

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada 1 Februari 2023 hingga 14 Juli 2023. Tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini terdiri dari empat tahap, yaitu tahap ekstraksi dari tanaman sambiloto, tahap aplikasi campuran ekstrak sambiloto dan bionutrien S-367B, tahap pengamatan pertumbuhan tanaman, dan tahap karakterisasi ekstrak sambiloto. Tahapan ekstraksi sambiloto dilakukan di Laboratorium Sidat UPI dan Laoratorium Riset Kimia FPMIPA UPI. Sedangkan tahap aplikasi campuran ekstrak sambiloto dan bionutrien S-367B dan tahap pengamatan pertumbuhan tanaman brokoli berlokasi di perkebunan yang berada di daerah Cibodas, Lembang. Tahap karakterisasi ekstrak sambiloto dilakukan di Laboratorium Riset Kimia FPMIPA UPI dan Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA UPI.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan adalah pompa, alat penyiram, pH meter analog ETP306 3in1, neraca analitik, kain muslin, gunting, kompor, gelas kimia (100 mL, 250 mL, dan 1 L), pengaduk, kertas saring, statif dan klem, spatula, termometer, gelas ukur (10 mL, 25 mL, dan 50 mL), tabung reaksi, rak tabung, labu ukur (25 mL, 50 mL, 100 mL, dan 1 L), kuvet, botol semprot, *plastic wrap*, botol vial, mikropipet, pipet, tisu, selotip tak berwarna, kaca arloji, cawan petri, aluminium foil, batang pengaduk, sendok, maserator, labu dasar bulat 1L, vacuum rotary evaporator, corong buchner, freezer, spektrofotometer UV-Vis UV mini 1240, spektrofotometer Shimadzu FTIR.

