

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Januari - Juni 2012 di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga Surabaya.

3.2 Bahan Penelitian

3.2.1 Bahan hayati

Tanaman ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) diperoleh di Surabaya. Bahan tanaman yang digunakan adalah daun sebagai eksplan. Akar rambut diperoleh dari hasil infeksi eksplan daun tanaman ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) oleh bakteri *Agrobacterium rhizogenes*.

3.2.2 Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan meliputi bahan kimia penyusun media Murashige dan Skoog (1962) yang mengandung bahan-bahan anorganik dan zat-zat organik (makronutrien, mikronutrien, sukrosa, zat besi, myoinositol, vitamin), clorox 10%, etanol 96% (Merck), akuades, anisaldehyd, asam asetat glacial (Merck), asam sulfat pekat, alkohol 70%, 2-propanol (Merck), dan saponin (Calbiochem).

3.3 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu *laminar air flow* (LABCONCO purifier class II safety cabinet) sebagai tempat ketika menanam eksplan, *autoclave* untuk sterilisasi alat-alat dan media, oven untuk menyimpan peralatan yang telah steril dari *autoclave*. Ruang inkubasi yang mempunyai suhu dan alat penyinaran yang dapat diatur sesuai kebutuhan. Peralatan-peralatan gelas seperti gelas beaker 1000, 500, dan 100 mL, gelas ukur 100, 50, dan 10 mL, labu erlenmeyer 500 mL, cawan petri, botol kultur 100 mL, pipet tetes, spektrofotometer, *Universal Indicator Paper*, spatula, scalpel, pinset, kompor listrik, *magnetic stirrer*, *rotary shaker*, *sprayer*, bunsen, timbangan analitik, lemari pendingin, kertas saring, mortar, pelat Kromatografi Lapis Tipis *silica gel GF₂₅₄* (Merck), spektrofotometer UV-Vis, *waterbath*, mikro pipet dan kamera.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Sterilisasi alat

Alat-alat yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu dengan detergen, dibilas dengan air bersih kemudian dikeringkan. Selanjutnya alat-alat seperti pinset, scalpel, dan cawan petri dibungkus dengan kertas coklat sedangkan untuk botol kultur dan erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil dan selanjutnya alat-alat disterilisasi dengan menggunakan *autoclave*. Sterilisasi alat dilakukan dengan menggunakan *autoclave* dengan tekanan 1 atm dan temperature 121°C selama 15 menit. Setelah disterilisasi, alat-alat tersebut disimpan dalam oven inkubator dengan suhu 60-70°C agar tetap steril.

3.4.2 Sterilisasi ruang kerja

Sterilisasi ruang kerja dengan menyemprotkan alkohol 70% pada tissue kering kemudian mengusapkan tissue tersebut ke meja kerja pada *laminar air flow cabinet*. Setelah disterilisasi dengan alkohol kemudian lampu UV dinyalakan selama 15-20 menit, setelah lampu UV dimatikan kemudian diganti dengan menyalakan lampu neon dan blower. Ruang kerja pun siap untuk digunakan.

3.4.3 Pembuatan larutan stok untuk media MS

a. Stok mikronutrien: dalam 100 mL (100 kali konsentrasi)

Menimbang bahan-bahan kimia mikronutrien antara lain 25 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 620 mg H_3BO_3 , 83 mg KI, 2,5 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.230 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 860 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2,5 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dengan timbangan analitik. Kemudian memasukkan bahan tersebut satu persatu ke dalam erlenmeyer 200 mL yang sudah berisi akuades ± 80 mL. Setiap kali memasukkan bahan kimia langsung diaduk, baru kemudian bahan berikutnya. Larutan yang sudah jadi kemudian ditambahkan akuades sampai volume menjadi 100 mL dan memasukkannya pada botol khusus kemudian ditutup dengan aluminium foil dan memberi label: MIKRO MS 100X, 1 mL/L, yang berarti untuk membuat 1 liter media MS diperlukan 1 mL stok mikronutrien. Kemudian botol tersebut disimpan dalam kulkas.

b. Stok zat besi: dalam 200 mL (40 kali konsentrasi)

Menimbang 1.492 mg Na_2EDTA dan 1.112 mg $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Kemudian melarutkan kedua bahan tersebut dalam 75 mL akuades secara terpisah. Larutan $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dipanaskan sampai hampir mendidih kemudian memasukkan larutan Na_2EDTA sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*.

