

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan pada 1 Februari 2024 hingga 12 Juli 2024. Tahapan yang dilakukan selama penelitian ini terdiri dari tahap ekstraksi daun sirih, tahap aplikasi campuran ekstrak daun sirih dan bionutrien S-367B, tahap pengamatan pertumbuhan tanaman kailan dan tahap karakterisasi ekstrak daun sirih. Tahapan ekstraksi daun sirih dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Material FPMIPA UPI. Untuk tahapan aplikasi komposit ekstrak daun sirih dan bionutrien S-367B dan pengamatan pertumbuhan tanaman kailan dilakukan di perkebunan di daerah Cigugur Girang, Parongpong, Kabupaten Bandung Barat. Tahapan karakterisasi ekstrak daun sirih dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Material FPMIPA UPI, Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA UPI dan Greenlabs Bandung.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan adalah ember, wadah plastik bertutup (3 L dan 6 L), gelas kimia (100 mL, 250 mL, 1000 mL), gelas ukur (10 mL dan 50 mL), labu ukur (10 mL dan 100 mL), labu dasar bulat 500 mL, tabung reaksi, pipet volume 10 mL, pipet ukur, mikropipet, pipet tetes, corong kaca, erlenmeyer vakum, corong buchner, botol timbang, batang pengaduk, spatula, botol semprot, neraca analitik, set alat *rotary evaporator*, pompa, blender, kertas saring, spatula, botol agro/plastik, suntikan 12 mL, alat semprot pestisida 2 L, *chiller*, pH meter analog ETP306 3in1, spektrofotometer UV-Vis UV mini 1240 dan spektrofotometer FTIR.