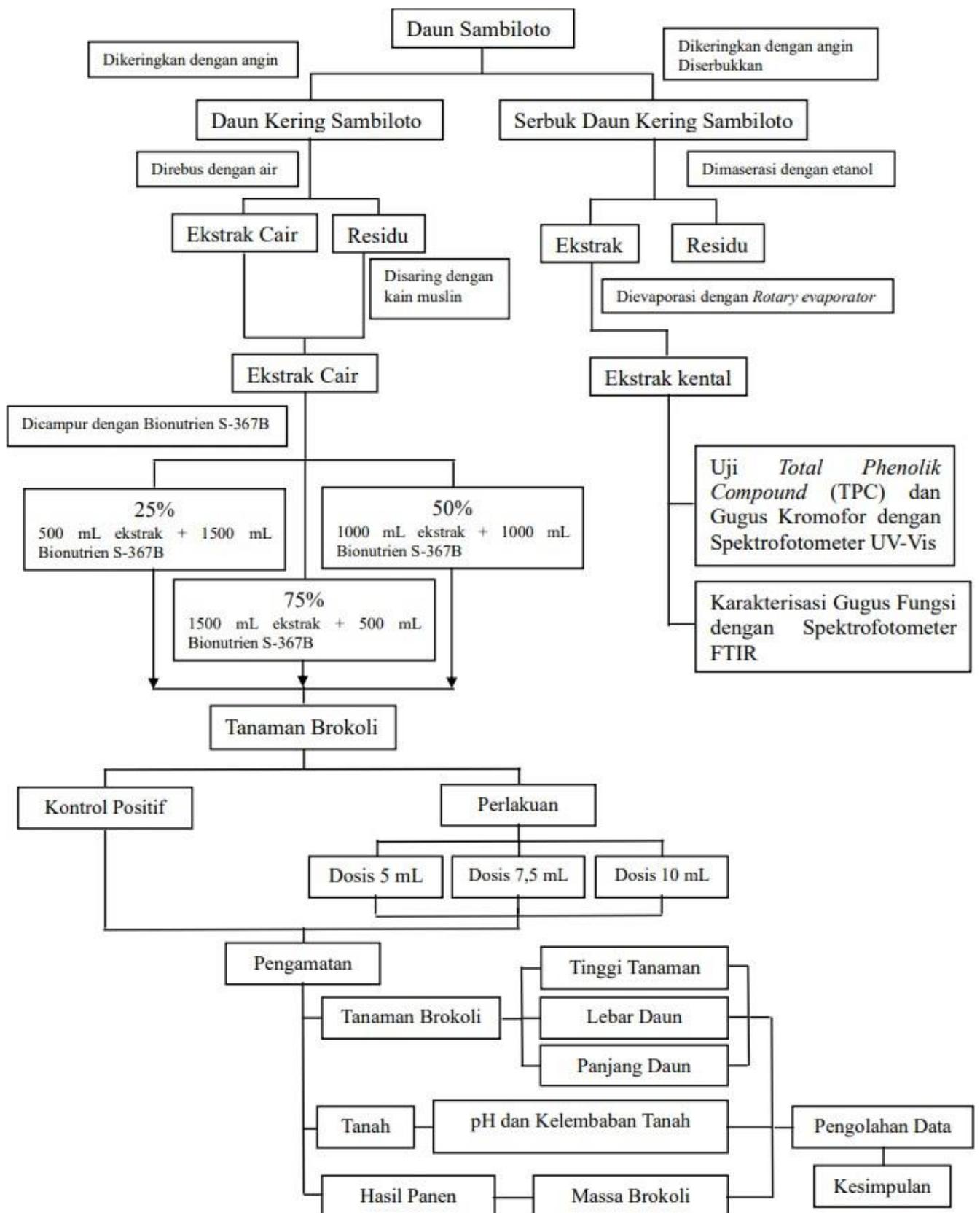
3.2.2 Bahan

Sampel yang digunakan berupa daun kering sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) yang diperoleh dari daerah Kabupaten Ciamis dan Kabupaten Bandung, Jawa Barat yang dikumpulkan pada bulan Januari dan Maret 2023. Sedangkan bahan kimia yang digunakan antara lain berbagai pelarut organik meliputi etanol 96% pro analisis dan akuades. Reagen pada Uji Total Phenolic Compound meliputi larutan Asam Galat, Folin 10%, Na₂CO₃

7%, dan aquades. Bahan yang lain juga digunakan seperti bionutrien S-367B sebagai campuran dalam pengaplikasian.

3.3 Bagan Alir dan Tahapan Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan dalam empat tahapan, yaitu tahap ekstraksi dari tanaman sambiloto, tahap aplikasi biopestisida dan bionutrien S-367B, tahap pengamatan pertumbuhan tanaman, dan tahap analisis ekstrak sambiloto. Pada tahap analisis ekstrak sambiloto meliputi uji total fenolik dan karakterisasi dengan spektrofotometri UV-Vis serta FTIR. Pada tahap aplikasi, bagi tanaman kelompok perlakuan diaplikasikan campuran ekstrak sambiloto dan bionutrien S-367B 3 dosis 5 mL; 7,5 mL; dan 10 mL dalam 1000 mL, sedangkan tanaman brokoli kontrol positif diaplikasikan sesuai perlakuan petani. Pada tahap pengamatan pertumbuhan dilakukan analisis terhadap panjang daun, tinggi tanaman, lebar daun, serta kondisi lingkungan meliputi kelembaban dan pH tanah, dan masa panen (jumlah bunga dan jumlah massa bunga).



Gambar 3.1 Bagan alir penelitian

3.3.1 Ekstraksi Sambiloto (*Andrographis paniculate* Nees.)

Sebelum diekstraksi tanaman sambiloto dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Tahap ekstraksi tanaman sambiloto ini dilakukan 2 kali dengan 2 pelarut yang berbeda. Pertama, daun kering sambiloto diekstrak dengan pelarut aquades untuk mendapatkan ekstrak cair yang akan digunakan dalam pengaplikasian pada tanaman brokoli. Ekstrak cair sambiloto dibuat dengan cara merebus 1 kg dalam 2 liter akuades selama 15-25 menit. Kemudian air rebusan dipindahkan ke dalam wadah. Residu sambiloto disaring dengan kain muslin untuk mendapatkan sisa ekstrak pada residu tersebut. Hasil filtrasi residu digabungkan dengan ekstrak cair dari rebusan.