Kedua larutan akan tercampur, bening dan berwarna kuning. Kemudian membiarkan larutan tersebut dingin pada suhu kamar dan menambahkan akuades sampai volume 200 mL, menyimpan dalam botol dan memberi label: ZAT BESI MS 40X, 5 mL/L, yang berarti untuk membuat 1 liter media MS diperlukan 5 mL larutan stok zat besi. Larutan tersebut kemudian disimpan di dalam kulkas.

c. Stok vitamin dalam 200 mL (50 kali konsentrasi)

Menimbang bahan-bahan kimia yang diperlukan untuk membuat vitamin antara lain 100 mg Glisin, 25 mg Asam nikotin, 25 mg Piridoksin-HCl, 5 mg Thiamin-HCl dengan menggunakan timbangan analitik. Kemudian melarutkan satu persatu bahan-bahan kimia tersebut ke dalam erlenmeyer 200 mL yang berisi akuades steril \pm 150 mL. Setelah semua bahan terlarut kemudian menambahkan akuades steril sampai volume 200 mL dan memasukkannya ke dalam botol, tutup rapat dan memberi label: VITAMIN MS 50X, 4 mL/L, yang berarti untuk membuat 1 liter media MS diperlukan 4 mL stok vitamin. Setelah ditutup rapat kemudian menyimpan larutan vitamin di dalam kulkas.

3.4.4 Pembuatan larutan stok *cefotaxime* (20.000 ppm)

Menimbang 1 gram *cefotaxime* kemudian melarutkannya ke dalam 50 mL akuades steril dan dilakukan dalam keadaan steril. Kemudian menghomogenkan larutan tersebut dengan cara menggoyang-goyangkannya. Setiap 50 mL MS0 semisolid ditambahkan 1250 μ L *cefotaxime* (500 ppm). Pembuatan stok *cefotaxime* dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet*.

3.4.5 Pembuatan larutan stok *acetosyringone* (0,01 M)

Menimbang *acetosyringone* 0,0392 gram, kemudian *acetosyringone* dilarutkan dengan akuades steril sampai volume 20 mL dan disimpan dalam kulkas. Proses ini dilakukan dalam kondisi steril. Untuk setiap pemakaian 50 mL MS0 cair ditambahkan 600 μ L *acetosyringone*.

3.4.6 Pembuatan media MS

Bahan-bahan komposisi makronutrien, myo-inositol, sukrosa, dan agar untuk pembuatan media MS ini terlebih dahulu ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik. Setelah itu kemudian memasukkan bahan-bahan makronutrien satu persatu dalam akuades steril 500 mL yang terlebih dahulu ditempatkan pada labu erlenmeyer 1000 mL. Selanjutnya memasukkan 5 mL larutan stok zat besi, 1 mL mikronutrien, 4 mL larutan stok vitamin, 100 mg myo-inositol, dan 30 gram sukrosa dilarutkan dengan bantuan *magnetic stirrer*. Kemudian mengukur kadar pH larutan media tersebut dengan menggunakan *Universal Indicator Paper*, pH larutan 5,6-5,8. Jika pH diketahui lebih tinggi dari 5,8 maka perlu menambahkan HCl 1 N, sedangkan jika pH media tersebut lebih rendah maka perlu menambahkan KOH 1 N. Setelah pH diketahui sudah sesuai, kemudian larutan media tersebut ditambahkan dengan akuades steril sampai volume menjadi 1000 mL. Kemudian memasukkan 15 gram agar ke dalam erlenmeyer, memanaskan sambil diaduk sampai agar larut.

Media yang telah jadi tersebut ditutup dengan aluminium foil dan selanjutnya mensterilkan media dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C,

tekanan 1,2 selama 15 menit. Setelah tekanan autoclave menunjuk angka 0, media segera dikeluarkan dari *autoclave*.

