

BAB III

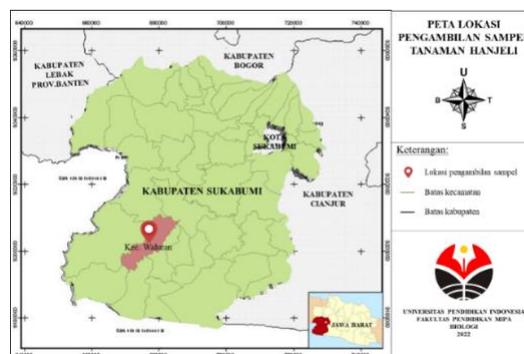
METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

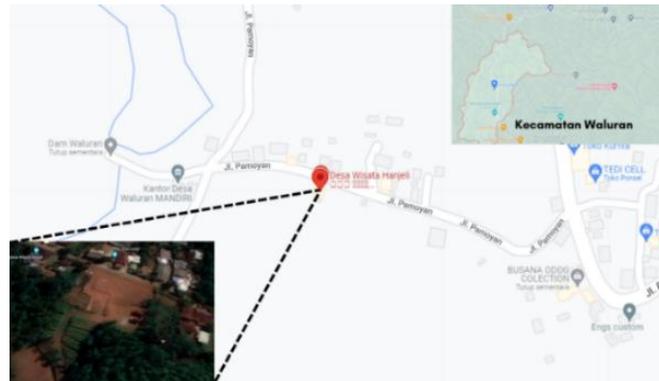
Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif. Furchan (2004) menyatakan bahwa penelitian deskriptif mengutamakan objektivitas, menelitinya secara teratur dan cermat, serta menggambarkan fenomena sebagaimana adanya. Data yang dikumpulkan bersifat deskriptif, sehingga tidak untuk mencari penjelasan, menguji hipotesis maupun implikasi. Penelitian ini hanya menunjukkan kandungan metabolit yang ditemukan pada ekstrak akar dan daun hanjeli ketan dan hanjeli batok menggunakan alat GC-MS serta aktivitas antioksidan pada akar dan daun hanjeli batok menggunakan metode DPPH.

3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Maret-Juni 2023 yang meliputi pengambilan sampel hingga analisis. Pengambilan sampel akar dan daun hanjeli ketan dan hanjeli batok di Desa Wisata Hanjeli, Jl. Pamoyan, Kecamatan Waluran, Kabupaten Sukabumi, Jawa Barat (Gambar 3.1 dan Gambar 3.2). Persiapan penelitian dan ekstraksi sampel dilakukan di Laboratorium Riset Lingkungan Departemen Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia. Analisis metabolit menggunakan instrumen *Gas Chromatography–Mass Spectrophotometer* (GC-MS) dilakukan di Pusat Laboratorium Forensik Bareskim Polri, Sentul. Uji aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Aplikasi Kimia dan Pelayanan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran.



Gambar 3.1. Peta Lokasi Pengambilan Sampel



Gambar 3.2. Lokasi Desa Wisata Hanjeli
(Google Maps, 2022)

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan penelitian ini adalah tanaman hanjeli ketan dan hanjeli batok yang dibudidayakan di Desa Wisata Hanjeli. Sampel dalam penelitian ini adalah akar dan daun dari tanaman hanjeli ketan dan hanjeli batok yang sudah siap panen. Bagian daun yang digunakan adalah daun pada buku ke 2-5 dari pucuk tanaman. Bagian akar yang digunakan adalah seluruh bagian akar dari pangkal hingga ke ujung akar (Gambar 3.3).



Gambar 3.3. Organ yang digunakan: A. Daun Hanjeli Batok; B. Daun Hanjeli Ketan; C. Akar Hanjeli Batok; D. Akar Hanjeli Ketan

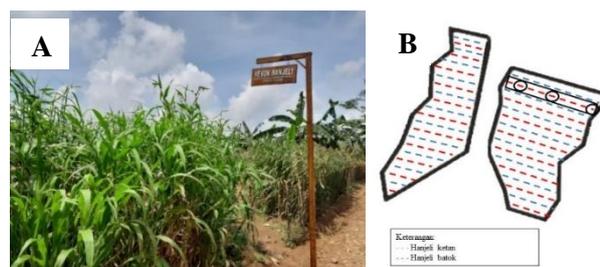
3.4 Prosedur Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan yaitu pengambilan sampel, pengukuran faktor abiotik, persiapan bahan, pembuatan ekstrak akar dan daun hanjeli ketan dan hanjeli batok, analisis metabolit dengan GC-MS, uji aktivitas antioksidan dan analisis data.

