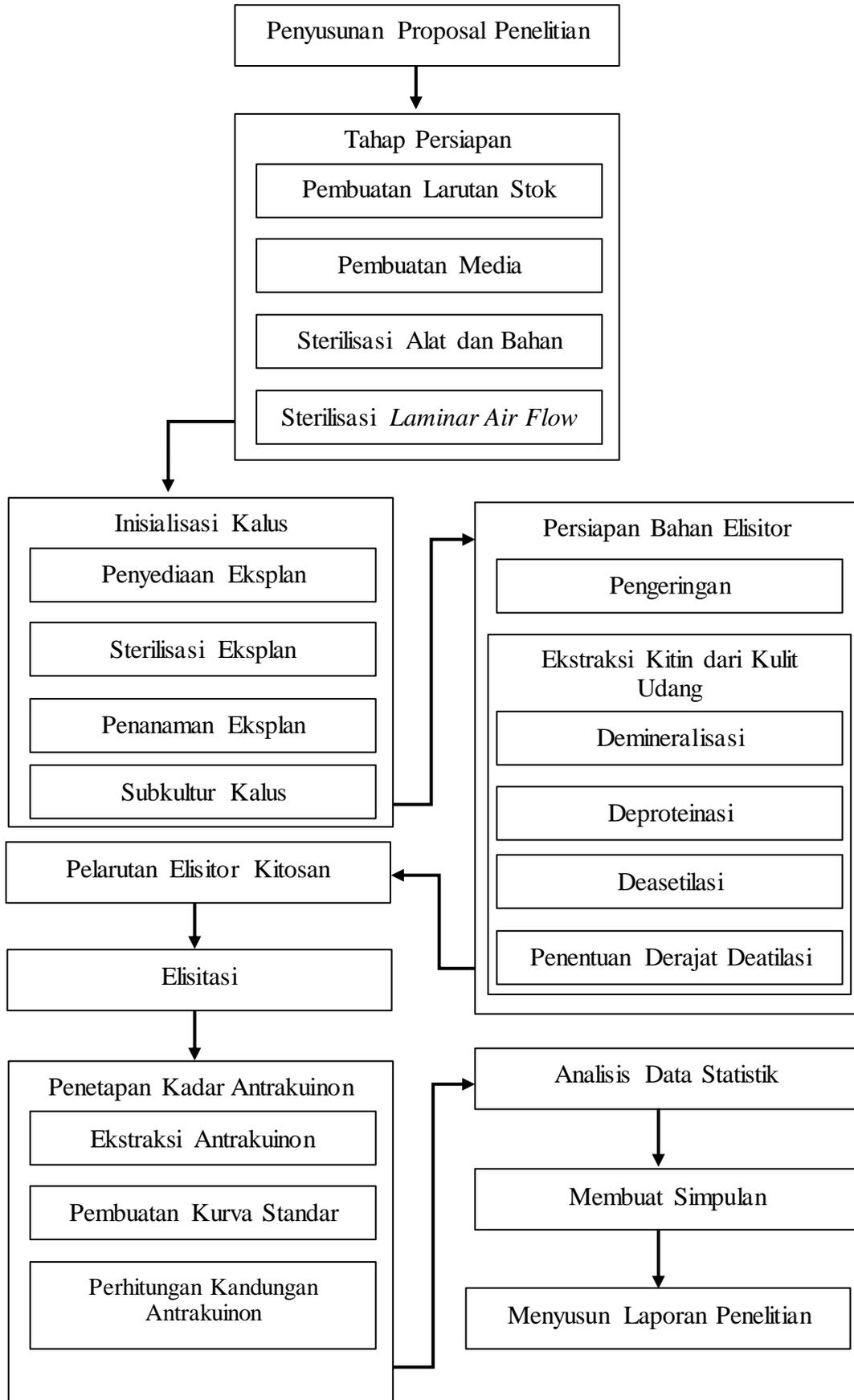
Kandungan antrakuinon dalam setiap gram kalus (BK) *M. citrifolia* dihitung dengan rumus sebagai berikut (Temiyaputra, dkk., 2008)

$$\text{Kandungan Antrakuinon (mg/g)} = \frac{\text{konsentrasi sampel preparasi } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) \times \text{volume ethanol (ml)}}{\text{berat kering kalus yang digunakan (g)}}$$

7. Analisis Data

Analisis data statistik dilakukan dengan analisis ANAVA dalam rancangan acak lengkap (RAL) faktorial dengan tiga kali ulangan pada tingkat kepercayaan 95 %. Jika hasil uji Anava menunjukkan adanya perbedaan yang nyata, maka analisis dilanjutkan dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada tingkat kepercayaan 95 %. Uji statistik dilakukan dengan menggunakan Program Statistika SAS University Edition.

8. Alur Penelitian



lin Asrinah, 2017

Gambar 3.8. Alur Penelitian

ELISITASI SENYAWA ANTRAKUINON PADA KALUS BATANG MORINDA CITRIFOLIA (L.) DENGAN MENGGUNAKAN KITOSAN DARI KULIT UDANG WINDU (PENAEUS MONODON)

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

