

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen, terdapat empat tahap, yaitu tahap ekstraksi batang brotowali, tahap pengaplikasian perlakuan komposit ekstrak brotowali dan bionutrien, tahap pengamatan, dan tahap karakterisasi ekstrak batang brotowali. Tahapan ekstraksi batang brotowali menggunakan alat *Rotary Evaporator* dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Lingkungan FPMIPA UPI. Untuk tahap karakterisasi ekstrak brotowali menggunakan spektrofotometer FTIR dan spektrofotometer UV-Vis di Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA UPI dan Laboratorium Greenlab. Sedangkan, tahap aplikasi campuran biopestisida ekstrak batang brotowali dan bionutrien S-367B dan tahap pengamatan pertumbuhan tanaman kailan berlokasi di perkebunan yang berada di daerah Cigugur, Kabupaten Bandung Barat. Penelitian ini dilakukan pada rentang waktu Maret 2024 hingga Juli 2024.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan adalah pompa, alat penyiram, pH meter analog ETP306 3inl, neraca analitik, kain muslin, gunting, kompor, gelas kimia, pengaduk, kertas saring, statif dan klem, spatula, termometer, gelas ukur, tabung reaksi, rak tabung, labu ukur, kuvet, botol semprot, plastik wrap, botol vial, mikropipet, pipet, tisu, selotip tak berwarna, kaca arloji, cawan petri, aluminium foil, batang pengaduk, sendok, maserator, labu dasar bulat IL, vacuum rotary evaporator, corong buchner, freezer, spektrofotometer UV-Vis UV mini 1240, spektrofotometer Shimadzu FTIR.

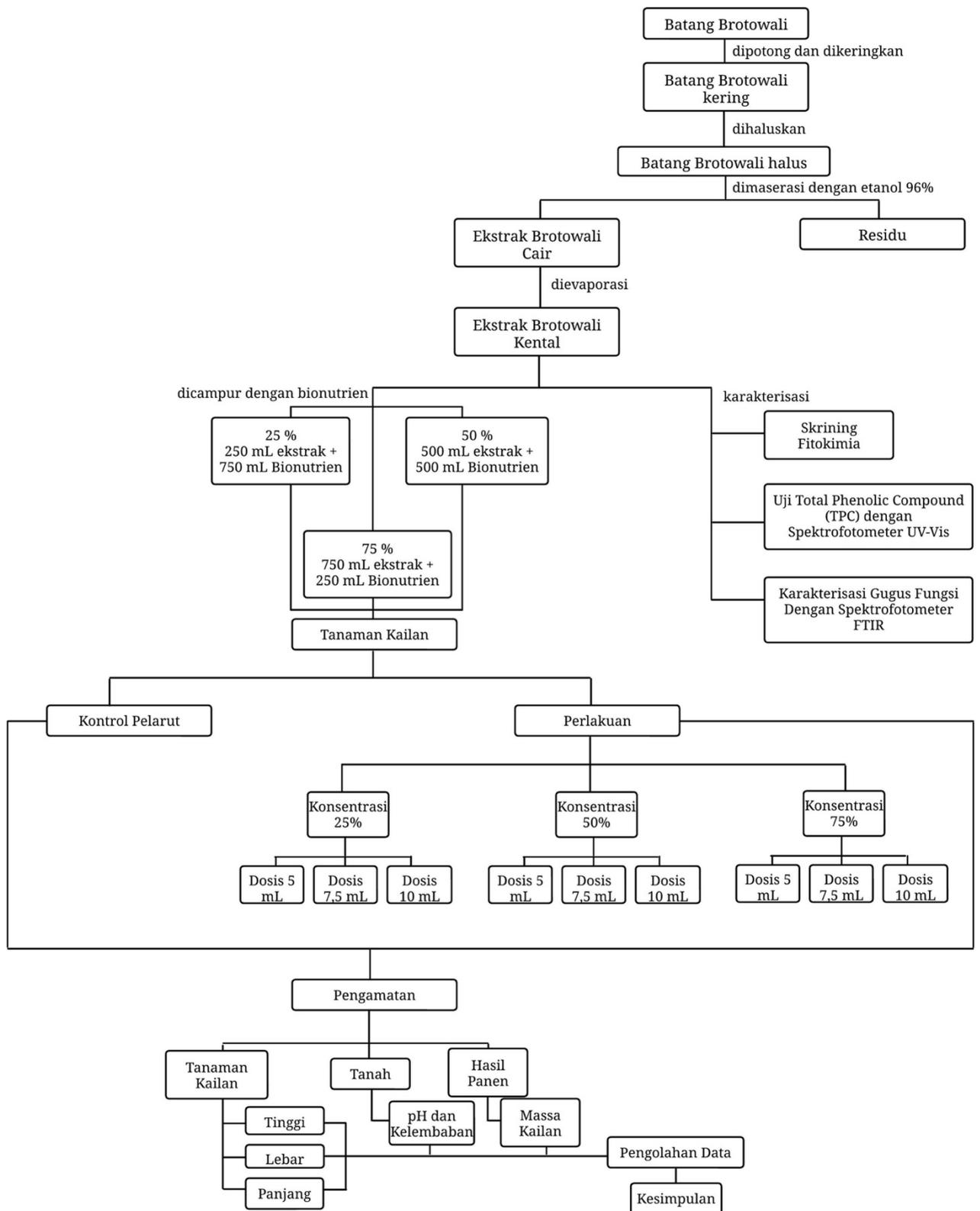
3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan berupa batang brotowali (*Tinospora cordifolia*), 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, serta bahan lain yang digunakan adalah bionutrien S-367B sebagai campuran biopestisida. Serta, reagen yang digunakan dalam skrining fitokimia adalah pereaksi Dragendoff, HCl kuat, pita magnesium, FeCl₃ 5%, dan aquades.

