

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari- Juni 2005 di Laboratorium BSF Tumbuhan, Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Diponegoro, Semarang.

#### 3.2. Alat Dan Bahan

##### 3.2.1. Alat :

Alat untuk sterilisasi, isolasi dan purifikasi yaitu *dissecting set*, pengaduk magnetik, timbangan analitik, alat-alat gelas, *sentrifuge* dan tabung *sentrifuge*, *nylon mesh* ukuran 100  $\mu\text{m}$ , mikroskop cahaya, kertas pH, *hemocytometer*, *counter*, aluminium foil, *hot plate* dan *stirrer*, kertas tisu, kertas koran, label.

##### 3.2.2. Bahan :

1. Sumber eksplan berupa daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) yang diambil dari daerah Tembalang
2. Bahan untuk sterilisasi eksplan terdiri dari : deterjen dan larutan pemutih pakaian yang mengandung NaOCl
3. Alkohol 70%, akuades.
5. Bahan kimia untuk maserasi yaitu : Macerozyme onozuka R-10, sorbitol, vitamin C,  $\text{K}_2\text{SO}_4$

6. Bahan kimia untuk purifikasi yaitu : sukrosa, sorbitol,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO})_2$
7. Larutan 0,2% safranin

### 3.3. Cara Kerja

#### 3.3.1 Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui waktu sterilisasi eksplan yaitu dengan perlakuan waktu sterilisasi terdiri dari 5 menit (P1), 10 menit (P2) dan 15 menit (P3) masing- masing dengan konsentrasi NaOCl 0,2625% . Hasil uji pendahuluan dapat dilihat pada Tabel. 02 berikut.

Tabel 02. Rerata viabilitas sel (%) dan jumlah sel viabel (sel/mL) mesofil (*Stenotrophomonas maltophilia* (L.) Urban) pada waktu sterilisasi yang berbeda.

Perlakuan waktu sterilisasi eksplan	Rerata viabilitas sel (%)	Rerata jumlah sel viabel (sel/mL)	Rerata jumlah sel total (sel/mL)
P1 (5 menit)	99,33 <sup>a</sup>	$5,85 \cdot 10^7$ <sup>a</sup>	$5,89 \cdot 10^7$
P2 (10 menit)	98,54 <sup>b</sup>	$5,67 \cdot 10^7$ <sup>a</sup>	$5,76 \cdot 10^7$
P3 (15 menit)	98,38 <sup>b</sup>	$5,45 \cdot 10^7$ <sup>a</sup>	$5,54 \cdot 10^7$

Sumber : Data primer oleh Adita Martin W, 2005

Keterangan : angka dengan superskrip yang tidak sama pada kolom yang sama menunjukkan bahwa perlakuan tersebut berbeda nyata pada Uji BNJ taraf kepercayaan 95%

Karena dari hasil uji pendahuluan diperoleh viabilitas tertinggi pada perlakuan P1 (5 menit), maka waktu sterilisasi eksplan yang digunakan pada penelitian ini dilakukan selama 5 menit.

### 3.3.2 Pelaksanaan Penelitian

#### a. Pemilihan dan Perlakuan Sterilisasi Eksplan

Daun pegagan dipilih yang utuh tampak segar, tidak tampak adanya serangan penyakit, diambil urutan daun ke-2 dari atas. Daun dipetik, dicuci dengan air mengalir dan deterjen 2 menit, kemudian dibilas air mengalir. Eksplan disterilisasi dengan menggunakan larutan pemutih pakaian dengan perlakuan beberapa konsentrasi .

Setelah eksplan disterilisasi dengan berbagai konsentrasi selama 5 menit, kemudian dibilas dengan akuades 3 kali. Eksplan yang telah disterilisasi dibungkus dengan kertas tisu yang dibasahi dengan air, diletakkan dalam cawan petri, kemudian cawan petri tersebut dibungkus koran lembab dan diletakkan di dalam lemari pendingin selama 24 jam.

