

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian mulai dilakukan pada bulan Maret 2024. Penelitian ini terdiri dari empat tahapan, yaitu tahap ekstraksi daun tembakau, tahap aplikasi komposit ekstrak daun tembakau dan bionutrien S-367B pada tanaman kailan, tahap pengamatan pertumbuhan dan hasil panen tanaman kailan, serta tahap analisis ekstrak daun tembakau. Tahapan ekstraksi dan analisis ekstrak daun tembakau dilakukan di Laboratorium Riset Kimia FPMIPA UPI, Laboratorium Kimia Terpadu SMAKBO, dan Laboratorium Instrumen SMAKBO. Lokasi perkebunan dilakukannya tahap aplikasi komposit ekstrak daun tembakau dan bionutrien S-367B pada tanaman kailan dan tahap pengamatan pertumbuhan tanaman hingga masa panen tanaman kailan berada di daerah Cigugur Girang, Kecamatan Parongpong, Kabupaten Bandung Barat.

3.2 Alat dan Bahan

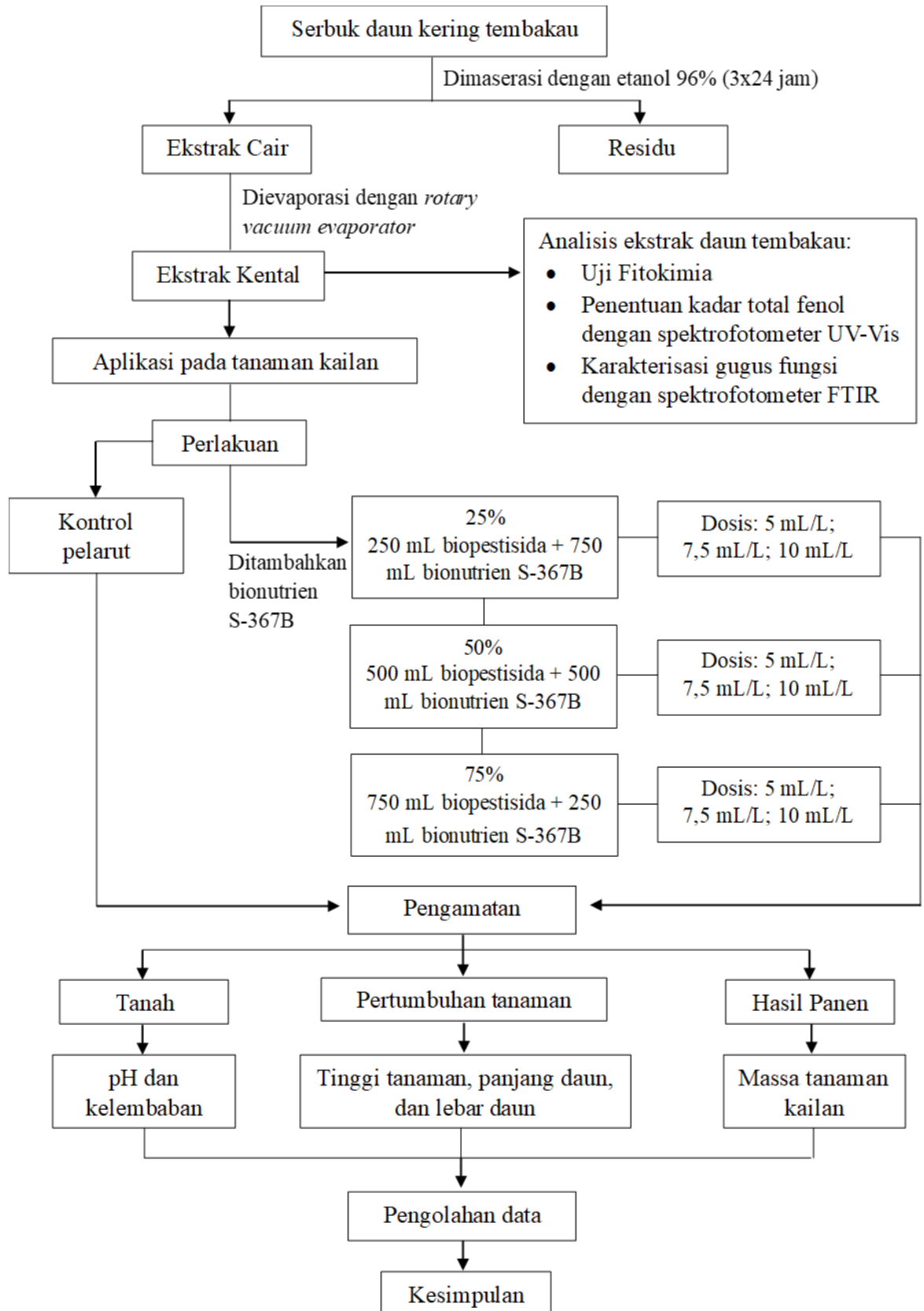
3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan meliputi maserator, blender, corong kaca, gelas kimia (100 mL, 250 mL, dan 1 L), statif dan klem, corong buchner, batang pengaduk, kertas saring, tisu, gelas ukur (100 mL dan 1 L), *vacuum rotary evaporator*, labu dasar bulat 500 mL, spatula, neraca analitik, botol vial, termometer, kaca arloji, botol agro, alat penyiram, syringe, alat ukur pH dan kelembaban tanah, mikropipet, pipet, tabung reaksi, labu ukur (1000 mL, 100 mL, 10 mL), *chiller*, freeze dry, spektrofotometer UV-Vis UV mini 1240, spektrofotometer Shimadzu FTIR.