3.4.1 Pengambilan sampel

Akar dan daun hanjeli ketan dan hanjeli batok diperoleh dari Desa Wisata Hanjeli yang dibudidayakan dekat dengan pemukiman warga. Hanjeli ketan dan hanjeli batok ditanam pada bidang lahan yang sama. Pengambilan tanaman yang dijadikan sampel pada penelitian ini menggunakan teknik *random sampling*. Sampel akar yang digunakan adalah seluruh bagian akar dari pangkal hingga ke ujung akar. Bagian daun yang digunakan adalah daun pada buku ke 2-5 dari pucuk tanaman.

Dari total luas lokasi budidaya hanjeli 7 hektar, sampel akar dan daun kedua jenis hanjeli dipilih dari dua lahan yang memiliki luas masing-masing 300 m² dan 400 m² seperti disajikan pada Gambar 3.4. Sampel akar dan daun diambil dari 3 titik tanaman hanjeli yang siap panen secara acak. Setiap sampel masing-masing dikumpulkan sebanyak 500 gram dan ditempatkan ke dalam wadah.



Gambar 3.4. Pengambilan Sampel: A. Lahan Pengambilan Sampel; B. Ilustrasi Pengambilan Sampel

3.4.2 Pengukuran Faktor Abiotik

Pengukuran faktor abiotik dilakukan pada tempat tumbuhnya hanjeli. Faktor abiotik yang diukur adalah faktor edafik yaitu pH, suhu, dan materi organik tanah (MOT), serta faktor klimatik yaitu kelembaban dan suhu udara. Tingkat keasaman (pH) diukur menggunakan *soil tester* (Gambar 3.5A). Suhu tanah diukur menggunakan termometer pada kedalaman 30 cm (Gambar 3.5B). Ketinggian tempat diukur dengan altimeter (Gambar 3.5C).

Analisis materi organik tanah (MOT) dilakukan menggunakan metode *Walkey-Black*. Sampel tanah dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 100°C selama 24 jam. Tanah yang telah diayak menggunakan saringan, ditimbang sebanyak 0,5 g dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 mL. Sebanyak 10 ml K₂Cr₂O₇ 1N ditambahkan ke dalam sampel tanah dan diaduk. Sebanyak 20 mL H₂SO₄ pekat ditambahkan ke dalam larutan dan diaduk perlahan selama satu menit dan

didiamkan selama 20-30 menit (Gambar 3.6). Larutan diencerkan dengan akuades hingga volume 200 mL. Sebanyak 10 mL H_3PO_4 85%, 0,2 gr NaF, dan 30 tetes indikator difenilamin ditambahkan ke dalam larutan sampel tanah. Sampel tanah dititrasi dengan ferro amonium sulfat hingga larutan berubah menjadi warna hijau kristal (Gambar 3. 7).



Gambar 3.5. Pengukuran Faktor Abiotik: A. *Soil tester*; B. Termometer; C. Altimeter



Gambar 3.6. Proses Analisis MOT



Gambar 3.7. Hasil Titrisasi MOT

Berdasarkan hasil pengukuran abiotik diketahui di daerah tempat hanjeli tumbuh memiliki pH tanah 7,03, suhu tanah 24,8°C, dan kadar organik tanah sebesar 5,025%. Suhu udara Desa Wisata Hanjeli yaitu 25,3°C, kelembaban udara sebesar 91%, dan memiliki ketinggian tempat yaitu 350 mdpl.

3.4.3 Persiapan Bahan

Sampel akar dan daun kedua jenis hanjeli dipisahkan dari kotoran atau bahan-bahan asing lainnya dengan membuang bagian yang tidak perlu. Pengeringan sampel dilakukan sesuai metode penelitian Puspitasari & Proyogo (2017). Sampel akar dan daun kedua hanjeli dicuci bersih untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada sampel kemudian ditiriskan (Gambar 3.8). Berat basah masing-masing sampel ditimbang kemudian dikering anginkan selama beberapa hari hingga kadar air berkurang.