#### b. Pembuatan medium maserasi dan medium purifikasi

Pembuatan medium maserasi diawali dengan membuat larutan stok untuk  $K_2SO_4$  . Medium maserasi terdiri dari sorbitol, vitamin C,  $K_2SO_4$  dan enzim macerozyme (komposisi pada lampiran 01). Semua bahan ditimbang kemudian dicampur di dalam gelas Beaker yang berisi akuades 10 mL, diaduk dan ditambahkan akuades hingga mencapai volume 20 mL. pH medium diukur dengan menggunakan kertas pH, jika terlalu asam ditambahkan NaOH sedangkan jika terlalu basa ditambahkan HCl. Medium purifikasi terdiri dari  $KNO_3$ ,  $Ca(NO)_2$ , sukrosa,  $MgCl_2$  dan sorbitol (komposisi pada lampiran 01). Cara pembuatannya sama seperti medium maserasi, dengan terlebih dahulu membuat larutan stok untuk  $KNO_3$ ,  $Ca(NO)_2$ , dan  $MgCl_2$ .

### c. Isolasi dan purifikasi sel

Eksplan daun yang telah steril dibilas dengan akuades 3 kali, kemudian diletakkan di atas cawan petri. Tangkai daun dan tulang daun dihilangkan, helai daun kemudian dipotong-potong dengan ukuran  $1 \times 1 \text{ mm}^2$ . Potongan daun tersebut dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 25 mL yang mengandung medium maserasi dan diinkubasikan selama 20 menit dengan *stirrer* dengan kecepatan 300 rpm. Untuk membuang sisa yang tidak tercerna dipergunakan *nylon mesh* kemudian sel dicuci dengan medium purifikasi, untuk selanjutnya disentrifugasi selama 10 menit dan diulangi 3 kali. Pelet yang didapat diamati jumlah sel total dan jumlah sel viabelnya.

### 3.4. Penghitungan viabilitas sel

Pelet (bagian bawah pada tabung sentrifuge) diambil sebanyak 1 mL kemudian ditetesi dengan larutan safranin 0,2%. Pengamatan di bawah mikroskop dilakukan dengan mengambil 1 tetes pelet yang telah diberi safranin yang diletakkan pada *hemocytometer*. Perlakuan dengan konsentrasi sterilan (NaOCl) yang berbeda dan pengamatan di mikroskop dilakukan secara kelompok, yaitu pada satu waktu dilakukan pengamatan pada tiap perlakuan.

### 3.5. Parameter yang diamati

#### 1. Jumlah sel viabel

Jumlah sel viabel dapat dihitung secara langsung dengan menggunakan *haemocytometer*. Jumlah sel hidup dihitung dengan menggunakan rumus :

$$5 n \cdot 10^{-4} \text{ per mL } , \text{ di mana } n = \text{jumlah sel dalam triple line square}$$

#### 2. Persentase (%) viabilitas sel

Viabilitas sel dapat diamati menggunakan mikroskop dengan pewarnaan safranin 0,2% (w/v). Sel yang mati akan berwarna merah atau merah muda yang dapat dibedakan secara jelas dengan sel hidup yang tak berwarna.

Untuk menghitung persentase viabilitas sel digunakan rumus :

$$\frac{\text{Jumlah sel yang hidup ( viabel )}}{\text{Jumlah sel seluruhnya}} \times 100 = \text{persentase viabilitas sel}$$

Jumlah sel seluruhnya

### 3.6 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode penelitian Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 5 perlakuan dan masing-masing perlakuan diulangi sebanyak 5 kali.

Perlakuan yang dimaksud adalah :

- P1 : konsentrasi NaOCl 0,2625 % waktu sterilisasi 5 menit
- P2 : konsentrasi NaOCl 0,5250 % waktu sterilisasi 5 menit
- P3 : konsentrasi NaOCl 0,7875 % waktu sterilisasi 5 menit
- P4 : konsentrasi NaOCl 1,0500 % waktu sterilisasi 5 menit
- P5 : konsentrasi NaOCl 1,3125 % waktu sterilisasi 5 menit

### 3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini dianalisis menggunakan ANOVA (*Analyse of Variant*). Jika ada perbedaan nyata antar perlakuan dilakukan uji BNJ dengan taraf kepercayaan 95 % (Hanafiah, 2001).