Kedua, tanaman kering sambiloto dihaluskan dan diekstrak dengan pelarut etanol 96% untuk mendapatkan ekstrak kental yang akan digunakan dalam karakterisasi ekstrak. Ekstrak kental sambiloto dibuat dengan cara maserasi 1 kg dalam 2 liter pelarut selama satu hari. Tanaman sambiloto yang sudah dihaluskan sebanyak 1 kilo gram dimasukkan ke dalam toples direndam menggunakan pelarut etanol 96% (v/v). Penggunaan etanol 96% sebagai pelarut karena mudah didapat, bersifat polar, universal, dan lebih mudah menembus dinding sel ekstrak sehingga menghasilkan ekstrak kental (Markham, K. R., 1998). Pada penelitian yang dilakukan Sani, Y. N., et al. (2015), didapatkan rendemen ekstrak sambiloto paling besar menggunakan pelarut etanol 50% dari pada pelarut 100% air yaitu diperoleh berturut - turut sebesar 19,6% dan 4,53%. Selanjutnya, etanol 96% tidak beracun, selektif, dan mampu mengekstraksi semua molekul non-polar, semi-polar, dan polar. Filtrat hasil ekstraksi dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* yang dilanjutkan diuapkan dengan *waterbath* pada suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental tanaman ditimbang.

