

### III. BAHAN DAN METODE

#### 3.1 Tempat dan waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biotek Universitas Islam Riau (UIR) dan di Laboratorium Kimia Organik Universitas Negeri Riau (UR). Pelaksanaannya selama lima bulan dimulai bulan September sampai Desember 2009 untuk penanaman secara kultur jaringan di Laboratorium Biotek Universitas Islam Riau dan untuk analisis metabolik sekunder dilakukan Januari 2010 di Laboratorium Kimia Organik Universitas Negeri Riau.

#### 3.2 Bahan dan Alat.

Bahan yang digunakan adalah media Murahige Skoog (MS), biji mahkota dewa yang dijadikan sebagai eksplan, bayclin, alkohol 30%, 20%, 10%, 5%, 1%, metanol, betadine, aquades steril, NaOH 0,1 N, Benzyl Adenin (BA) dan naftalen acetyl acid (NAA) (dengan konsentrasi sesuai perlakuan), kertas saring, kertas label, alumenium foil, karet gelang.

Alat yang digunakan adalah pisau scalpel, plastik, pinset, petridish botol kultur, gelas ukur 100 dan 500 ml, tabung reaksi, erlemeyer, batang pengaduk, corong, pipet tetes, spritus (lampu bunsen), gunting, pH meter, gelas piala, hand sprayer, laminar air flow (LAF), kompor gas, timbangan analitik, autoklaf, rak kultur yang dilengkapi dengan lampu fluoroscens 40 Watt, kulkas, kromatografi lempeng tipis (KTL), ultrasoniksi, centrifusi, lampu UV, kamera serta alat tulis.

#### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimen dengan menggunakan 9 perlakuan ;

1. 2 mg/l BAP dan 2 mg/ l NAA
2. 4 mg/l BAP dan 4 mg/ l NAA
3. 6 mg/l BAP dan 6 mg/ l NAA
4. 1 mg/l BAP dan 2 mg/ l NAA
5. 2 mg/l BAP dan 4 mg/ l NAA
6. 3 mg/l BAP dan 6 mg/ l NAA

7. 2 mg/l BAP dan 1 mg/l NAA
8. 4 mg/l BAP dan 2 mg/l NAA
9. 6 mg/l BAP dan 3 mg/l NAA

Dari uraian di atas dapat dilihat terdapat 9 perlakuan yang tiap perlakuannya terdiri dari 15 unit botol percobaan sehingga totalnya terdapat 135 unit botol percobaan.

### **3.4 Prosedur Kerja**

#### **3.4.1 Sterilisasi Alat-alat**

Seperangkat alat-alat kultur jaringan (in vitro) seperti botol-botol kultur, pipet ukur, pinset, kertas saring, scalpel, terlebih dahulu disterilisasi pada temperatur  $121^{\circ}\text{C}$  dan tekanan 15 psi selama 15 menit (Gunawan, 1995).

#### **3.4.2 Penyediaan Larutan Stok Media Murashige Skoog (MS)**

Bahan-bahan untuk stok (lampiran I) ditimbang terlebih dahulu kemudian dilarutkan dalam 100 ml air suling dalam wadah bervolume 400-500 ml. Setelah bahan kimia larut barulah volume ditetapkan hingga 1 liter dengan menggunakan labu takar. Air suling 400-500 ml diisikan ke dalam labu takar baru kemudian garam-garam ditambahkan. Hal ini terutama penting untuk larutan stok C, E, dan F. Khusus untuk larutan stok F, setelah  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  dilarutkan dalam 200 ml air kemudian dipanaskan sedikit dengan api kecil dalam gelas piala kemudian ditambahkan  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Warna larutan akan berubah menjadi hijau muda. Setelah ditetapkan volumenya menjadi 1 liter di dalam labu takar, larutan disimpan dalam botol berwarna gelap atau dibungkus dengan aluminium foil lalu disimpan di dalam lemari es (Gunawan, 1995).

#### **3.4.3 Penyediaan Larutan Stok Benzyl Amino Purin (BAP) dan Naftalen Acetyl Acid (NAA)**

Bubuk BAP dan NAA yang telah ditimbang masing masing sebanyak 100 mg dengan dengan teliti dimasukkan ke dalam gelas piala (50 ml) dan diberi pelarut seperti pada lampiran 1 sambil diaduk dengan pengaduk kaca. Pelarut

dimasukan sedikit demi sedikit sampai semua bahan terlarut. Setelah bahan terlarut, larutan dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml. Kemudian dimasukkan air suling steril sampai volumenya menjadi 100 ml secara hati hati (sedikit demi sedikit). Setiap mililiter larutan stok yang di buat ini mengandung 1 mg BAP dan NAA. Bila perlakuan BAP ataupun NAA yang diperlukan 1 ppm maka dibutuhkan 1ml dan seterusnya. Sebagai pengganti larutan NaOH, dapat digunakan bahan pelarut alkohol 40 % atau dengan pemanasan awal larutan selama beberapa menit hingga bahan benar-benar larut (menjadi jernih). Penggunaan untuk setiap liter media disesuaikan dengan kebutuhan (Gunawan,1992).

#### **3.4.4 Pengkulturan Eksplan**

Sebelum melakukan penanaman eksplan, terlebih dahulu laminar aif flow (LAF) disterilkan terlebih dahulu dengan sinar ultraviolet selama 25 menit, kemudian permukaan *LAF* disemprot dengan alkohol 70 %. Dalam melakukan penanaman, sedapat mungkin dihindari tangan yang lalu lalang diatas eksplan steril yang terbuka atau media yang terbuka. Alat-alat dan lampu spritus diletakkan agak disebelah kanan dan usahakan tidak terlalu dekat dengan alkohol maupun filter. Sebelum mengambil bahan eksplan, pinset terlebih dahulu dicelupkan ke dalam alkohol 95% kemudian dibakar sampai alkohol yang melekat pada pinset terbakar habis. Setelah itu didinginkan dengan cara meletaknya diatas cawan petri steril.

