

BAB III

TATA KERJA

3.1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah LAF (*Laminar Air Flow*), Autoklaf (*Allamerican*), *scaple*, *magnetic stirrer* (*Arec*), labu ukur, volume pipet, pH meter (*Hanna instruments*), neraca analitik (*Ohaus*), perlengkapan maserasi, *rotary evaporator* (*IKA*[®]), toples kaca, pinset.

3.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah planlet tanaman tin (*Ficus carica* L.) yang diperoleh dari laboratorium RHIN Biotechnology. Bahan kimia yang digunakan berupa penyusun media dasar *Murashige* dan *Skoog*, BAP (*Benziyl Amino Purin*), NAA (*Naphthalena Acetid Acid*), larutan stok A (NH_4NO_3), B (KNO_3), C (KH_2PO_4), D ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), E ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), larutan stok mikro (H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KI, $\text{Na}_4\text{MoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), larutan stok vitamin (niasin, piridoksin HCl, tiamin HCl) larutan stok glisin, larutan stok FeEDTA ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2EDTA), myo-inositol, sukrosa. Bahan lain yang digunakan yaitu HCl 1.0 N, NaOH 1.0 N, alkohol, spiritus, asam askorbat (untuk mengurangi pencoklatan), aquades steril, tisu, bahan pematik berupa agar, plastik wrap, etanol 96%, pereaksi Dragendroff ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, HNO_3 , KI dan Aquadest), larutan FeCl_3 , larutan gelatin 1%, serbuk Mg, amil alkohol, eter, pereaksi *Lieberman-Burchard* (Asam asetat anhidrat, Kloroform dan H_2SO_4), vanilin-asam sulfat, kalium hidroksida,

3.3. Metode penelitian

3.3.1. Sterilisasi alat

Semua alat yang akan digunakan dilakukan sterilisasi menggunakan Autoklaf, botol kultur disterilisasi selama 60 menit pada suhu 121 °C, dan alat logam atau besi disterilisasi selama 30 menit pada suhu 121 °C. LAF (*Laminar Air Flow*) disterilkan dengan cara disemprot menggunakan

etanol 70%, kemudian lampu UV dan *blower* pada LAF dinyalakan selama 60 menit (Ardiansyah, 2018).

Media yang digunakan dalam penelitian ini yaitu media *Murashige dan Skoog* (MS) sebanyak 2L. Dimasukan sebagian aquadest ke dalam labu ukur dan ditambahkan semua larutan stok masing-masing 20ml, kemudian ditambahkan 200 mg myo-inositol dan 60 gram sukrosa kemudian ditambahkan aquadest sampai 2 L dan diaduk sampai homogen kemudian diukur pH menggunakan pH meter pada rentang 5,7-5,8. Bila pH asam ditambahkan NaOH dan bila basa ditambahkan HCL. Kemudian media dituangkan kedalam wajan, ditambahkan 12 gram agar , 6 gram arang dan zat pengatur tumbuh BAP (*Benzyl Amino Purin*) dan NAA (*Naphtalena Acetid Acid*) dengan variasi konsentrasi, kemudian dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk. Media dituangkan kedalam botol kultur masing-masing sebanyak 25ml, botol kultur ditutup dan dibungkus plastik wrap, kemudian di sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media hasil sterilisasi disimpan selama 3 hari dan dilihat sterilitasnya (Ardiansyah,2018).

Tabel 3.1 Kontrol media, uji ZPT

Kelompok	Media	ZPT	Konsentrasi BAP	Konsentrasi NAA
Kontrol MS	MS0	-	-	-
Uji 1	MS0	BAP+NAA	0,5 ppm	0,1 ppm
Uji 2	MS0	BAP+NAA	0,5 ppm	0,2 ppm
Uji 3	MS0	BAP+NAA	0,5 ppm	0,3 ppm
Uji 4	MS0	BAP+NAA	0,5 ppm	0,4 ppm
Uji 5	MS0	BAP+NAA	1 ppm	0,1 ppm
Uji 6	MS0	BAP+NAA	1 ppm	0,2 ppm
Uji 7	MS0	BAP+NAA	1 ppm	0,3 ppm
Uji 8	MS0	BAP+NAA	1 ppm	0,4 ppm

Keterangan :

- a. MS adalah media standar.
- b. Setiap uji dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali

3.3.2. Proses multiplikasi

Alat yang akan digunakan disterilkan kembali, pinset dan *scaple* dibakar menggunakan api bunsen, sarung tangan steril disemprot menggunakan etanol 70%. Di dalam LAF (*Laminar Air Flow*), planlet

dipotong-potong menggunakan *scaple* di atas kertas koran yang sudah disterilkan, hasil potongan (eksplan) ditanam ke dalam media menggunakan pinset, kemudian media yang sudah ditanam eksplan dalam botol kultur ditutup menggunakan plastik wrap kemudian eksplan diinkubasi selama empat minggu pada suhu 21-24 °C dengan cahaya 1000-1500 lux (Ardiansyah, 2018).