Sampel akar dan daun dipotong, ditimbang selanjutnya dikeringkan dalam inkubator pada suhu 50°C hingga berat konstan dan diperoleh simplisia (Gambar 3.9) sesuai dengan metode penelitian yang dilakukan Warnis dkk. (2020). Berdasarkan penelitian Winangsih dkk. (2013) sampel yang dikeringkan dilakukan

penimbangan secara berkala hingga berat konstan. Jika berat sampel konstan maka pengeringan dihentikan. Simplisia akar dan daun kedua jenis hanjeli masing-masing dihaluskan menggunakan *blender* dan diayak menggunakan saringan 100 *mesh* hingga diperoleh serbuk simplisia (Gambar 3.10 dan Gambar 3.11). Serbuk simplisia ditempatkan pada wadah yang melindungi simplisia terhadap cahaya.



Gambar 3.8. Simplisia Hasil Pengeringan: A. Daun Hanjeli Batok; B. Daun Hanjeli Ketan; C. Akar Hanjeli Batok; D. Akar Hanjeli Ketan



Gambar 3.9. Pengeringan Sampel menggunakan Inkubator Suhu 50°C



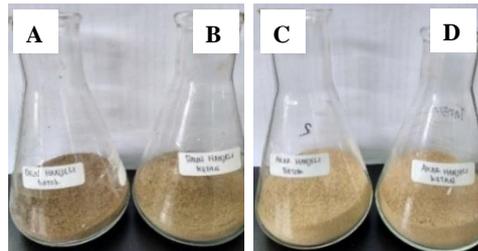
Gambar 3.10. Penghalusan Sampel menggunakan *Blender*



Gambar 3.11. Pengayakan Sampel menggunakan Saringan 100 *mesh*

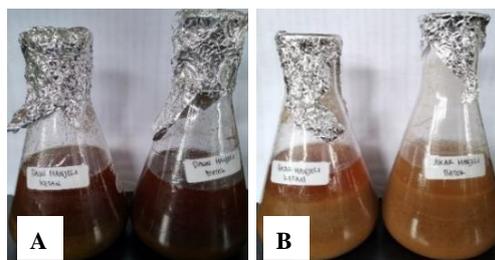
3.4.4 Pembuatan Ekstrak Akar dan Daun Hanjeli Ketan dan Hanjeli Batok

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol p.a. 70% sesuai dengan metode penelitian Setiani dkk. (2017). Berdasarkan penelitian Husna dkk. (2016) perbandingan sampel serbuk simplisia dan pelarut adalah 1:10. Serbuk simplisia untuk setiap sampel ditimbang sebanyak 20 g dan dilarutkan dengan 200 mL pelarut etanol p.a. 70% dalam erlenmeyer (Gambar 3.12).

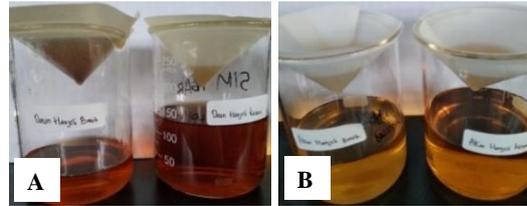


Gambar 3.12. Serbuk Simplisia: A. Daun Hanjeli Batok; B. Daun Hanjeli Ketan; C. Akar Hanjeli Batok; D. Akar Hanjeli Ketan

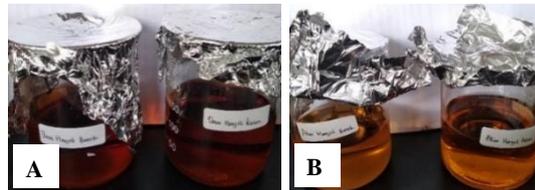
Berdasarkan metode pada penelitian Senja dkk. (2014) perendaman dilakukan selama 3 x 24 jam sambil sesekali dilakukan pengadukan. Selama perendaman, erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil untuk mencegah penguapan (Gambar 3.13). Hasil rendaman disaring menggunakan kertas saring *Whatman* No.1 untuk memisahkan ampas serbuk simplisia dengan hasil ekstraksi (Filtrat I). Berdasarkan metode pada penelitian Chairunnisa dkk. (2019), ampas yang telah dipisahkan dilakukan perendaman kembali dengan etanol p.a. 70% sebanyak 50 mL diaduk selama 5 menit, kemudian disaring dan menghasilkan filtrat II. Hasil ekstraksi filtrat I dan II dicampur dan disaring menggunakan kertas saring *Whatman* No.1 dan menghasilkan filtrat III (Gambar 3.14 dan Gambar 3.15). Filtrat yang diperoleh diuapkan untuk menghilangkan pelarutnya dengan menggunakan *waterbath shaker* pada suhu 70°C hingga diperoleh ekstrak kental (Gambar 3.16). Hasil ekstraksi disimpan dalam botol vial pada suhu ruang dan siap digunakan untuk analisis metabolit dengan GC-MS dan uji aktivitas antioksidan (Gambar 3.17).