3.2.2 Bahan

Pada penelitian ini digunakan sampel berupa daun tembakau yang diperoleh dari Desa Nagrog, Kecamatan Cicalengka, Kabupaten Bandung. Bahan lainnya meliputi aquades, etanol 96% (teknis), asam galat, folin 10%, Na_2CO_3 7,5%, reagen dagendroff, pita Mg, HCl pekat, FeCl_3 5%, kloroform, dan H_2SO_4 pekat.

3.3 Bagan Alir dan Tahapan Penelitian



Gambar 3.1 Bagan Alir Tahapan Penelitian

Penelitian dilakukan dalam empat tahapan, diantaranya tahap ekstraksi daun tembakau, tahap aplikasi komposit ekstrak tembakau dan bionutrien S-367B pada tanaman kailan, tahap pengamatan pertumbuhan dan hasil panen tanaman, serta tahap analisis ekstrak daun tembakau. Tahap ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% yang akan diaplikasikan pada tanaman kailan dan dianalisis uji fitokimia, penentuan kadar total fenol, dan karakterisasi gugus fungsi menggunakan spektrofotometri FTIR. Pada tahap aplikasi, setiap variasi konsentrasi komposit biopestisida dengan bionutrien S-367B dikelompokkan menjadi tiga dosis (5 mL; 7,5 mL; dan 10 mL dalam 1 liter air), sedangkan tanaman kailan yang diberi perlakuan kontrol pelarut dengan perbandingan 1:4 dengan air. Tahap pengamatan dilakukan terhadap pertumbuhan tanaman seperti tinggi tanaman, panjang daun, lebar daun, laju pertumbuhan, dan massa panen tanaman dengan memperhatikan pH tanah serta kelembaban tanah. Tahap analisis ekstrak daun tembakau dibagi menjadi tiga, yaitu uji fitokimia, penentuan kadar total fenol, dan karakterisasi gugus fungsi menggunakan spektrofotometri FTIR. Adapun bagan alir tahapan penelitian dapat dilihat pada gambar 3.1.

3.3.1 Tahap Ekstraksi Daun Tembakau

Lokasi daun tembakau yang akan diekstraksi berasal dari Desa Nagrog, Kecamatan Cicalengka, Kabupaten Bandung. Sebanyak tiga kg daun tembakau dikeringkan terlebih dahulu dengan cara diangin-anginkan. Daun yang sudah kering, kemudian dihaluskan menggunakan blender hingga diperoleh 350 gr serbuk daun tembakau. Serbuk tersebut dimasukkan ke dalam wadah untuk dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak dua liter selama 3x24 jam. Filtrat hasil ekstraksi dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50°C hingga diperoleh 500 mL ekstrak. Sebanyak 400 mL dari 500 mL ekstrak yang diperoleh, ditambahkan 1600 mL aquades, kemudian dibagi menjadi 3 konsentrasi, yaitu 25%, 50%, dan 75% dalam 1000 mL yang akan dicampurkan dengan bionutrien S-367B. Sedangkan, 100 mL lainnya diekstraksi kembali menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga kental, lalu ditimbang.

3.3.2 Tahap Aplikasi Pada Tanaman Kailan

3.3.2.1 Variasi Konsentrasi dan Dosis

Komposit ekstrak daun tembakau dan bionutrien S-367B diaplikasikan dengan metode foliar atau disemprotkan pada sekitar bagian tanaman kailan, khususnya bagian daun setiap satu minggu sekali di pagi hari. Sebanyak 400 mL ekstrak daun tembakau ditambahkan 1600 mL aquades. Biopestisida tersebut yang akan dicampurkan dengan bionutrien S-367B pada konsentrasi yang berbeda-beda. Setiap variasi konsentrasi dibuat menjadi tiga dosis, yaitu 5 mL/L; 7,5 mL/L; dan 10 mL/L dalam 1 liter air. Berikut ini merupakan variasi konsentrasi komposit biopestisida dan bionutrien S-367B:

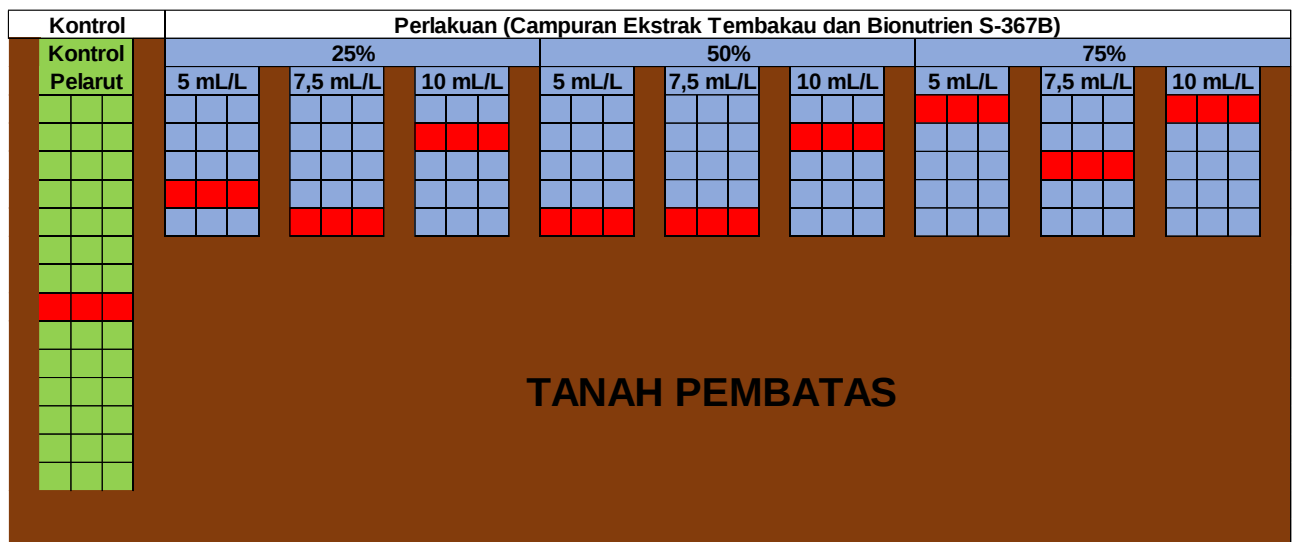
1. Biopestisida 25% (250 mL biopestisida + 750 mL bionutrien S-367B)
2. Biopestisida 50% (500 mL biopestisida + 500 mL bionutrien S-367B)
3. Biopestisida 75% (750 mL biopestisida + 250 mL bionutrien S-367B)

Pada penelitian ini digunakan perlakuan kontrol pelarut sebagai variabel kontrol. Tanaman kontrol pelarut diberi perlakuan dengan perbandingan 1:4, yaitu 200 mL pelarut etanol dan 800 mL air.

3.3.2.2 Penomoran Sampel Tanaman Kailan

Terdapat 15 tanaman (5 baris) setiap perlakuan komposit biopestisida dan bionutrien S-367B sehingga diperoleh total tanaman pada 9 perlakuan sebanyak 135 tanaman kailan. Sedangkan total tanaman yang diberi perlakuan kontrol pelarut sebanyak 42 tanaman kailan. Pengamatan dilakukan dengan memilih secara acak salah satu baris yang terdiri atas tiga tanaman kailan menggunakan aplikasi *random picker*. Kailan yang diamati, diberi penanda menggunakan

patahan bambu dan gambaran visual yang telah dibuat menggunakan *Microsoft excel* seperti pada gambar 3.2.



Gambar 3.2 Penomoran sampel

Keterangan:

	Tanah Pembatas
	Kelompok tanaman kontrol pelarut
	Kelompok tanaman perlakuan
	Tanaman yang diamati

3.3.3 Tahap Pengamatan Pertumbuhan Tanaman Kailan

3.3.3.1 pH dan Kelembaban Tanah

Pengukuran pH dan kelembaban tanah sebagai parameter kondisi tanah dilakukan di waktu yang bersamaan dengan pengukuran pertumbuhan tanaman. Pengukuran ini dilakukan pada tanah kelompok tanaman kontrol pelarut dan tanah kelompok perlakuan komposit yang diukur menggunakan ETP306 3 in 1 soil pH meter.

3.3.3.2 Tinggi Tanaman, Panjang Daun, dan Lebar Daun

Pertumbuhan tanaman seperti tinggi tanaman, panjang daun, dan lebar daun perlu diamati setiap sekali dalam seminggu di pagi hari dengan mengukur kailan menggunakan alat penggaris dan mencatat datanya. Ketika tinggi tanaman sudah mencapai lebih dari 30 cm, kailan siap untuk dipanen.

