

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada 29 April hingga 12 Juli 2024. Tahapan-tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini antara lain, tahap ekstraksi daun paitan, tahap aplikasi komposit biopestisida daun paitan dengan bionutrien S-367B, tahap pengamatan pertumbuhan dan hasil panen tanaman kailan, serta tahap karakterisasi ekstrak daun paitan. Tahapan ekstraksi daun Paitan dilakukan di Laboratorium Riset Kimia FPMIPA UPI . Lokasi pada tahapan aplikasi dan pengamatan pertumbuhan dilakukan di perkebunan di daerah Cigugur Girang, Kecamatan Parongpong, Kabupaten Bandung Barat. Tahap karakterisasi ekstrak daun paitan dilakukan di Greenlabs Indonesia, Laboratorium Riset Kimia, dan Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA UPI.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

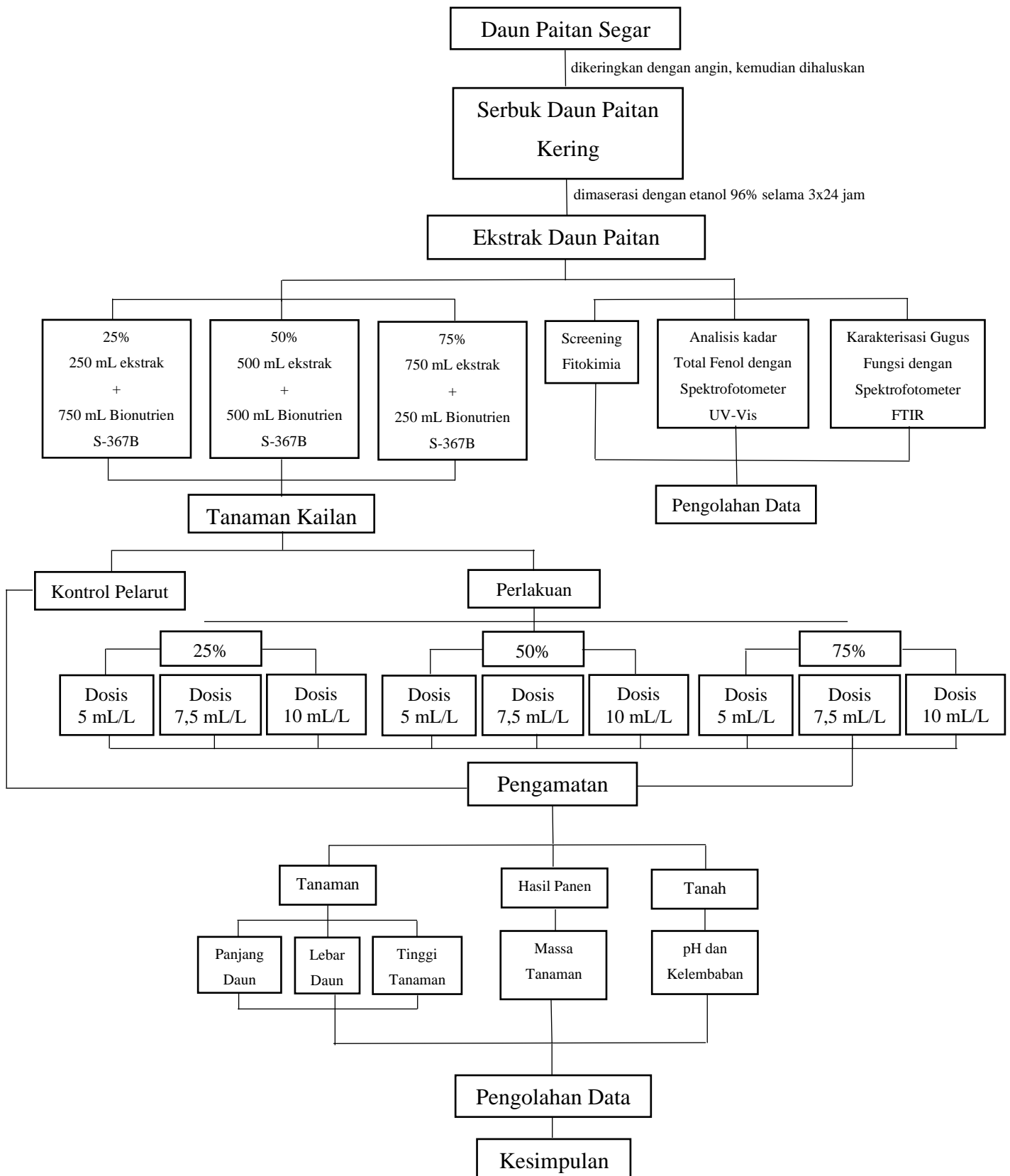
Peralatan yang digunakan pada penelitian ini antara lain yaitu blender, spatula, kertas saring, batang pengaduk, pipet, botol semprot, termometer, botol vial, neraca analitik, labu dasar bulat 500 mL, set alat *rotary vacuum evaporator*, botol semprot, corong kaca, *chiller*, gunting, tisu, gelas kimia (100 mL, 250 mL, dan 1 L), alat semprot, alat ukur pH dan kelembaban tanah, *syringe*, kaca arloji, alumunium foil, labu ukur (25 mL, 50 mL, 100 mL, dan 1 L), pipet ukur, pipet volume, tabung reaksi, mikropipet, rak tabung reaksi, kuvet, instrumentasi Spektrofotometer UV-Vis, dan instrumentasi Spektrofotometer Fourier Transform Infra Red (FTIR).