3.3 Prosedur Penelitian

Tahap-tahap penelitian antara lain tahap ekstraksi, tahap aplikasi, pengamatan pertumbuhan, dan tahap karakterisasi ekstrak batang brotowali. Tahap ekstraksi menggunakan pelarut air untuk pengaplikasian pada tanaman dan pelarut etanol untuk karakterisasi daun tembelean. Pada tahap aplikasi digunakan ekstrak daun tembelean dan kontrol positif. Tahap pengamatan tanaman brokoli dilakukan terhadap pertumbuhan tinggi tanaman, panjang daun, lebar daun, massa hasil panen tanaman kailan, pH tanah, kelembaban tanah, dan ketinggian area perkebunan. Pada tahap karakterisasi ekstrak daun tembelean meliputi analisis kadar total fenol menggunakan metode Folin-Ciocalteu dengan spektrofotometer UV-Vis, serta analisis gugus fungsi dengan FTIR (Fourier Transform Infra-Red). Adapun bagan alir dari prosedur penelitian ini yang ditampilkan pada **Gambar 14**.



Gambar 1 Bagan Alir Penelitian

3.3.1 Ekstraksi Batang Brotowali

Ekstraksi batang brotowali dimulai dengan pemotongan batang brotowali menjadi potongan kecil berukuran 2-3 cm. Kemudian, potongan-potongan tersebut dikeringkan dengan cara dianginkan selama 3 minggu. Setelah mendapatkan batang brotowali kering dilakukan penghalusan menggunakan blender sampai terbentuk butiran halus. Butiran halus sebanyak 500 gr direndam di dalam 1,5 pelarut etanol 96% selama 3 malam, lalu pada setiap 24 jam hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring. Setelah melalui proses penyaringan dihasilkan filtrat dan residu, filtrat dievaporasi menggunakan *rotary vacuum evaporator* dengan suhu 60°C untuk mendapatkan ekstrak kental atau stok (Sa'diyah et al., 2013). Ekstrak kental yang diperoleh dari evaporasi kemudian ditimbang.

