

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan dan Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung selama bulan Juni 2012.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik , corong, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas ukur, pipet tetes, *erlenmeyer*, *mortar* dan pengerus, *beaker glass*, pengaduk, cawan petri, katek, gunting, karet gelang, plastik dan spektrofotometer.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah pisang ambon yang belum matang, albumin, *Reagen Biuret*, *Metilen Blue*, *aquades*, kertas saring, tissue, dan kertas label.

C. Rancangan Percobaan

Penelitian ini disusun menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan diulang sebanyak 5 kali. Perlakuan adalah pelukaan buah pisang dengan 4 tingkat keparahan luka (1 torehan, 2 torehan, 3 torehan dan 4 torehan luka) dan tanpa torehan luka (kontrol). Jadi perlakuannya dalam percobaan ini adalah 5 perlakuan. Dengan waktu pengamatan 1x pada hari ke-8 setelah pelukaan. Dengan ulangan sebanyak 5 kali. Jadi jumlah keseluruhan percobaan yang akan dilakukan adalah $5 \times 1 \times 5 = 25$ satuan percobaan.

D. Variabel

Parameter yang diukur dalam penelitian ini adalah aktifitas enzim dehidrogenase dan kandungan triptophan buah pisang ambon pada 8 hari setelah penorehan luka pada kulit buah pisang. Sebagai pembanding aktifitas enzim dehidrogenase dan kandungan triptophan buah pisang ambon juga ditentukan sebelum penorehan luka.

E. Pelaksanaan

1. Penyiapan Cawan Petri

Cawan petri sebanyak 25 buah dicuci dengan menggunakan sabun dan dibilasi dengan air bersih, kemudian cawan petri diberi label dengan

kontrol, perlakuan, hari dan ulangan. Cawan petri ini digunakan sebagai wadah buah pisang ambon yang sudah diberi perlakuan dan kontrol. Cawan-cawan petri ini disusun berdasarkan tata letak satuan percobaan pada Tabel 1 di bawah ini.

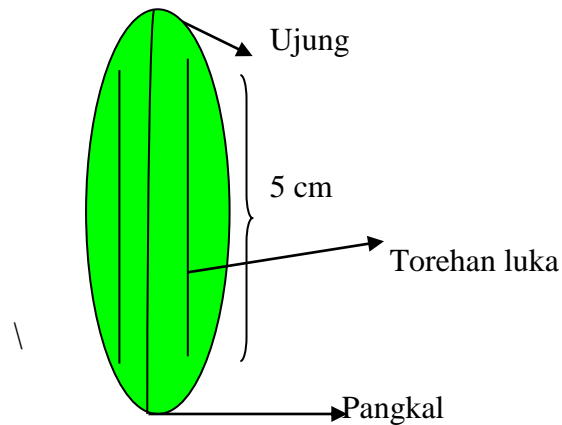
P1U5H8	KU4H8	P4U4H8	P1U3H8	PIU4H8
P2U2H8	P4U2H8	P2U1H8	P4U1H8	P2U5H8
P2U3H8	KU2H8	P3U5H8	P3U3H8	KU3H8
PIU1H8	P4U3H8	P4U5H8	P2U2H8	P3U1H8
P2U4H8	P1U2H8	KU1H8	P3U4H8	KU5H8

Keterangan: K= Kontrol, U= Ulangan, H= Hari, P= Perlakuan

Tabel 1. Tata Letak Satuan Percobaan

2. Penorehan Luka

Pelukaan fisik pada buah pisang ambon dilakukan dengan cara membuat torehan luka pada kulit buah secara *longitudinal* atau memanjang dengan tidak mengenai daging buah pisang. Penorehan luka dilakukan dibagian tengah sisi buah pisang dengan panjang torehan 5 cm. Tingkat keparahan luka didasarkan kepada jumlah torehan yang dibuat yaitu 1 torehan, 2 torehan, 3 torehan dan 4 torehan.



Gambar 5. Skema penorehan luka buah pisang ambon.

3. Pembuatan Kurva Standar

100 mg albumin dilarutkan dalam 10 ml *aquades*. Selanjutnya, 0,1; 0,2; 0,3; 0,6; dan 1 ml dipipet ke dalam 6 tabung reaksi yang sudah dilabel konsentrasi albumin. Volume disesuaikan menjadi 1ml dengan menambahkan *aquades*. 4 ml *Reagen Biuret* ditambahkan ke setiap tabung raksi, diaduk rata dan diinkubasi selama 30 menit pada temperatur kamar sampai terbentuk warna merah jambu (*pink*). Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Kurva strandar diplot dengan sumbu x sebagai konsentrasi dan sumbu y sebagai absorbansi. Persamaan garis yang menggambarkan hubungan antara konsentrasi protein dengan absorbansi dibuat melalui regresi linier.

4. Penentuan Aktivitas Enzim Dehidrogenase

Buah pisang ambon kuning yang telah diberi perlakuan dan yang tidak diberi perlakuan dipotong-potong. Potongan buah pisang ambon sebanyak 2 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tabung reaksi diisi penuh dengan aquades dan ditetesi dengan larutan *Metilen Blue* (0,025% w/v) sebanyak 5 tetes. Tabung reaksi ditutup rapat dengan plastik dan diikat dengan karet gelang, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Pengukuran aktifitas enzim dehidrogenase dilakukan dengan metoda *Metilen Blue* da transmisi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. (Whitam *et. al.*, 1986)

5. Pengukuran Kandungan Triptophan

1 gr daging buah pisang kuning ditumbuk dalam mortar sampai halus kemudian ditambahkan 10 ml *aquades* dan disaring kedalam erlenmeyer. 1ml ekstrak buah pisang tersebut dipipet ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya 4ml *Reagen Biuret* ditambahkan ke tabung reaksi dan diinkubasi selama 30 menit pada temperatur kamar sampai terbentuk warna merah jambu (*pink*). Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm. Kandungan triptophan ditentukan berdasarkan kurva standar yang dibuat. (Whitam *et. al.*, 1986)

F. Analisis Data

Data yang didapatkan dari pengukuran aktifitas enzim dehidrogenase dan kandungan triptophan dari masing-masing perlakuan dan kontrol 8 hari setelah perlakuan dianalisis ragam pada taraf nyata 5%. Jika berbeda nyata, maka uji dilanjutkan dengan BNT pada taraf nyata 5%. Hubungan antara tingkat perlakuan dengan aktifitas enzim dehidrogenase dan kandungan triptophan ditentukan melalui regresi linear, dan diuji ke linierannya pada taraf nyata 5%.