

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai Juni 2005 di Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Tumbuhan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Diponegoro, Semarang.

3.2 Alat dan Bahan

a. Alat

Diseccting set, magnetic stirer, timbangan digital, sentrifus dan tabung sentrifus, *Nylon mesh* ukuran 100 μm , mikroskop cahaya, kertas lakmus, mikrometer, hemositometer, *counter*, kertas tisu, alat-alat gelas, termometer, sikat halus.

b. Bahan

1. Sumber eksplan berupa daun tumbuhan pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) yang diambil dari daerah Tembalang dan ditanam dalam pot.
2. Bahan kimia untuk sterilisasi : deterjen, pemutih pakaian 5 %, alkohol 70%, akuades.
3. Bahan kimia untuk maserasi (terlampir).

4. Bahan kimia untuk purifikasi (terlampir).
5. Larutan safranin 1 %.

3.3 Cara Kerja

a. Pemilihan dan Sterilisasi eksplan

Daun pegagan yang digunakan sebagai eksplan dipilih yang tampak bagus dan segar, tidak tampak adanya serangan penyakit. Daun yang digunakan adalah urutan ke 2. Daun tersebut dipetik dan ditimbang seberat 1 g lalu dicuci dengan deterjen selama 2 menit, setelah itu dibilas dengan air mengalir. Eksplan dimasukkan ke dalam larutan pemutih pakaian 5 % selama 2 menit, kemudian dibilas dengan akuades sebanyak 3 kali. Eksplan yang telah steril di masukkan dalam cawan petri yang telah dialasi dengan kertas tisu basah dan disimpan dalam almari pendingin pada suhu ± 20 °C selama 24 jam.

b. Isolasi sel

Setelah disimpan dalam almari pendingin selama 24 jam, eksplan diambil dan dicuci kembali dengan akuades, lalu diletakkan di atas cawan petri. Kemudian secara hati-hati epidermis bagian bawah daun tersebut dibuang demikian juga tulang daunnya, lalu dipotong-potong dengan lebar ± 1 mm. Potongan daun tersebut dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 25 mL yang berisi medium maserasi sebanyak 10 mL lalu diinkubasi selama 15 menit dengan *magnetic stirrer* pada kecepatan 300 rpm.

c. Purifikasi sel

Setelah mencapai masa inkubasi dalam medium maserasi, sel disaring dengan *nylon mesh* untuk membuang sisa jaringan atau fragmen yang tidak tercerna. Filtrat yang diperoleh dicuci dengan medium purifikasi sebanyak 10 mL dan disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 5 menit. Supernatan pada lapisan pertama dan kedua diambil dengan pipet kemudian pelet yang tersisa dicuci kembali dengan medium purifikasi dan disentrifugasi. Perlakuan tersebut diulangi sebanyak tiga kali. Pada akhir purifikasi akan diperoleh 1-3 lapisan sel dalam tabung sentrifus. Supernatan pada permukaan dan lapisan bawahnya dibuang. Sel pada bagian dasar tabung sentrifus diambil sebanyak 1 mL, ditetesi larutan safanin 1 % kemudian dihitung jumlahnya menggunakan hemositometer, diamati viabilitasnya serta dilakukan pengukuran sel menggunakan mikrometer.

d. Parameter

1. Jumlah sel (sel/mL)

Jumlah sel dihitung menggunakan hemositometer di bawah mikroskop.

Rumus = $5n \times 10^4$ per mL, dimana n = jumlah sel pada triple line square

(Dixon dan Gonzales, 1994).

Sel diamati dengan menggunakan larutan Safranin 1 %, sel yang viabel tidak akan terwarnai, sedangkan sel yang mati akan berwarna merah..

2. Viabilitas sel (%)

$$\text{Rumus} = \frac{n}{m} \times 100\%$$

Keterangan : n = Jumlah Sel Viabel

m = Jumlah Sel Total.

e. Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak kelompok (RAK) dengan 6 perlakuan dan ulangan sebanyak 4 kali. Masing-masing ulangan dijadikan kelompok (blok) karena dilakukan pada hari yang berbeda. Perlakuan yang diberikan adalah perbedaan konsentrasi sorbitol dalam medium purifikasi.

Perlakuan tersebut adalah sebagai berikut :

1. P 1 : Medium purifikasi dengan konsentrasi sorbitol 0 g/L
2. P 2 : Medium purifikasi dengan konsentrasi sorbitol 25 g/L
3. P 3 : Medium purifikasi dengan konsentrasi sorbitol 50 g/L
4. P 4 : Medium purifikasi dengan konsentrasi sorbitol 75 g/L
5. P 5 : Medium purifikasi dengan konsentrasi sorbitol 100 g/L
6. P 6 : Medium purifikasi dengan konsentrasi sorbitol 125 g/L

f. Analisis Data

Data yang diperoleh pada percobaan tersebut dianalisis dengan ANOVA (*Analyse of Variance*) pada taraf kepercayaan 95 %. Jika ada pengaruh perbedaan perlakuan terhadap hasil maka dilakukan uji lanjut menggunakan Uji DMRT (Duncan's Multiple Range Test) pada taraf kepercayaan 95 % (Sastrosupadi, 2000).