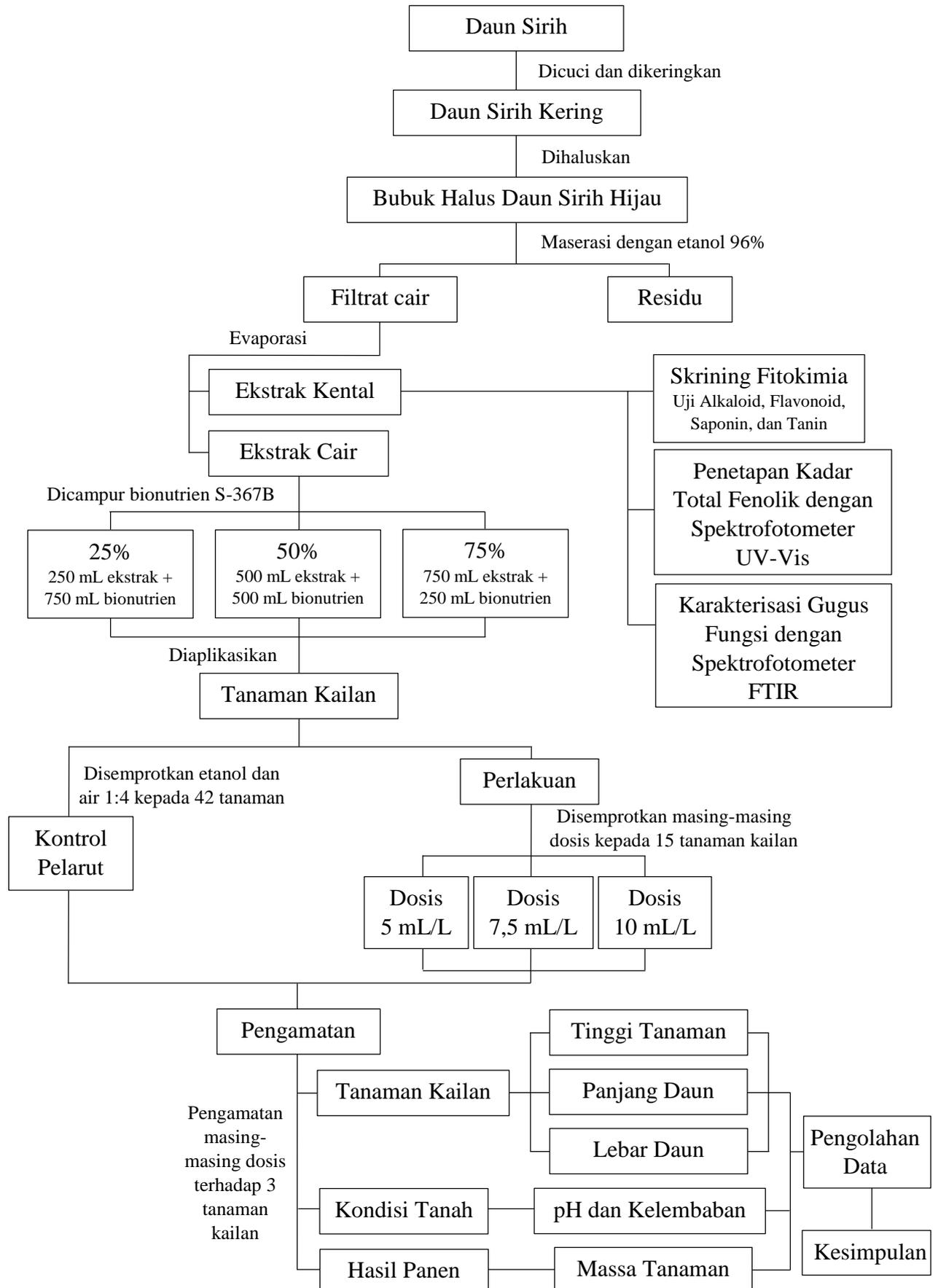
3.2.2 Bahan

Sampel yang digunakan adalah daun sirih hijau segar yang diperoleh dari sebuah rumah di Kota Cimahi, Jawa Barat pada tanggal 5 April 2024 sebanyak $\pm 2,6$ kg. Bahan kimia yang digunakan sebagai pelarut adalah etanol

teknis 96% dan aquades. Reagen yang digunakan pada Uji Total Fenolik yaitu larutan asam galat, reagen Fenol Folin-Ciocalteu 10%, dan larutan natrium karbonat (Na_2CO_3), pada karakterisasi skrining fitokimia yaitu reagen Dragendroff, larutan ferri klorida (FeCl_2), pita magnesium (Mg), dan larutan HCl pekat. Bahan lainnya yaitu bionutrien S-367B dan air.

3.3 Bagan Alir

Tahapan penelitian yang dilakukan terdapat 4 yaitu tahap ekstraksi daun sirih, tahap aplikasi campuran ekstrak daun sirih dan bionutrien S-367B, tahap pengamatan pertumbuhan tanaman kailan dan tahap karakterisasi ekstrak daun sirih. Tahap ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol dan penguapan dengan *rotary evaporator*. Pada tahap aplikasi, divariasikan dosis campuran ekstrak daun sirih dan bionutrien S-367B yaitu kadar 25%, 50%, dan 75% dengan masing-masing kadar akan diaplikasikan pada dosis 5 mL, 7,5 mL, dan 10 mL yang kemudian diaplikasikan ke tanaman kailan dan pengaplikasian larutan etanol kepada tanaman kontrol pelarut. Pada tahap pengamatan dilakukan terhadap pertumbuhan tinggi tanaman, panjang daun, lebar daun, dan massa hasil panen serta kondisi lingkungan seperti pH dan kelembaban tanah seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1 Bagan alir penelitian

3.4 Tahapan Penelitian

3.4.1 Ekstraksi Daun Sirih (*Piper betle L.*)

Sampel daun sirih hijau didapatkan dari sebuah rumah di daerah Kota Cimahi, Jawa Barat pada tanggal 5 April 2024. Daun sirih dipilih yang segar, berwarna hijau tua dan bentuk daun utuh. Didapatkan 2.600 gram daun sirih segar yang kemudian dicuci dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada suhu ruang selama 13 hari hingga daun berubah warna menjadi coklat dan bentuknya menjadi sedikit mengkerut. Setelah dipilih daun-daun kering yang memiliki kualitas bagus tanpa adanya jamur, dihaluskan dengan blender dan ditimbang. Didapatkan serbuk halus daun sirih berwarna hijau kecoklatan dan berbau khas sebanyak 510 gram.