Membuat media MS0 semisolid dengan komposisi media yang sama seperti komposisi media MS0 padat, hanya saja jumlah dari agar setengah dari pembuatan media padat. Kemudian menempatkan media pada botol kultur dan disimpan dengan setiap botol berisi \pm 50 mL media. Kemudian menambahkan *cefotaxime* pada MS0 padat dan MS0 semisolid sebelum media digunakan.

3.4.7 Pembuatan media Luria Bertani (LB)

Medium LB dipreparasi sesuai komposisi berikut, 10 g/L trypton, 5 g/L *yeast extract*, 10 g/L NaCl. Semua bahan dilarutkan ke dalam 1000 mL akuades dan diatur pH medium sebesar 7. Medium LB 20 mL ditempatkan ke dalam botol kultur (volume 100 mL), kemudian mulut botol ditutup dengan aluminium foil dan disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121° C selama 15 menit. Medium LB yang sudah disterilkan dapat diinokulasi *A. rhizogenes*. Satu loop koloni *A. rhizogenes* dari stok agar miring diinokulasikan ke dalam 20 mL medium LB, kemudian diinkubasi di dalam shaker inkubator pada suhu 28° C dengan kecepatan 100 rpm selama 1 hari.

3.4.8 Induksi akar dari eksplan daun *Talinum paniculatum* Gaertn.

1. Sterilisasi bahan

Eksplan daun tanaman ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) dilakukan sterilisasi bertingkat dengan merendam dan mengusap permukaan eksplan dengan larutan detergen selama 3 menit kemudian dilakukan sterilisasi dengan merendam eksplan menggunakan clorox 10% dan menggoyangkan

dengan pelan selama 4 menit dan selanjutnya dibilas dengan menggunakan akuades steril sebanyak tiga kali, sterilisasi dengan menggunakan clorox dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet*. Daun yang telah disterilisasi kemudian dipotong ± 1 cm menggunakan skalpel steril beralaskan kertas saring steril.

2. Preparasi medium penginfeksi *A. rhizogenes* ke eksplan

Mengambil 5 mL biakan *A. rhizogenes* di medium LB yang telah berusia 24 jam dicampur pada 50 mL medium MS0 cair. *Asetosyringone* sebesar 600 μ L ditambahkan ke medium penginfeksi. Proses pencampuran dilakukan secara aseptik di dalam *laminar air flow cabinet*.

3. Infeksi *A. rhizogenes* ke eksplan

Eksplan (daun tanaman ginseng jawa) yang sudah dipotong-potong dengan ukuran ± 1 cm dipindahkan ke cawan petri yang berisi medium penginfeksi *A. rhizogenes*. Agitasi dilakukan berlahan-lahan secara manual selama ± 5 menit, kemudian eksplan ditiriskan di dalam cawan petri steril beralaskan kertas saring steril selama ± 1 menit. Potongan daun yang sudah ditiriskan, ditempatkan ke dalam cawan petri yang berisi medium MS0 padat.

Eksplan daun yang sudah terinfeksi dengan *A. rhizogenes* langsung ditumbuhkan pada media MS0 padat pada cawan petri ukuran diameter ± 9 cm selama 3 hari kemudian memindahkan eksplan pada media MS0 semisolid + *cefotaxime* yang juga ditempatkan pada cawan petri. Eksplan daun pada media MS0 semisolid + *cefotaxime* ditumbuhkan selama 6 hari dan diperoleh akar dengan ukuran ± 2 cm. Keberhasilan transformasi ditandai dengan munculnya

akar rambut dari bagian tepi potongan daun. Akar rambut berukuran ± 2 cm selanjutnya dilakukan perlakuan periode subkultur. Subkultur dilakukan pada media MS0 semisolid + *cefotaxime* pada cawan petri, untuk satu kali ulangan dengan menanam 4 akar pada 2 cawan petri dan setiap perlakuan dilakukan sebanyak 8 ulangan. Masing-masing akar pada perlakuan periode subkultur dikultur selama 10 minggu baru kemudian dilakukan pemanenan.