3.3.2 Penetapan Kadar Total Fenol dengan Metode Folin-Cicoalteu Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

a) Pembuatan larutan baku standar 1000 ppm

Padatan Asam Galat ditimbang sebanyak 0,1 gram, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan dilarutkan dengan aquades, lalu ditambahkan aquades hingga tanda batas.

b) Pembuatan larutan standar 100 ppm

Pembuatan larutan standar 100 ppm dilakukan dengan mengencerkan larutan baku standar 1000 ppm menjadi 100 ppm dengan cara 10 mL larutan baku standar 1000 ppm dipipet, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan dilarutkan dengan aquades, lalu ditambahkan dengan aquades hingga tanda batas.

c) Pembuatan deret standar 10, 20, 30, 40, 50 ppm

Larutan baku standar 100 ppm yang telah dibuat, diencerkan untuk membuat deret standar asam galat dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm dengan cara dipipet masing-masing 1; 2; 3; 4; dan 5 mL, kemudian masing masing dimasukkan dalam labu ukur 10 mL. Masing-masing deret

standar dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda, kemudian ditambahkan dengan 1 mL aquades ke dalam tabung reaksi lain sebagai larutan blanko. Sebanyak 5 mL pereaksi Follin-Ciocalteu ditambahkan lalu dihomogenkan, kemudian didiamkan 8 menit. Setelah itu ditambahkan pereaksi Na₂CO₃ 7,5% sebanyak 4 mL dan diamkan pada suhu ruang selama 1 jam.

d) Preparasi sampel

Sampel ekstrak batang brotowali ditimbang sebesar 0.1 gram, kemudian dilarutkan dengan etanol hingga larut, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan dengan aquades hingga tanda batas, lalu dihomogenkan. Larutan sampel dipipet 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Sebanyak 5 mL pereaksi Follin-Ciocalteu ditambahkan lalu dihomogenkan, kemudian didiamkan selama 8 menit. Setelah itu ditambahkan pereaksi Na₂CO₃ 7,5% sebanyak 4 mL dan diamkan pada suhu ruang selama 1 jam.

Setelah semua larutan disiapkan dalam tabung reaksi, selanjutnya dilakukan pengukuran dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Spektrofotometer merupakan alat yang digunakan untuk melakukan spektrofotometri. Spektrofotometri adalah pengukuran energi cahaya oleh suatu sistem kimia pada panjang gelombang tertentu (Day & Underwood, 1981). Pengukuran biasanya dilakukan pada rentang panjang gelombang 160-900 nm. Penetapan kadar total fenol batang brotowali ini dilakukan pengukuran pada panjang gelombang 760 nm.

3.3.3 Karakterisasi Gugus Fungsi Menggunakan *Fourier Transform Infra Red* (FTIR)

Gugus fungsi pada ekstrak batang brotowali ditentukan dengan Fourier Transform Infrared (FTIR), yang digunakan untuk mengidentifikasi komponen aktif berdasarkan puncak di spektrum IR (Sumantri et al., 2020). Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 2,5-50 μm atau bilangan gelombang 4000-200 cm^{-1} , yang menyebabkan getaran pada molekul-molekul. Pita serapan inframerah spesifik untuk jenis ikatan kimia atau gugus

fungsi (Dachriyanus, 2004). Analisis FTIR menghasilkan grafik yang menampilkan panjang gelombang (λ) pada sumbu x dan jumlah cahaya yang dipantulkan atau transmitansi (%) pada sumbu y. Posisi dan intensitas puncak serapan mencerminkan gerakan molekuler khas, menjelaskan ikatan kimia, konformasi, dan lingkungan kimia di sekitar atom atau gugus fungsi dalam molekul (Alauhdin et al., 2021).

3.3.4 Skrining Fitokimia

Tahapan skrining fitokimia dilakukan setelah mendapatkan ekstrak kental brotowali hasil evaporasi untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder. Skrining fitokimia yang dilakukan meliputi uji alkaloid, flavonoid, tannin, dan saponin berdasarkan metode Harborne. Langkah-langkah skrining fitokimia yaitu:

a) Alkaloid

Sebanyak 0,1 ml ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2-3 tetes pereaksi Dragendorff. Kedeberadaan alkaloid ditunjukkan dengan munculnya endapan oranye merah dengan kekeruhan.

b) Flavonoid

Ekstrak brotowali sebanyak 4 mg/ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan sepotong pita magnesium. Kemudian, ditetes secara bertahap oleh HCl kuat, sehingga terjadi perubahan warna dari jingga menjadi merah, kemudian menjadi merah tua. Perubahan warna dari jingga menjadi merah menunjukkan adanya flavon; merah menjadi merah tua menunjukkan adanya flavonoid.