Media tumbuh yang telah disiapkan di buka tutupnya dengan hati-hati supaya bagian dalam tutup tidak tersentuh. Tutup tersebut diletakkan di sebelah kiri tempat kerja, dalam keadaan bagian dalamnya menghadap ke atas (dalam keadaan terlentang). Botol dipegang dengan tangan kiri dalam keadaan miring. Mulut botol di bakar di atas api alkohol. Ketika membakar mulut botol, sebaiknya botol diputar dengan titik tengah lingkarannya sebagai poros agar seluruh bagian mulut botol terkena api secara merata, lakukan dengan hati-hati dan secara perlahan-lahan. Dengan pinset steril yang telah dingin, eksplan diambil dan dimasukkan ke dalam media yang telah siap. Sebelum ditutup, mulut botol sebaiknya dibakar dulu dan diolesi dengan betadin lalu ditutup dengan menggunakan plastik tahan panas dan diikat dengan karet gelang. Label ditulis

kemudian ditempelkan pada tutup. Pada label dicantumkan tanggal penanaman dan jenis eksplan (cukup kode) (Gunawan, 1995).

#### **3.4.5 Ekstraksi**

Ekstraksi adalah proses pengambilan suatu komponen yang larut dari bahan atau campuran. Pelarut yang biasa digunakan adalah air, aseton, eter dan sebagainya. Metode ekstraksi yang dipilih untuk mendapatkan senyawa bahan alam sangat berbeda satu sama lain, ini tergantung pada jenis sampel dan jenis senyawa yang ada, dan juga pada keadaan fisik senyawa tersebut. (Harborne, 1987).

Adapun teknik ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini adalah teknik maserasi (perendaman). Teknik ini biasanya digunakan untuk tumbuhan yang mengandung metabolik sekunder dalam presentase yang cukup banyak dan ditemukan suatu pelarut yang dapat melarutkan senyawa organik tersebut tanpa dilakukan pemanasan. Maserasi biasanya dilakukan untuk bagian tumbuhan yang lunak, seperti bunga dan daun.

#### **3.4.6 Metode Pemisahan Kromotografi Lapis Tipis (KLT)**

Kromotografi lapis tipis dikembangkan tahun 1983 oleh Ismailoff dan Schraiber. Metode ini sederhana, cepat dalam pemindahan dan sensitif. Kecepatan pemisahan tinggi dan mudah untuk memperoleh kembali denyawa-senyawa yang terpisahkan (Khopkar, 1990).

Pada KLT, fasa padatnya berupa lapisan yang terdiri dari bahan padat yang dilapiskan pada permukaan penyangga yang biasanya terbuat dari plat polimer atau logam. Lapisan yang berfungsi sebagai permukaan padat yang menyerap dan penyangga zat cair ini dapat mengikat pada permukaan dengan bantuan bahan pengikat, biasanya kalsium sulfonat atau amilum (Gritter, 1991)

Cara kerja dari KLT adalah sampel berupa campuran dilarutkan dalam pelarut yang sesuai yaitu menggunakan metanol. Selanjutnya ditotolkan dengan menggunakan pipa kapiler pada garis batas bawah plat. Setelah noda kering, plat dimasukkan dalam chamber yang telah jenuh dengan pelarut yang telah dipilih yaitu metanol sebagai fasa bergerak, lalu ditutup dan ditunggu sampai pelarut naik pada garis batas (Gritter dkk, 1991).

Untuk menghitung jarak tempuh noda maka harus diketahui lokasi noda pada plat dengan tepat. Noda yang berwarna dapat dilihat secara visual, tetapi untuk noda yang tidak berwarna dapat diamati dibawah lampu ultra violet, uap yodium atau pereaksi penampak noda. Pereaksi penampak noda yang biasa digunakan adalah Carr-Price yaitu larutan antimon klorida 20% dalam klorofom, pereaksi Liebermann-Burchard dan pereaksi serium sulfat (Harborne, 1987).

Noda yang dapat dilihat ditandai dengan pensil untuk menghitung harga RF (retardation faktor = faktor penghambat). RF adalah perilaku senyawa-senyawa dalam sistem kromotografi. Harga RF berkisar antara 0 sampai 1. harga RF dapat dihitung dari perbandingan antara jarak tempuh noda dengan jarak tempuh eluen.

### 3.4.7 Parameter Pengamatan

Penelitian dilakukan selama 3 bulan dan parameter yang diamati meliputi :

a. Persentase Tumbuh (%)

Jumlah eksplan yang tumbuh secara keseluruhan, dihitung dengan cara :

$$\frac{\text{jumlah eksplan yang hidup}}{\text{jumlah eksplan total}} \times 100\%$$

b. Pembentukan Kalus

Kalus yang terbentuk ditandai dengan adanya benjolan berwarna putih bening, soft (lembut) yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber embriogenesis.

- Umur pertumbuhan kalus (hari setelah kultur)
- Persentase terbentuknya kalus (%)

c. Pembentukan Peggandaan Pucuk/Tunas

Banyaknya jumlah pucuk yang tumbuh pada tiap eksplan dihitung dengan cara mencari rata-ratanya yaitu : menjumlahkan tunas yang tumbuh lalu dibagi dengan jumlah eksplan perperlakuan .

d. Kandungan Bahan Metabolik Sekunder

- Bahan metabolik sekunder dari plantlet

Kandungan bahan metabolik sekunder adalah metabolik sekunder secara kualitatif.