Gambar 3.13. Maserasi Serbuk Simplisia: A. Daun Hanjeli; B. Akar Hanjeli



Gambar 3.14. Penyaringan Ekstrak: A. Daun Hanjeli; B. Akar Hanjeli



Gambar 3.15. Ekstrak Hasil Maserasi: A. Daun Hanjeli; B. Akar Hanjeli



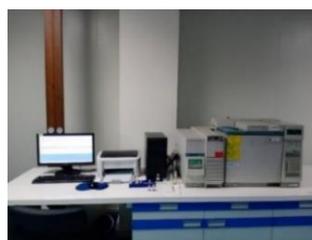
Gambar 3.16. Penguapan Ekstrak menggunakan *Waterbath*



Gambar 3.17. Ekstrak Akar dan Daun Hanjeli Hasil Penguapan

3.4.5 Analisis Senyawa Bioaktif dengan GC-MS

Analisis metabolit pada ekstrak akar dan daun hanjeli ketan dan batok dilakukan menggunakan alat *Gas Chromatography–Mass Spectrophotometer* (GC-MS) di Pusat Laboratorium Forensik Bareskim. Instrumen GC-MS yang digunakan yaitu AGILENT 5973 tahun 2004 (Gambar 3.18), dengan tipe kolom Agilent 190915-433UI HP 5 MS ultra Inert (5% *Phenyl Methyl Siloxane*), panjang kolom 30 m, ketebalan kolom 0,25 μm , dan diameter kolom 250 μm . Gas helium digunakan sebagai gas pembawa pada laju aliran konstan 1 mL/menit. Volume sampel yang diinjeksikan adalah 1 μL . Suhu oven diatur 60°C lalu ditingkatkan hingga 290°C dengan kecepatan 15°C/menit. Detektor spektrofotometer massa dioperasikan dengan pemindaian 35-650 m/z . *Electron Multiplier Voltage* (EM Voltage) pada 1247 V. Total waktu menjalankan GC-MS adalah 43 menit. Hasil kromatogram dan spektrum massa diidentifikasi dengan perangkat lunak WILLEY09TH.



Gambar 3.18. GC-MS AGILENT 5973

3.4.5.1 Analisis Data Senyawa Bioaktif dengan GC-MS

Data yang diperoleh dari analisis metabolit dengan GC-MS berupa grafik yang menunjukkan jenis metabolit dan intensitas puncak yang menunjukkan kadar metabolit diidentifikasi dengan cara melihat kemiripannya (*similarity index*) dari data *library* WILLEY09TH dengan data yang ada di pustaka *National Institute of Standards and Technology* (NIST). Senyawa yang ditampilkan pada penelitian ini adalah senyawa yang memiliki indeks kesamaan minimal 80%. Informasi nama umum dan IUPAC bagi setiap senyawa diperoleh dari situs web PubChem *National Center for biotechnology information* (NCBI). Hasil pengolahan data disajikan dengan menggunakan tabel, diagram venn, dan *heatmap*. Informasi tentang aktivitas biologis dan manfaat dari setiap senyawa diperoleh dari studi literatur.

3.4.6 Uji Aktivitas Antioksidan

Pada penelitian ini, metode DPPH dengan spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan (Gambar 3.19). Pada metode DPPH, radikal bebas DPPH digunakan untuk menguji suatu senyawa antioksidan dalam meredam radikal bebas. Prinsip kerja metode DPPH didasarkan pada kemampuan DPPH untuk menerima atom hidrogen yang didonorkan oleh antioksidan. Setelah atom hidrogen diperoleh, kemampuan absorbansi DPPH menurun dan warna DPPH berubah menjadi kuning pucat, yang kemudian dibaca menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Marxen, dkk., 2007). Pada penelitian ini, metanol digunakan sebagai pelarut dalam uji aktivitas antioksidan karena dapat melarutkan kristal DPPH dan komponen non polar didalamnya (Molyneux, 2004).