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun paitan (*Tithonia Diversifolia*), aquades, etanol teknis 96%, pita magnesium, HCl pekat, FeCl₃ 5%, pereaksi Dragendorff, Asam Galat, pereaksi Folin-Ciocalteu 10%, dan Natrium Karbonat (Na₂CO₃) 7%.

3.3 Bagan Alir dan Tahapan Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan dalam empat tahapan, yaitu tahap ekstraksi daun paitan, tahap aplikasi komposit biopestisida ekstrak daun paitan dengan bionutrien S-376B, tahap pengamatan pertumbuhan tanaman kailan, dan tahap karakterisasi ekstrak daun paitan. Pada tahap ekstraksi dilakukan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% selama 3 x 24 jam. Pada tahap aplikasi, komposit biopestisida ekstrak daun paitan dengan bionutrien S-376B dibagi menjadi 3 dosis yaitu 5 mL; 7,5 mL; dan 10 mL dan dicampurkan ke dalam 1000 mL air pada setiap variasi konsentrasi. Selain itu dilakukan juga aplikasi kontrol pelarut etanol. Pada tahap pengamatan pertumbuhan tanaman kailan, dilakukan pengukuran terhadap panjang daun, lebar daun, tinggi tanaman, massa hasil panen, pH dan kelembaban tanah. Pada tahap karakterisasi ekstrak daun paitan melibatkan uji fitokimia, analisis total fenol menggunakan metode Folin-Ciocalteu dengan spektrofotometer UV-Vis, dan analisis gugus fungsi dengan spektrofotometer FTIR (*Fourier Transform Infra Red*). Bagan alir penelitian dapat dilihat pada gambar 3.1 berikut.



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian

3.3.1 Tahap Ekstraksi Daun Paitan

Sebanyak 2 kg daun paitan (*Tithonia Diversifolia*) didapat dari daerah Dago, Kota Bandung pada bulan Maret 2024. Sebelum diekstraksi, daun paitan dikeringkan terlebih dahulu dengan cara diangin-anginkan selama 7 hari. Daun paitan yang sudah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk. Didapatkan daun paitan serbuk sebesar 500 gram. Serbuk daun paitan diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol teknis 96% sebanyak 1,5 liter (per hari) di dalam wadah selama 3x24 jam. Filtrat tersebut kemudian dipekatkan menggunakan alat *rotary vacuum evaporator* pada suhu 60°C hingga diperoleh 500 mL ekstrak. Ekstrak tersebut dibagi menjadi dua bagian, yaitu sebanyak 400 mL untuk aplikasi dan 100 mL untuk karakterisasi. Sebanyak 400 mL ekstrak diencerkan dengan 1600 mL aquades, menjadi larutan stok biopestisida ekstrak daun paitan. Sedangkan, 100 mL ekstrak dipekatkan kembali menggunakan alat *rotary vacuum evaporator* pada suhu 60°C hingga didapatkan ekstrak kental.

3.3.2 Tahap Aplikasi Pada Tanaman Kailan

3.3.2.1 Variasi Konsentrasi

Sebanyak 2 liter larutan stok biopestisida ekstrak daun paitan dibagi menjadi 3, yaitu sebesar 250 mL, 500 mL, dan 750 mL. Kemudian dibuat komposit dengan mencampurkannya dengan Bionutrien S-367B menjadi 3 variasi konsentrasi sebagai berikut:

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

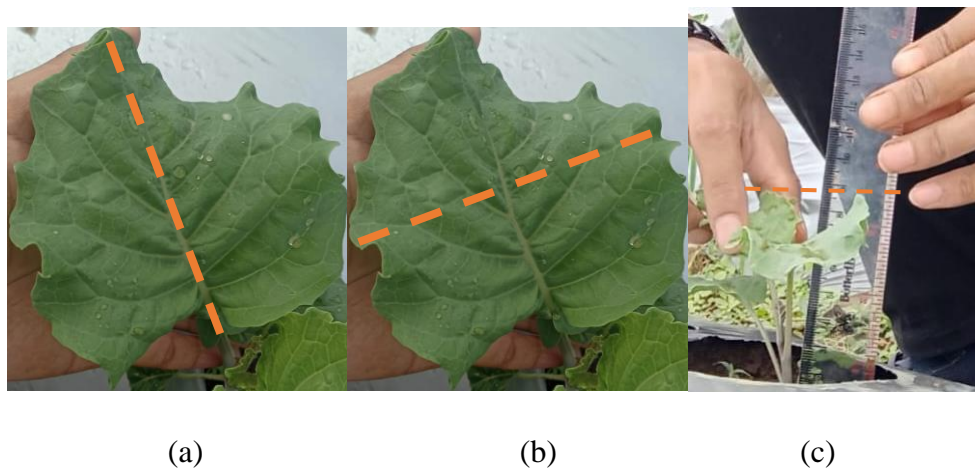
3.3.2.3 Dosis Komposit Biopestisida Ekstrak Daun Paitan dengan Bionutrien S-367B