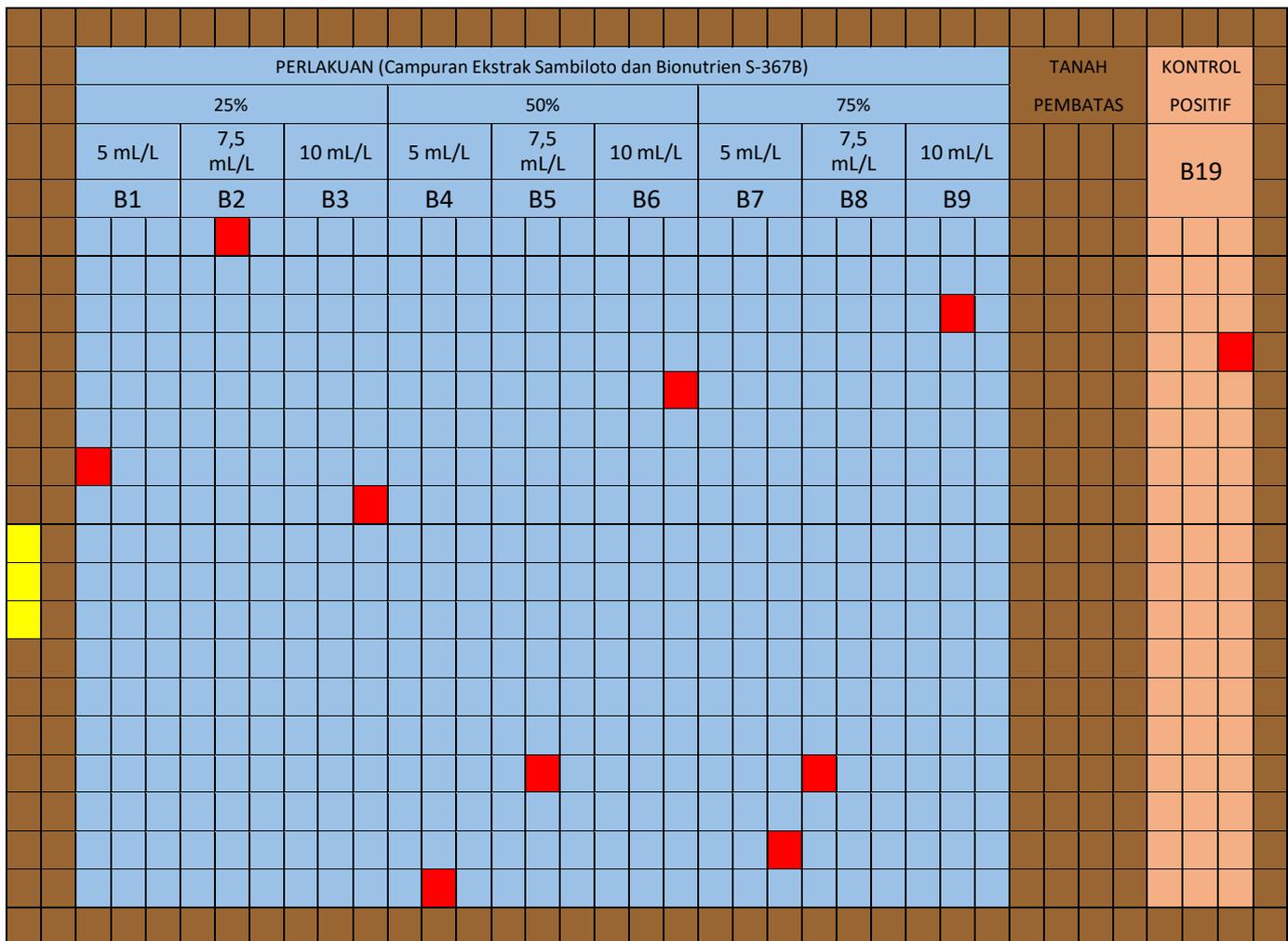
3.3.2 Penomoran Sampel Tanaman Brokoli

Sebelum dilakukan aplikasi pada tanaman brokoli. Dilakukan penomoran sampel untuk mendapatkan sampel tanaman brokoli yang akan diamati. Pada penelitian ini kelompok tanaman brokoli dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu, kelompok perlakuan 3 campuran ekstrak sambiloto dan bionutien S-367B dengan masing-masing 3 dosis, dan kontrol positif.

Kelompok perlakuan campuran ekstrak sambiloto dan bionutrien S-367B diperoleh dari baris ke-1 sampai baris ke-9 sedangkan kontrol positif diperoleh dari tanaman pada baris ke-19. Sebelum dilakukan penomoran sampel, terlebih dahulu dihitung jumlah tanaman brokoli pada lahan pertanian. Terdapat 45 - 55 tanaman brokoli pada satu bedeng. Kemudian dilakukan penomoran secara acak menggunakan aplikasi *random sampling generator* yang diunduh dari *playstore*.

Tabel 3.1 Penomoran sampel tanaman brokoli

Perlakuan									Kontrol positif
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B19
7	18	42	34	31	39	50	14	20	38



Gambar 3.2 Penomoran sampel

Keterangan:

	Tanah pembatas
	Tanah <i>baseline</i>
	Kelompok tanaman perlakuan
	Kelompok tanaman kontrol positif
	Tanaman brokoli yang diamati

3.3.3 Aplikasi dan Pengamatan

Pada kelompok perlakuan, tiga campuran ekstrak sambiloto dan bionutrien S-367B diaplikasikan dengan disemprotkan pada daun tanaman brokoli atau dicocorkan ke tanah setiap satu minggu sekali. Kelompok perlakuan diperoleh dari baris ke-1 sampai ke-9 sedangkan kontrol positif diperoleh dari tanaman baris ke-19. Sebanyak 12 tanaman brokoli atau 1 tanaman per baris dari populasi tiap kelompok diamati.

Ada tiga dosis yang diberikan yaitu 5 mL, 7,5 mL, 10 mL dalam 1000 mL air yang diaplikasikan dengan dicocorkan. Selain itu, pada 30 hari setelah tanam semua tanaman brokoli diberikan campuran fungisida, insektisida, dan pupuk daun dengan dosis berturut – turut 3 sdm (sendok makan), 3 gram, dan 3 tutup botol dalam 30 liter air. Sedangkan tanaman kontrol positif tidak diterapkan campuran ekstrak sambiloto dan bionutrien S-367B, melainkan hanya diberi campuran fungisida, insektisida, dan pupuk daun dengan dosis yang sama. Berikut adalah tiga campuran ekstrak sambiloto dan bionutrien S-367B yaitu:

1. 25% (500 mL ekstrak sambiloto dan 1500 mL bionutrien S-367B)
2. 50% (1000 mL ekstrak sambiloto dan 1000 mL bionutrien S-367B)
3. 75% (1500 mL ekstrak sambiloto dan 500 mL bionutrien S-367B)

Brokoli yang diamati, diberi penanda dengan menggunakan patahan bambu untuk memudahkan dalam pengamatan. Penandaan tanaman brokoli adalah sebagai berikut:



Gambar 3.3 Penandaan sampel yang diamati

3.3.4 Pengukuran pH dan Kelembaban Tanah

Pengukuran pH dan kelembaban tanah dilakukan dengan alat pH meter analog ETP306 3in1 seminggu sekali. Pengukuran pH dan kelembaban tanah dilakukan pada daerah baseline, tanah pada perlakuan dan tanah pada bedeng 19 (kontrol positif).

3.3.5 Pengukuran ketinggian areal perkebunan

Pengukuran ketinggian area perkebunan menggunakan *compass* jam tangan Amazfit BIP. Dengan ketinggian areal perkebunan yaitu 1294 mdpl.

3.3.6 Pengukuran Tinggi, Panjang, dan Lebar Daun Tanaman

Tinggi tanaman, panjang daun, dan lebar daun setiap tanaman brokoli diamati pertumbuhannya setiap minggu sampai tanaman brokoli siap panen. Alat bantu yang digunakan dalam pengukuran pertumbuhan tanaman ini adalah penggaris, meterann, dan alat tulis.