3.3.3. Pengamatan

Pengamatan dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Kualitatif berupa pengamatan terhadap warna eksplan dan warna daun, sedangkan kuantitatif terhadap panjang eksplan, jumlah daun, jumlah akar, dan jumlah tunas. Pengamatan dilakukan setiap minggu selama 4 minggu setelah tanam (Ardiansyah, 2018).

Tabel 3.2 Parameter pengamatan kualitatif

Warna	Keterangan
Hijau	Sehat
Kecoklatan	Vitrifikasi
Putih	Mati
Hitam	Kontaminasi

Keterangan :Vitrifikasi merupakan kegagalan tanaman untuk berkembang.

3.3.4. Analisis Data

Hasil data pengamatan kuantitatif kemudian dianalisis menggunakan *Analysis Of Variance* (ANOVA).

3.3.5. Ekstraksi Tanaman tin

Tanaman tin (*Ficus carica* L.) segar diekstraksi dengan metode dingin yaitu maserasi dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10 selama 3x24 jam. Tanaman tin direndam dalam maserator sambil dikocok berulang-ulang. Ekstrak cair yang didapatkan disaring dan diuapkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 40-50°C. selanjutnya dalam cawan penguap, maserat diuapkan pada suhu kamar, sehingga diperoleh ekstrak kental, Timbang dan hitung rendemennya. Rendemen ekstrak ditetapkan dengan rumus:

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat Ekstrak Total}}{\text{Berat Simplisia}} \times 100 \%$$

3.3.6. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan menurut DEPKES RI tahun 2000 dan 1989 :

A. Flavonoid

Sampel digerus dalam mortar dengan sedikit air, pindahkan dalam tabung reaksi, tambahkan sedikit logam magnesium dan 5 tetes HCl 2 N, seluruh campuran panaskan selama 5-10 menit. Saring panas-panas dan filtrat dibiarkan dingin. Filtrat tambahkan dengan amil alcohol, kocok kuat-kuat. Reaksi positif terbentuknya warna merah pada lapisan alkohol (Depkes RI, 2000).

B. Alkaloid

Sampel dalam mortar dibasakan dengan ammonia sebanyak 1 mL, kemudian tambahkan kloroform dan digerus kuat. Cairan kloroform saring, filtrat tempatkan dalam tabung reaksi kemudian tambahkan HCl 2N, campuran dikocok, biarkan hingga terjadi pemisahan. Dalam tabung reaksi terpisah:

Filtrat 1: Sebanyak 1 tetes larutan pereaksi dragendorff teteskan ke dalam filtrat, adanya alkaloid terbentuknya endapan atau kekeruhan berwarna hingga coklat.

Filtrat 2: Sebanyak 1 tetes larutan pereaksi mayer teteskan ke dalam filtrat, adanya alkaloid terbentuknya endapan atau kekeruhan berwarna putih.

Filtrat 3: Sebagai blangko (Depkes RI, 2000)..

C. Tannin

Sampel dalam tabung reaksi dipanaskan di atas tangas air, saring. Filtrat ditambahkan gelatin 1% positif tannin akan timbul endapan putih (Depkes RI, 2000).

D. Saponin

Sampel ditambahkan air, lalu dipanaskan dan disaring. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dikocok kuat-kuat. Terbentuknya busa mantap dan tidak hilang 10 menit dengan

tinggi busa minimal 1cm menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1989).

E. Fenolat

Sampel ditambahkan air, didihkan selama 5 menit kemudian saring. Filtrat sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan pereaksi FeCl_3 , positif fenolat terbentuknya warna hijau biru kehitaman (Depkes RI, 1989).

F. Kuinon

Sampel ditambahkan dengan air, didihkan selama 5 menit kemudian saring. Filtrat ditambahkan larutan KOH 5%. Terjadinya warna kuning menunjukkan adanya kuinon (Depkes RI, 1989).

G. Monoterpen dan Seskuitерpen

Sampel digerus dengan eter, filtratnya diambil dan ditempatkan dalam cawan penguap, dan dibiarkan kering, kemudian ditambahkan larutan vanilin 10% dalam H_2SO_4 pekat. Terjadinya warna-warni menunjukkan adanya senyawa monoterpen dan seskuitерpen (Depkes RI, 1989).

H. Steroid dan Triterpenoid

Sampel digerus dengan eter, kemudian fase eter diuapkan dalam cawan penguap hingga kering, pada residu tetesi pereaksi *Lieberman-Burcahard*. Terbentuknya warna ungu menunjukkan kandungan triterpenoid sedangkan bila terbentuknya warna hijau biru menunjukkan adanya steroid (Depkes RI, 1989).