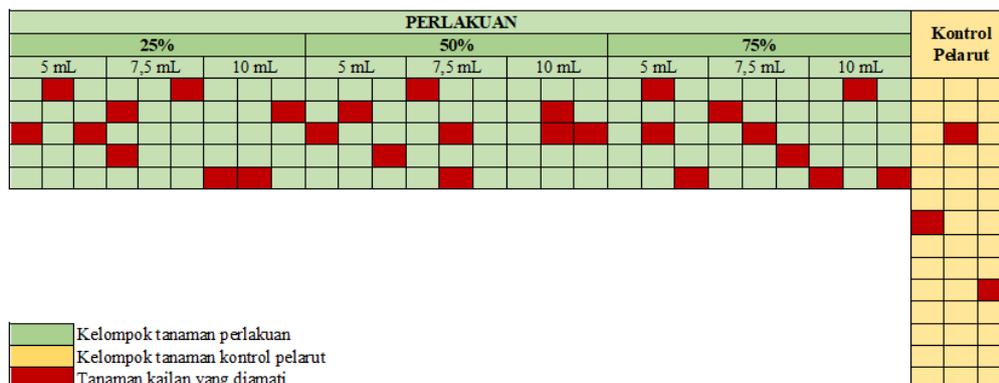
Ekstrak daun sirih diperoleh dengan metode maserasi. Daun sirih yang telah menjadi serbuk halus ditimbang kemudian direndam dalam pelarut etanol 96% selama 3×24 jam. Untuk mendapatkan ekstrak cair, dilakukan evaporasi hingga tidak ada etanol yang menetes di labu pada set alat *rotary evaporator*. Ekstrak cair didapatkan sebanyak 500 mL yang diencerkan dengan aquades hingga 2 L. Ekstrak cair sisa yang dihasilkan kemudian dilakukan pemekatan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak kental (Anggraini & Masfufatun, 2017).

3.4.2 Penomoran Sampel Tanaman Kailan

Terdapat kelompok perlakuan dan kontrol pelarut untuk pengamatan tanaman kailan yang dilakukan. Kelompok perlakuan diberikan komposit ekstrak daun sirih dan bionutrien S-367B dengan jumlah tanaman kailan sebanyak 135 tanaman yang dibagi kepada 9 variasi dosis komposit dengan masing-masing dosis komposit memiliki 15 tanaman. Kontrol pelarut diberikan larutan etanol 96% dengan jumlah tanaman sebanyak 42 tanaman. Untuk kebutuhan data penelitian, hanya diamati 3 tanaman per variasi konsentrasi kelompok perlakuan dan kontrol pelarut yang diamati. Pemilihan tanaman yang diamati dipilih berdasarkan *random picker*. Data dari setiap 3 tanaman yang diamati akan dihitung rata-ratanya.

Tabel 3.1 Penomoran sampel tanaman kailan

Perlakuan									Kontrol Pelarut
25%			50%			75%			
5 mL	7,5 mL	10 mL	5 mL	7,5 mL	10 mL	5 mL	7,5 mL	10 mL	
3, 6, 13	2, 4, 11	5, 10, 12	3, 7, 14	1, 8, 10	7, 8, 13	6, 8, 15	2, 8, 14	5, 6, 15	7, 17, 38

**Gambar 3.2** Penomoran sampel tanaman kailan

3.4.3 Aplikasi dan Pengamatan

Pada tahap aplikasi, tanaman kailan kelompok perlakuan diberikan campuran ekstrak daun sirih dan bionutrien S-367B dengan dosis 5 mL; 7,5 mL; dan 10 mL yang dilarutkan dalam 1 L air. Komposit disemprotkan secara merata kepada seluruh tanaman sesuai dosisnya setiap satu minggu sekali di pagi hari. Penyemprotan diarahkan pada daun dan tanah pada tanaman kailan. Presentase kadar setiap dosis campuran ekstrak daun sirih dan bionutrien S-367B berbeda, yaitu:

- 1) Komposit ekstrak daun sirih dan bionutrien S-367B 25% terdiri dari 250 mL ekstrak daun sirih dan 750 mL bionutrien S-367B
- 2) Komposit ekstrak daun sirih dan bionutrien S-367B 50% terdiri dari 500 mL ekstrak daun sirih dan 500 mL bionutrien S-367B
- 3) Komposit ekstrak daun sirih dan bionutrien S-367B 75% terdiri dari 750 mL ekstrak daun sirih dan 250 mL bionutrien S-367B

Untuk tanaman kailan kelompok kontrol pelarut diberikan larutan etanol 96%. Pemberian pelarut etanol juga dilakukan setiap satu minggu sekali di pagi hari.

Pengamatan yang dilakukan terhadap tanaman kailan yaitu berupa tinggi tanaman, panjang daun, dan lebar daun, lalu pH tanah, kelembaban tanah dan juga massa hasil panen.

3.4.3.1 Tinggi Tanaman, Panjang Daun dan Lebar Daun

Pengamatan dilakukan terhadap 3 tanaman untuk setiap dosis. Pengamatan terhadap tinggi tanaman, panjang daun, dan lebar daun diukur menggunakan penggaris satu minggu sekali setiap hari Rabu. Pengamatan tinggi tanaman dengan mengukur tinggi batang tanaman dari permukaan tanah hingga ujung daun terbesar. Pada pengamatan panjang daun mengukur panjang daun dari satu buah daun terbesar pada sebuah tanaman. Untuk pengukuran lebar daun yaitu mengukur lebar daun terbesar pada sebuah tanaman.

Selain mengamati pertumbuhan tanaman kailan, diamati juga keberadaan hama dan penyakit pada tanaman kailan selama masa pertumbuhan baik pada daun, batang maupun akar tanaman kailan.

3.4.3.2 pH dan Kelembaban Tanah

Pengukuran pH dan kelembaban tanah dilakukan dengan alat pH meter analog ETP306 3in1 setiap satu minggu sekali. Pengukuran pH dan kelembaban tanah dilakukan di tanah kelompok perlakuan dan kelompok kontrol tanaman kailan.

3.4.3.3 Massa Hasil Panen

Panen dilakukan pada hari ke-42 tanaman kailan ditanam dan pada pagi hari. Pengamatan yang dilakukan saat panen berupa kondisi akhir tanaman kailan seperti pengamatan kondisi akar, daun, dan batang tanaman dan pengukuran massa hasil panen. Panen dilakukan dengan mencabut tanaman kailan beserta akarnya lalu dikumpulkan. Setelah terkumpul, hasil panen dibersihkan dari bekas-bekas tanah. Bagian daun kailan yang tua akan dibuang sebelum hasil panen dapat dijual. Pengukuran massa hasil panen hanya dilakukan pada tanaman sampel

dari setiap dosis. Pengukuran massa hasil panen menggunakan timbangan digital.

3.4.4 Skrining Fitokimia

Ekstrak kental daun sirih yang telah melewati proses maserasi dilakukan analisis skrining fitokimia. Analisis dilakukan terhadap keberadaan senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, saponin dan tannin.

3.4.4.1 Uji Alkaloid

Sampel ekstrak sebanyak 0,1 mL di dalam tabung reaksi ditambahkan dengan 2-3 tetes pereaksi Dragendroff. Adanya senyawa alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna merah jingga dan kekeruhan (Ciulci, 1994).

3.4.4.2 Uji Flavonoid

Sampel ekstrak sebanyak 4 mg/mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah ditambahkan satu buah potongan kecil pita magnesium. Kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit larutan HCl hingga terjadi perubahan warna dari jingga menjadi merah dan kemudian merah menjadi merah tua. Perubahan warna dari jingga menjadi merah menunjukkan adanya flavon sedangkan perubahan warna merah sampai merah tua menunjukkan adanya flavonoid (Sofowora, 1993).