3.4.9 Subkultur

Periode subkultur dihitung ketika akar rambut ditumbuhkan pada media MS0 semisolid + *cefotaxime* dengan ukuran awal akar ± 2 cm. Sehingga untuk perlakuan tanpa subkultur, berat segar, berat kering dan kadar saponin langsung diukur setelah ditumbuhkan pada MS0 semisolid+*cefotaxime* selama 10 minggu. Sedangkan pengukuran berat segar, berat kering dan kadar saponin akar untuk perlakuan periode subkultur 2 minggu, 3 minggu, dan 4 minggu diukur setelah perlakuan dan umur akar 10 minggu pada media MS0 semisolid+*cefotaxime*. Terdapat 4 perlakuan periode subkultur yaitu tanpa perlakuan subkultur dengan ulangan sebanyak 8 ulangan, perlakuan periode subkultur 2 minggu dengan banyak ulangan 8, perlakuan periode subkultur tiap 3 minggu dengan 8 ulangan, dan perlakuan periode subkultur 4 minggu dengan 8 ulangan.

3.4.10 Ekstraksi saponin

Ekstraksi saponin dilakukan dengan pertama-tama memanen akar kemudian menimbang berat segar, menyimpan di kertas saring dan menyimpannya dalam oven dengan suhu 50° selama 7 hari. Setelah kering kemudian menimbang berat kering akar tanaman dan selanjutnya menggerusnya dengan mortar untuk

mendapatkan tekstur bubuk. Mengambil 0,04 gram bubuk akar kering dan menambahkannya dengan 4 mL etanol 96% dan memanaskannya dengan suhu 80°C pada *waterbath* selama 45 menit. Kemudian mengambil supernatan dan memekatkannya menjadi 0,2 mL. Selanjutnya dilakukan uji kadar saponin dengan dua metode yaitu:

1. Uji kadar saponin dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji KLT dengan cara menotolkan sampel ekstrak akar menggunakan mikro pipet pada pelat *silica gel* GF₂₅₄, kemudian mengamati fase gerak pada pelat dalam bejana yang berisi larutan eluen dengan komposisi larutan 2-propanol: air = 14: 3. Sebagai larutan pembanding menggunakan cuplikan saponin (Calbiochem) 100.000 ppm yang kemudian ditotolkan sebanyak 1 µL pada pelat *silica gel* GF₂₅₄, sedangkan sampel ditotolkan sebanyak 5 µL pada pelat *silica gel* GF₂₅₄. Setelah fase gerak selesai kemudian dilakukan penyemprotan pada permukaan pelat *silica gel* GF₂₅₄ dengan menggunakan larutan anisaldehyd-asam sulfat dan selanjutnya dilakukan pemanasan dengan oven 100°C selama 10 menit (Stahl, 1985). Kemudian mengamati dan mengukur luas noda yang terbentuk.

Kandungan saponin dalam ekstrak etanol akar rambut ginseng jawa dideteksi dengan membandingkan nilai Rf (*retardation factor*) noda yang terbentuk pada pelat *silica gel* GF₂₅₄ dari ekstrak etanol akar rambut ginseng jawa. Nilai Rf sampel dibandingkan dengan nilai Rf saponin standar.

$$Rf = \frac{\text{jarak antara titik awal penotolan dengan pusat noda}}{\text{jarak antara titik awal penotolan dengan garis akhir larutan pengembang.}}$$

Pada bercak noda yang memiliki Rf sama dan warna yang sama diduga memiliki senyawa yang sama (Yachya, 2012). Noda saponin yang didapat pada pelat *silica gel* GF₂₅₄ memiliki warna kuning kehijauan sebagai noda saponin setelah penyemprotan dengan larutan anisaldehyd-asam sulfat dan pemanasan.