Terdapat tiga dosis yang diberikan, yaitu 5 mL; 7,5 mL; dan 10 mL dalam 1000 mL air yang diaplikasikan pada setiap konsentrasi. Dosis diberikan dengan cara disemprotkan pada tanaman dan tanah setiap satu minggu sekali. Setelah 30 hari masa tanam, seluruh tanaman kailan diberi penambahan fungisida dan pupuk dengan takaran yang sama.

3.3.3 Tahap Pengamatan Tanaman Kailan

3.3.3.1 Pengukuran Panjang Daun, Lebar Daun, dan Tinggi Tanaman

Pertumbuhan tanaman kailan seperti, panjang daun, lebar daun, dan tinggi tanaman diamati setiap seminggu sekali dengan mengukur tanaman kailan menggunakan alat penggaris hingga siap panen. Ilustrasi pengukuran tanaman kailan ditunjukkan pada gambar 3.3 berikut.



Gambar 3.3 Ilustrasi Pengukuran Tanaman Kailan

- (a) Panjang Daun
- (b) Lebar Daun
- (c) Tinggi Tanaman

3.3.3.2 Pengukuran pH dan Kelembaban Tanah

Pengukuran pH dan kelembaban tanah diukur dengan menggunakan ETP306 3 in 1 soil pH meter yang ditunjukkan pada gambar 3.4 setiap satu minggu sekali.



Gambar 3.4 Alat ETP 306 3 in 1 soil pH meter

3.3.3.3 Penimbangan Massa Hasil Panen

Hasil panen tanaman kailan ditimbang menggunakan timbangan digital. Tanaman kailan dipanen pada umur 52 hari setelah tanam. Waktu panen tanaman kailan yaitu pada pagi hari.

3.3.4 Tahap Karakterisasi Ekstrak Daun Paitan

3.3.4.1 Uji Fitokimia

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

1) Alkaloid

Sebanyak 1 mL ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendoff. Hasil menunjukkan positif apabila terbentuk endapan merah jingga dan keruh.

2) Flavonoid

Sebanyak 4 mg/ml ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan pita magnesium. Kemudian, ditambahkan HCl sedikit demi sedikit. Hasil menunjukkan positif flavon apabila terjadi perubahan warna jingga menjadi merah. Sedangkan positif flavonoid apabila terjadi perubahan warna merah hingga merah tua

3) Saponin

Sekitar 0,5 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 5 mL aquades. Kemudian kocok hingga terdapat buih yang bertahan ± 15 menit menunjukkan hasil positif terdapat senyawa saponin.

4) Tanin

Sebanyak 2 mL ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2-3 tetes larutan FeCl_2 5%. Hasil menunjukkan positif apabila terjadi perubahan warna menjadi hijau kehitaman atau biru

3.3.4.2 Penentuan Kadar Total Fenol dengan UV-Vis

Penentuan kadar total fenol 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).

Tahapan pengujian kadar total fenol yaitu dengan menyiapkan larutan standar asam galat pada konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm, dan 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 inkubasi selama 4-8 menit. Kemudian, ditambahkan 4 ml Na_2CO_3 7% ke dalam tabung reaksi, lalu diinkubasi selama 50 menit. Diukur salah satu larutan standar untuk mengetahui panjang gelombang yang sebenarnya, diperoleh nilai sebesar 760 nm. 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.

Kadar total fenol dihitung menggunakan rumus persamaan regresi linier dari asam galat, $y = ax+b$. Kandungan total fenol dalam tumbuhan dinyatakan dalam GAE (Gallic Acid Equivalent), yaitu jumlah kesetaraan milligram asam galat dalam 1 gram sampel.

3.3.4.3 Penentuan Gugus Fungsi dengan FTIR

Karakterisasi gugus fungsi yang terkandung dalam ekstrak daun paitan dapat diidentifikasi menggunakan spektrofotometer *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR). Tahapan yang dilakukan untuk menguji kandungan gugus fungsi dalam ekstrak daun paitan dengan mencampurkan 1 mg ekstrak dicampurkan dan 200 mg kalium bromida (KBr), lalu dipadatkan menjadi pelet. Pelet KBr ini disimpan dalam wadah dan dimasukkan ke dalam instrumentasi spektrofotometer *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) untuk dianalisis. Hasil analisis ini menunjukkan spektra FTIR ekstrak daun paitan (Khan, *et.al.*, 2018).