3.3.3.3 Massa Hasil Panen Kailan

Pada 52 hari setelah tanam, kailan dipanen segar di pagi hari. Kemudian, dilakukan penimbangan hasil panen pada setiap dosis tanaman kailan yang diamati proses pertumbuhannya.

3.3.4 Tahap Analisis Ekstrak Daun Tembakau

3.3.4.1 Uji Fitokimia

Aanalisis kualitatif dengan metode uji fitokimia dilakukan pada ekstrak kental daun tembakau yang mengacu pada penelitian Mohammed, A. H. dkk (2016).

A. Alkaloid

Sebanyak 1 mL ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 20 hingga 30 tetes reagen Dragendoff. Jika terbentuk endapan merah oranye, maka terdapat senyawa alkaloid pada sampel.

B. Flavonoid

Pada 4 mg/ml ekstrak ditambahkan sedikit pita magnesium. Kemudian, dimasukkan HCl pekat setetes demi tetes hingga terjadi perubahan warna merah tua yang menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

C. Saponin

Sekitar 0,5 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 5 mL akuades, lalu kocok dengan kuat. Buih yang bertahan selama ± 15 menit menunjukkan adanya senyawa saponin.

D. Tanin

Sebanyak 2 mL ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 hingga 3 tetes larutan FeCl_3 5%. Perubahan warna hijau kehitaman atau kebiruan menunjukkan adanya senyawa tanin.

3.3.4.2 Penentuan Kadar Total Fenol

Penentuan konsentrasi gugus hidroksil fenolik dalam ekstrak tanaman dapat dilakukan dengan metode Folin-Ciocalteu menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Prinsip metode ini, adanya kompleks berwarna biru yang terjadi akibat reaksi senyawa fenolik yang terdapat pada sampel dengan reagen folin-ciocalteu setelah penambahan natrium karbonat. Intensitas warna biru sebanding dengan jumlah senyawa fenolik reaktif dalam sampel (Kupina dkk., 2019). Kandungan total fenol dalam tumbuhan dinyatakan dalam GAE (Gallic Acid Equivalent), yaitu jumlah kesetaraan milligram asam galat dalam 1 gram sampel (Gheldof, N. & Engeseth, N. J., 2002).

Kadar total fenol dihitung menggunakan rumus persamaan regresi linier dari asam galat, $y = ax + b$. Tahapan pengujian kadar total fenol, yaitu dengan menyiapkan larutan induk asam galat konsentrasi 1000 ppm. Kemudian larutan diencerkan hingga 100 ppm dan dibuat deret larutan standar pada konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm, sedangkan sampel disiapkan pada 100 ppm. Sebanyak 0,1 ml standar/sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 0,5 ml reagen Folin-Ciocalteu 10% dan diinkubasi selama 4-8 menit. Kemudian, ditambahkan 4,0 ml Na_2CO_3 7,5% ke dalam tabung reaksi, lalu diinkubasi kembali selama 50 menit. Diukur salah satu larutan standar untuk mengetahui panjang gelombang yang sebenarnya. Panjang gelombang untuk pengukuran kadar total fenol sebesar 760 nm (Shi dkk., 2022). Setelah itu, deret larutan standar diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang yang telah diukur sebelumnya hingga diketahui persamaan kurva dan nilai regresi $>0,9900$. Lakukan hal yang sama pada sampel untuk mengetahui nilai absorbansi dan konsentrasi melakukan perhitungan kadar total fenol.

3.3.4.3 Karakteristik Gugus Fungsi dengan Spektrofotometer *Fourier Transform Infra Red – Attenuated Total Reflectance*

Karakterisasi gugus fungsi yang terkandung dalam ekstrak daun tembakau dapat diidentifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR-ATR. Instrumen ini tidak memerlukan pembuatan pelet KBr, melainkan ditempatkan langsung pada kristal ATR dengan melemahkan gelombang infra merah di sekitar spektrum IR sampel sambil menyerap energi. Sampel diletakkan langsung di atas jendela optik dengan kristal ZnSe, kemudian dijepit menggunakan penjepit kompresi yang dikendalikan oleh mikrometer untuk memastikan kontak yang baik antara sampel dan kristal. Pengukuran ini dilakukan dengan panjang gelombang 4000-500 cm^{-1} . Hasil analisis ini menunjukkan spektra FTIR ekstrak daun tembakau dengan kurva transmisi relative (%) terhadap bilangan gelombang cm^{-1} . Adanya spektra tersebut, dapat mengetahui gugus fungsi yang terdapat dalam ekstrak daun tembakau.