2. Uji kadar saponin dengan spektrofotometer

Ekstrak akar rambut *Talinum paniculatum* Gaertn. sebanyak 0,2 mL diencerkan menjadi 10 mL dengan akuades yang kemudian diukur nilai absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 365 nm (Stahl, 1985). Kemudian nilai absorbansi dimasukkan pada persamaan regresi kurva standar saponin $y = 0,001x$ dengan y adalah nilai absorbansi dan x adalah konsentrasi saponin pada larutan (ppm) (Yachya, 2012). Nilai saponin yang diperoleh dikonversi menjadi mg/g berat kering akar dengan rumus:

$$S = \frac{\text{Saponin di dalam sampel} \times \text{fp}}{\text{Berat sampel}}$$

fp = faktor pengenceran

Konsentrasi saponin dalam larutan diketahui berdasarkan persamaan regresi dan pengenceran dilakukan sebanyak 50 kali sedangkan akar yang diekstrak sebanyak 0,04 gram, sehingga dimasukkan rumus menjadi:

$$S = \frac{\text{Saponin di dalam sampel (ppm)} \times 50}{0,04 \text{ g akar kering}}$$

3.5 Variabel Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental dan variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Variabel bebas : periode subkultur akar.

2. Variabel terikat : kadar saponin akar, berat segar akar, berat kering akar.
3. Variabel kendali : eksplan, media, intensitas cahaya, suhu, pH.

3.6 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dimana metode yang diuji menggunakan 4 macam perlakuan, yaitu perlakuan periode subkultur 2 minggu, 3 minggu, 4 minggu dan tanpa perlakuan subkultur. Penelitian ini terdapat perlakuan terhadap obyek penelitian dan terdapat kontrol sebagai pembanding terhadap hasil. Terdapat 8 kali ulangan pada setiap perlakuan untuk pengamatan berat kering dan berat basah akar rambut dan pengamatan dilakukan setelah akar berumur 10 minggu setelah awal perlakuan sedangkan untuk pengamatan kadar saponin terdapat 2 ulangan untuk masing-masing perlakuan.

3.7 Pengumpulan Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini berupa berat segar (g) berat kering (g) dan kadar saponin akar tanaman *Talinum paniculatum* Gaertn. pada setiap kelompok perlakuan subkultur. Kadar saponin, berat segar, dan berat kering akar diukur setelah umur akar 10 minggu pada MS0 semisolid+ *cefotaxime*.

Pengamatan dilakukan terhadap berat segar, berat kering akar rambut, dan kadar saponin akar. Berat segar akar ditentukan dengan menimbang akar segar setelah panen, berat kering akar ditentukan dengan menimbang akar rambut yang telah dikeringkan pada suhu 50° selama 7 hari. Analisis kandungan saponin dilakukan secara kuantitatif dengan mengukur nilai ansorbansi ekstrak etanol akar

rambut, kemudian nilai absorbansinya dimasukkan ke persamaan regresi kurva standar untuk memperoleh kandungan saponin (mg)/berat kering sampel (g). Analisis semi kuantitatif kandungan saponin dilakukan dengan menotolkan ekstrak etanol akar rambur yang sudah dipekatkan ke pelat KLT (*silica gel GF₂₅₄*). Noda saponin yang terbentuk diukur dan dihitung luasnya/0,04 g berat kering sampel. Data luas noda saponin merupakan gambaran kandungan saponin pada sampel.

3.8 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa berat segar, berat kering akar dan kadar saponin akar. Data berat kering akar diuji dengan menggunakan *one way* ANOVA. Sebagai syarat ANOVA, pertama dilakukan uji normalitas (*Test of normality*) dan uji varians (*Test homogeneity of Variance*). Setelah dilakukan uji tersebut dan diperoleh distribusi data normal yaitu nilai signficancy untuk masing-masing kelompok semuanya $>0,05$ dan uji varians menunjukkan $p > 0,05$, yaitu tidak ada varians antara kelompok data yang dibandingkan dengan kata lain varians data adalah sama. Kemudian dilakukan uji *one way* ANOVA. Pada uji ANOVA diperoleh $p < 0,05$ yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna pada tiap kelompok. Selanjutnya untuk mengetahui pada kelompok mana terdapat perbedaan yang bermakna dilanjutkan dengan analisis Post-Hoc menggunakan Uji LSD (*Least Significant Difference*). Analisis semi kuantitatif kadar saponin dengan mengukur luas noda saponin pada pelat *silica gel GF₂₅₄*. Pengaruh periode subkultur terhadap luas noda saponin dianalisis secara deskriptif.