Gambar 3.19. Spektrofotometer UV-Vis 1800

3.4.6.1 Pembuatan Larutan DPPH

Padatan DPPH sebanyak 0,001 g ditimbang dan dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer 50 mL, ditambahkan 6,25 mL metanol, kemudian dihomogenkan hingga larut menggunakan *magnetic stirrer* selama 15 menit (Gambar 3.20). Seluruh permukaan tabung erlenmeyer dilapisi dengan aluminium foil untuk

mencegah kerusakan karena cahaya. Menurut hukum Beer dan praktik spektrofotometri standar, konsentrasi DPPH harus disesuaikan sehingga nilai absorbansinya kurang dari 1,0, yang berarti intensitas cahaya berkurang tidak lebih dari sepuluh kali lipat ketika melewati sampel (Pekal & Pyszynska, 2012). Absorbansi larutan DPPH diukur pada panjang gelombang (λ) 515 nm hingga mencapai 0,8-0,9 nm.



Gambar 3.20. Penghomogenan Larutan DPPH

3.4.6.2 Pembuatan Larutan Standar

3.4.6.2.1 Pembuatan Larutan Blanko

Larutan blanko dibuat dengan menggunakan pelarut metanol sebanyak 1 mL.

3.4.6.2.2 Pembuatan Larutan Kontrol

Larutan kontrol dibuat dengan menggunakan pelarut metanol sebanyak 0,8 mL dan 0,2 mL larutan DPPH.

3.4.6.2.3 Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Akar dan Daun Hanjeli Batok

Ekstrak akar dan daun hanjeli batok ditimbang masing-masing 0,0278 g dan 0,0305 g dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf, kemudian ditambahkan 5 mL metanol (Gambar 3.21). Larutan ekstrak dihomogenkan dengan *vortex*. Larutan cenderung sulit larut, sehingga dihomogenkan dengan *ultrasonic cleaner* dan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 5 menit hingga larut (Gambar 3.22 dan Gambar 3.23). Pada setiap larutan induk sampel dilakukan 5 kali pengenceran untuk mendapatkan nilai absorbansi tidak lebih dari 1, dimana masing-masing larutan ekstrak diambil 1 mL dan ditambahkan 4 mL metanol. Larutan ekstrak akar dan daun hanjeli batok memiliki konsentrasi yang berbeda, ini disebabkan karena perbedaan berat sampel yang digunakan. Konsentrasi larutan ekstrak akar hanjeli batok adalah 1.112 ppm, sedangkan ekstrak daun hanjeli batok adalah 1.220 ppm.

Pada setiap larutan ekstrak dibuat larutan seri yang berbeda. Pada ekstrak akar hanjeli batok dibuat larutan seri dengan volume larutan sampel sebanyak 100, 200, 300, 400, dan 500 μ L (Tabel 3.1) sehingga konsentrasi ekstrak akar adalah 111,

222, 334, 445, dan 556 ppm, sedangkan pada ekstrak daun hanjeli batok dibuat larutan seri dengan volume sampel sebanyak 80, 200, 320, 440, dan 560 μL (Tabel 3.2) sehingga konsentrasi ekstrak daun adalah 98, 244, 390, 537, dan 683 ppm.



Gambar 3.21. Larutan Ekstrak Sampel



Gambar 3.22. Penghomogenan Larutan dengan *Ultrasonic Cleaner*



Gambar 3.23. Penghomogenan Larutan dengan *Centrifuge*

3.4.6.3 Pengukuran Absorbansi dengan Spektrofotometer UV-Vis

3.4.6.3.1 Larutan Kontrol

Larutan kontrol yang telah diinkubasi selama 30 menit dimasukkan ke dalam kuvet kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang (λ) 515 nm.