3.4.4.3 Uji Saponin

Sampel ekstrak sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan aquades sebanyak 5 mL lalu dikocok kuat-kuat. Busa yang bertahan selama kurang lebih 15 menit menunjukkan adanya saponin (Saragih & Arsita, 2019).

3.4.4.4 Uji Tanin

Sampel ekstrak sebanyak 2 mL diencerkan dengan 3 mL aquades kemudian ditambahkan 2-3 tetes larutan Ferri Klorida (FeCl_3) 5%. Warna hijau kehitaman atau biru menunjukkan adanya tannin (Ciulci, 1994).

3.4.5 Penetapan Kadar Total Fenolik dengan Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer Uv-Visible adalah salah satu metode instrumen yang diterapkan dalam analisis kimia untuk mendeteksi senyawa (padat/cair) berdasarkan absorbansi foton (Irawan, 2019). Dengan dilakukannya pengukuran kadar polifenol dengan menggunakan alat spektrofotometer Uv-Visible, diharapkan dapat mengetahui kandungan kadar polifenol total dalam ekstrak daun sirih yang diuji.

Pereaksi Fenol Folin-Ciocalteu 10% dibuat dengan cara mengencerkan 10 mL pereaksi ke dalam labu ukur 100 mL, ditambahkan aquades hingga tanda batas dan kemudian dihomogenkan.

Pembuatan larutan natrium karbonat (Na_2CO_3) 7,5% dengan menimbang sebanyak $37,50 \pm 0,01$ gram Na_2CO_3 anhidrat ke dalam 500 mL labu ukur dan ditambahkan aquades kemudian dihomogenkan.

Larutan baku standar asam galat dibuat dengan menimbang 0,110 gr asam galat monohidrat dilarutkan dengan aquades ke dalam labu ukur 100 mL kemudian dihomogenkan. Larutan baku standar asam galat kemudian dipipet sebanyak 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL dan 5 mL ke masing-masing labu ukur 50 mL dan diencerkan dengan aquades hingga tanda batas untuk membuat larutan standar asam galat 10, 20, 30, 40, 50 ppm. Masing-masing konsentrasi larutan standar asam galat diambil 1 mL ke dalam tabung reaksi dan dibuat juga larutan blanko dengan mengambil 1 mL aquades ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 5 mL pereaksi Fenol Folin-Ciocalteu dan didiamkan 8 menit kemudian ditambahkan 4 mL larutan natrium karbonat (Na_2CO_3), didiamkan pada suhu ruang dan kedap cahaya selama 50 menit. Diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 760 nm.

Ekstrak kental daun sirih yang telah didapatkan dengan prosedur maserasi kemudian ditimbang sebanyak 10 mg secara duplo lalu diencerkan dengan aquades dalam labu ukur 100 mL dan dihomogenkan. Sampel ekstrak uji diambil sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 5 mL pereaksi Fenol Folin-Ciocalteu kemudian didiamkan 8 menit. Setelah 8 menit didiamkan, ditambahkan 4 mL larutan natrium karbonat (Na_2CO_3) kemudian diinkubasi pada suhu ruang dan kedap cahaya selama 60 menit. Campuran diukur absorbansinya pada panjang gelombang 760 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Penentuan kadar total fenolik ditentukan menggunakan persamaan kurva kalibrasi asam galat (Setyawan, dkk., 2016).

3.4.6 Karakterisasi Gugus Fungsi dengan Spektrofotometer FTIR

Metode analisis dengan FTIR dapat mengukur secara cepat sampel serta mampu menganalisis beberapa komponen secara serentak. Sampel ekstrak kental daun sirih yang didapatkan dengan prosedur maserasi, ditimbang sebanyak ± 1 gr dan dimasukkan ke dalam botol timbang tertutup dan diberi label. Untuk pengujian penentuan gugus fungsi ekstrak daun sirih dengan spektrofotometer FTIR, dilakukan oleh Greenlabs Bandung pada tanggal 1-7 Juli 2024.