

BAB III

TATA KERJA

3.1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah LAF (*Laminar Air Flow*), autoklaf, *magnetic stirrer*, neraca analitik, pH meter, toples kultur, perlengkapan maserasi, tabung reaksi, cawan penguap, gelas ukur, labu ukur, bunsen, labu spiritus, pipet volume, botol semprot, spatel, *scaple*, pinset, pipet tetes, mikropipet.

3.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah planlet buah tin (*Ficus carica* L.) yang diperoleh dari laboratorium SEAMEO BIOTROP. 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 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), D (KH_2PO_4), E ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 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, $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 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, arang. Bahan lain yang digunakan yaitu HCl 1N, NaOH 1N, alkohol, etanol 96%, etanol 70%, dan pereaksi untuk penapisan fitokimia spiritus, akuades, tissue, bahan pematik berupa agar (swallow), plastik wrap, masker, sarung tangan.

3.3. Metode penelitian

3.3.1. Sterilisasi Alat

Semua alat yang digunakan dicuci bersih kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf. Botol kultur disterilisasi selama 60 menit pada suhu 121°C . Alat logam dan 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 sebelum digunakan (Ardiansyah, 2018).

3.3.2. Pembuatan Media

Media dibuat dalam 2 L. Akuades dimasukkan sebagian ke dalam labu ukur. Larutan stok masing-masing sebanyak 20 mL ditambahkan, kemudian 200 mg myo-inositol dan 60 gram sukrosa ditambahkan. Campuran larutan diaduk sampai homogen dan diukur pH hingga rentang 5,7-5,8. Bila pH asam, ditambahkan NaOH dan bila pH basa, ditambahkan HCl. Akuades ditambahkan sampai 2 L, kemudian 12 gram agar dan 6 gram ditambahkan. Zat pengatur tumbuh BAP (*Benzyl Amino Purin*) dan NAA (*Naphthalena Acetid Acid*) ditambahkan dengan variasi konsentrasi. Campuran larutan dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk. Media dituangkan ke dalam botol kultur masing masing 25 mL. Botol kultur ditutup dan dibungkus dengan plastik wrap, lalu disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Media hasil sterilisasi disimpan selama 3 hari dan dilihat sterilitasnya (Ardiansyah, 2018).

Tabel 3.1 Konsentrasi media kontrol dan media uji

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

Keterangan :

- MS0 adalah media standar
- Setiap uji dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali

3.3.3. 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. Eksplan diinkubasi selama empat minggu pada suhu 21-24°C dengan cahaya 1000-1500 lux (Ardiansyah, 2018).

3.3.4. Pengamatan

Pengamatan dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Kualitatif berupa pengamatan terhadap warna eksplan, 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

<u>Warna</u>	<u>Keterangan</u>
Hijau	Sehat
<u>Kekuningan</u>	<u>Virtifikasi</u>

3.3.5. Analisis Data

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

3.3.6. Ekstraksi Tanaman Tin

Eksplan segar tanaman tin diekstraksi dengan metode dingin yaitu maserasi, menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10 selama 3x24 jam. Eksplan segar tanaman tin direndam dalam maserator sambil dikocok berulang-ulang. Ekstrak cair etanol yang didapatkan disaring dan diuapkan dalam cawan penguap. Maserat diuapkan sehingga diperoleh ekstrak kental.

3.3.7. Penapisan Fitokimia

A. Flavonoid

Sampel digerus dalam mortir dengan sedikit air, dipindahkan dalam tabung reaksi, ditambahkan sedikit logam magnesium dan 5 tetes HCl 2 N, seluruh campuran dipanaskan selama 5-10 menit. Larutan disaring panas-panas dan filtrat dibiarkan dingin. Filtrat ditambahkan dengan amil alkohol, kocok kuat-kuat. Reaksi positif terbentuknya warna merah pada lapisan alkohol (Depkes RI, 2000).

B. Alkaloid

Sampel dalam mortir dibasakan dengan amonia sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan kloroform dan digerus kuat. Cairan

kloroform disaring, filtrat ditempatkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan HCl 2N, campuran dikocok, dibiarkan hingga terjadi pemisahan. Dalam tabung reaksi terpisah:

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

Filtrat 2: Sebanyak 1 tetes larutan pereaksi mayer diteteskan 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, disaring. Filtrat ditambahkan gelatin 1% positif tanin akan timbul endapan putih (Depkes RI, 2000).

D. Saponin

Sampel ditambahkan air, lalu dipanaskan dan disaring. Filtrat dimasukan ke dalam tabung reaksi, dikocok kuat-kuat. Terbentuknya busa konstan 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 Seskuiterpen

Sampel digerus dengan eter, filtrat diambil dan ditempatkan dalam cawan penguap, dan dibiarkan kering, kemudian ditambahkan larutan vanilin 10% dalam H₂SO₄ pekat. Terjadinya warna-warni menunjukkan adanya senyawa monoterpen dan seskuiterpen (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-Burchard*. Terbentuknya warna ungu menunjukkan kandungan triterpenoid sedangkan bila terbentuknya warna hijau biru menunjukkan adanya steroid (Depkes RI, 1989).