3.4.6.3.2 Larutan Stok

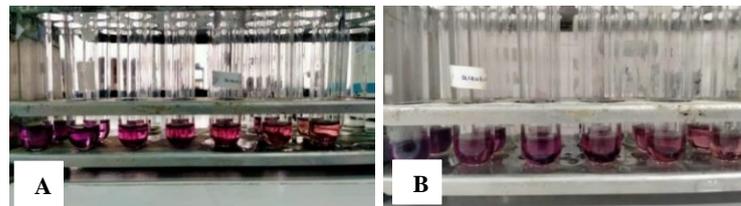
Larutan stok dan metanol berturut-turut dimasukkan ke dalam tabung reaksi sesuai dengan volume larutan seri ekstrak akar dan daun hanjeli batok yang ditunjukkan pada Tabel 3.1. dan Tabel 3.2. Sebanyak 0,2 mL larutan DPPH ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi dan dihomogenkan. Berdasarkan metode Molyneux (2004) semua larutan uji diinkubasi selama 30 menit menunggu waktu reaksi hingga terjadi perubahan warna (Gambar 3.24 dan Gambar 3.25). Pembuatan larutan seri ini dilakukan secara duplo. Larutan stok diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang (λ) 515 nm (Gambar 3.26). Brighente dkk. (2007) menyatakan bahwa kemampuan mereduksi radikal DPPH ditentukan dengan penurunan absorbansi pada panjang gelombang 515 nm yang diinduksi oleh antioksidan setelah 30 menit.

Tabel 3.1. Pembuatan Larutan Seri Ekstrak Akar Hanjeli Batok

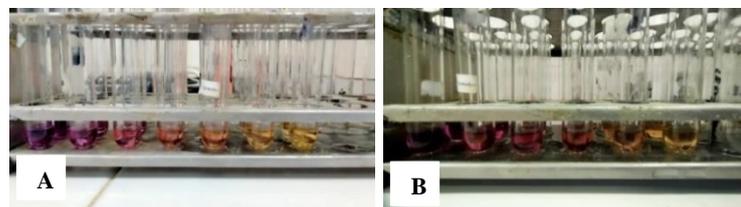
Tabung reaksi	Volume Sampel (μL)	Larutan Uji (mL)		
		Larutan stok	Etanol	DPPH
A	0	0	0,8	0,2
B	100	0,1	0,7	0,2
C	200	0,2	0,6	0,2
D	300	0,3	0,5	0,2
E	400	0,4	0,4	0,2
F	500	0,5	0,3	0,2

Tabel 3.2. Pembuatan Larutan Seri Ekstrak Daun Hanjeli Batok

Tabung reaksi	Volume Sampel (μL)	Larutan Uji (mL)		
		Larutan stok	Etanol	DPPH
A	0	0	0,8	0,2
B	80	0,08	0,72	0,2
C	200	0,20	0,60	0,2
D	320	0,32	0,48	0,2
E	440	0,44	0,36	0,2
F	560	0,56	0,24	0,2



Gambar 3.24. Larutan Ekstrak Hanjeli Sebelum Diinkubasi: A. Akar; B. Daun



Gambar 3.25. Larutan Ekstrak Hanjeli Setelah Diinkubasi: A. Akar; B. Daun



Gambar 3.26. Pengukuran Absorbansi dengan Spektrofotometer UV-Vis

3.4.7 Analisis Data Uji Aktivitas Antioksidan

3.4.7.1 Penentuan nilai % Inhibisi dan Nilai IC_{50}

Parameter yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan adalah *Inhibitory Concentration* (IC_{50}). Nilai *Inhibitory Concentration* (IC_{50}) merupakan konsentrasi efektif (ppm) antioksidan yang dapat menghambat aktivitas radikal bebas sebesar 50% (Molyneux, 2004). Nilai IC_{50} dapat dihitung dengan mengetahui

Zahra Apriyani Pratiwi, 2023

PROFIL METABOLIT SERTA AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PADA AKAR DAN DAUN TANAMAN HANJELI (*Coix lacryma-jobi L.*) DESA WISATA HANJELI SUKABUMI