3.3.7 Hasil Panen

Hasil panen tanaman brokoli dicatat jumlah bunga dan juga berat bunga yang ditimbang menggunakan timbangan digital. Tanaman brokoli dipanen pada

umur 70 hst. Waktu panen tanaman brokoli dilakukan pada pagi hari dan saat cuaca cerah.

3.3.8 Penetapan Kadar Total Fenol dengan Metode Folin-Ciocalteu

Metode Folin-Ciocalteu digunakan untuk mengukur total senyawa fenolik dalam sampel. Metode Folin-Ciocalteu ini sering digunakan karena mudah dan sederhana. Senyawa asam fosfomolibdat/fosfotungstat terdapat dalam reagen Folin-Ciocalteu. Metode Folin-Ciocalteu didasarkan pada inti aromatik senyawa fenol yang mengoksidasi gugus hidroksil fenolik dan mereduksi fosfomolibdat dalam kondisi basa untuk menghasilkan kompleks molibdenum tungsten (Senet, M. R. M., dkk., 2018).

Asam galat adalah turunan hidroksibenzoat yang mana merupakan fenolik stabil dan alami yang digunakan dalam penentuan senyawa fenolik total (Ikram, K. D., dkk., 2017). Asam galat bergabung dengan reagen Folin-Ciocalteu menghasilkan larutan kuning yang menunjukkan adanya fenolik, yang kemudian dibasakan dengan Na_2CO_3 . TPC (*Total Phenolic Compound*) dihitung sebagai setara asam galat (GAE) berdasarkan berat kering menggunakan reagen Folin Ciocalteu 10%. Larutan standar asam galat disiapkan pada konsentrasi 60, 70, 80, 90, dan 100 ppm, dan sampel disiapkan pada 600 ppm. Dalam tabung reaksi, digabungkan 0,5 mL standar/sampel dengan 0,4 mL Folin Ciocalteu 10% dan diinkubasi selama 4-8 menit. Terakhir, ditambahkan 4,0 ml Natrium karbonat 7% dan akuades 10 ml dalam tabung reaksi dan dihomogenkan. Diinkubasi selama 2 jam, kemudian diukur pada 759 nm dengan Spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu®) tipe 1240 (Primadiastri, I. Z., dkk., 2021).

3.3.9 Karakterisasi dengan UV-Vis dan FTIR

Setelah dilakukan proses ekstraksi pada sambiloto, tahapan yang selanjutnya dilakukan yaitu karakterisasi ekstrak yang telah diperoleh. Karakterisasi untuk menentukan golongan dari senyawa yang terdapat pada daun sambiloto dan diduga aktif berpotensi sebagai biopestisida akan menggunakan metode spektroskopi yaitu spektroskopi UV-Vis dan IR.

Spektrofotometri UV merupakan suatu teknik analisis spektroskopi yang memakai sumber radiasi elektromagnetik dengan panjang gelombang (190–

380 nm) menggunakan instrumen spektrofotometer (Mulja, M. dan Suharman, 1995). Tahap uji UV-Vis dilakukan dengan melarutkan ekstrak sambiloto menggunakan etanol dan diperoleh larutan 600 ppm. Kemudian diuji dengan diukur λ_{\max} menggunakan Spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu®) tipe 1240.

Penentuan gugus fungsi ekstrak sambiloto dilakukan dengan menggunakan FTIR. Tahap uji FTIR dilakukan dengan memadatkan ekstrak sambiloto ke dalam palet KBr dengan perbandingan 1 mg ekstrak dan 200 mg KBr. Kemudian palet disimpan dalam wadah pelet dan dimasukkan ke dalam instrumentasi FTIR untuk dianalisis guna menghasilkan spektra FTIR ekstrak sambiloto. Rentang panjang gelombang yang biasa diperiksa dengan spektroskopi infra merah adalah $4000-600\text{ cm}^{-1}$, atau setara dengan $2,5-5\text{ }\mu\text{m}$, atau di bawahnya. Hasil analisis gugus fungsi FTIR ditampilkan dalam bentuk grafik/kurva transmisi relatif (%) terhadap bilangan gelombang (cm^{-1}). Puncak grafik mewakili ikatan molekul yang ditemukan dalam sampel (Sonip, A., dkk., 2015).