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

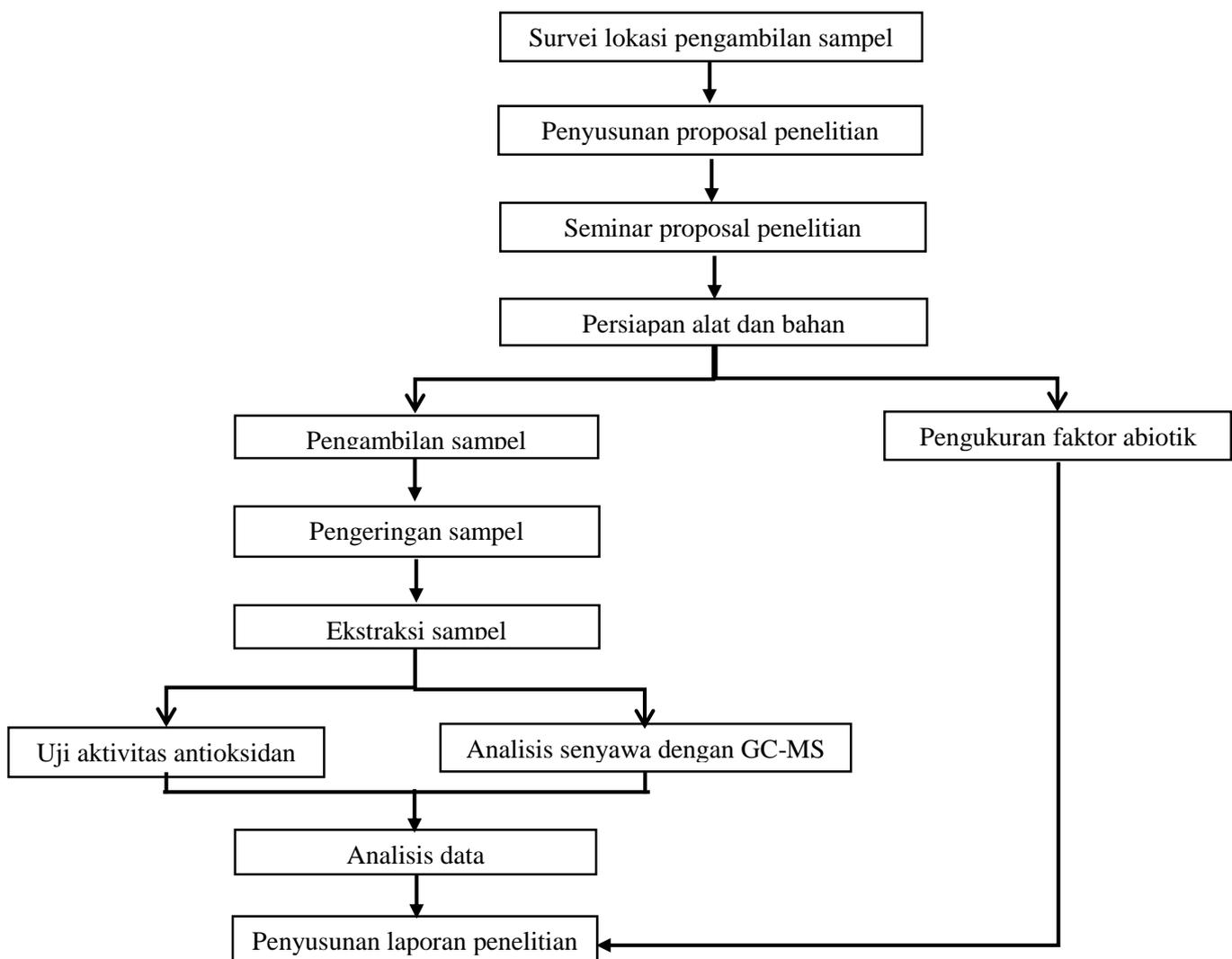
persen penghambatan dari pengujian yang dilakukan. Persentase penghambatan dihitung dengan menggunakan persamaan (Oentarini, dkk., 2011):

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\%$$

Penentuan nilai IC_{50} diperoleh dari persamaan regresi linear yang menyatakan hubungan konsentrasi larutan uji (x) dengan nilai % inhibisi (y), dimana nilai dari y sebesar 50, sehingga akan diketahui konsentrasi efektifnya (Katrin & Bendra, 2015). Dengan hasil ini dapat diketahui persen hambatan dan nilai IC_{50} , dimana pada konsentrasi tertentu dapat menghambat 50% reaksi oksidasi dari radikal bebas.

3.5 Alur Penelitian

Berdasarkan prosedur penelitian yang telah dijelaskan, maka alur penelitian dari penelitian analisis metabolit dan uji aktivitas antioksidan pada akar dan daun hanjeli ketan dan hanjeli batok menggunakan GC-MS dapat dilihat pada Gambar 3.27.



Gambar 3.27. Alur Penelitian