c) Tanin

Sebanyak 2 ml ekstrak brotowali ditambahkan dengan 3 ml aquades, lalu diberikan larutan FeCl_3 5% sebanyak 2-3 tetes. Keberadaan tannin ditunjukkan oleh larutan berwarna warna hijau kehitaman atau biru.

d) Saponin

Sebanyak 0,5 gr ekstrak brotowali dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan aquades sebanyak 5 ml lalu dikocok sampai berbuih. Keberadaan saponin ditandai oleh buih yang tidak hilang dalam 15 menit

3.3.5 Penomoran Sampel Tanaman Kailan

Langkah pertama sebelum melakukan aplikasi pada tanaman kailan adalah melakukan penomoran sampel untuk memilih tanaman yang akan diamati. Dalam studi ini, tanaman kailan dibagi menjadi 10 kelompok, terdiri dari 3 kelompok perlakuan yang masing-masing menggunakan komposit biopestisida ekstrak batang brotowali dan bionutrien S-367B dengan 3 dosis berbeda, serta 1 kelompok kontrol pelarut. Perlakuan diterapkan pada tanaman di baris ke-2 hingga baris ke-10, sementara kontrol pelarut diambil dari tanaman di baris ke-1. Sebelum penomoran, jumlah tanaman kailan di lahan dihitung, dengan jumlah 150 tanaman per bedeng, dan penomoran dilakukan secara acak dengan aplikasi *random picker*.

Tabel 1 Penomoran Sampel Kailan

	Perlakuan (Komposit Ekstrak batang Brotowali dan Bionutrien S-367B)									
	25%			50%			75%			
	5 ml/L	7,5 mL/L	10 mL/L	5 ml/L	7,5 mL/L	10 mL/L	5 ml/L	7,5 mL/L	10 mL/L	
KONTROL PELARUT										

Keterangan:

- Kontrol Pelarut
- Kelompok tanaman tanpa perlakuan
- Kelompok tanaman perlakuan
- Tanaman kailan yang diamati

3.3.6 Tahap Aplikasi

Pada tahap aplikasi ini, tanaman kailan pada kelompok tanaman perlakuan, dilakukan perlakuan berupa penyemprotan campuran ekstrak batang brotowali dengan bionutrient S-367B. Sebelum dilakukan perlakuan pada tanaman kailan, ekstrak daun batang brotowali dicampurkan dengan bionutrien S-367B dengan variasi konsentrasi yang berbeda, yaitu:

- a) Komposit ekstrak batang brotowali dan bionutrient S-367B 25%
(ekstrak batang brotowali 250 mL + bionutrient S-367B 750 mL)
- b) Komposit ekstrak batang brotowali dan bionutrient S-367B 50%
(ekstrak batang brotowali 500 mL + bionutrient S-367B 500 mL)
- c) Komposit ekstrak batang brotowali dan bionutrient S-367B 75%
(ekstrak batang brotowali 750 mL + bionutrient S-367B 250 mL)

Setelah dicampurkan, campuran ekstrak dan bionutrien diaplikasikan ke tanaman kailan dengan dosis 5 mL, 7,5 mL, dan 10 mL dalam 1000 mL air pada masing-masing konsentrasi campuran. Pengaplikasian dilakukan secara rutin setiap tujuh hari sekali. Begitu juga pada kelompok kontrol pelarut, dilakukan pengaplikasian secara rutin setiap tujuh hari sekali berupa pelarut (etanol + aquades). Pertumbuhan dari tanaman kailan pada setiap kelompok tanaman diamati yang diantaranya panjang daun, lebar daun, dan tinggi tanaman kailan. Tidak hanya pertumbuhan tanaman kailan, pH dan kelembaban tanah setiap kelompok tanaman pun diamati.

a) Pengukuran Panjang Daun dan Tinggi Tanaman Kailan

Panjang daun, lebar tinggi, dan tinggi tanaman kailan dilakukan pengukuran pertumbuhan disetiap minggunya. Pengamatan dilakukan hingga waktu panen dengan alat pengukuran pertumbuhan tanaman kailan berupa penggaris dan alat tulis

b) Pengukuran pH dan Kelembaban Tanah

Pengukuran pH dan kelembaban tanah dilakukan pada tanah kelompok-kelompok perlakuan komposit (ekstrak batang brotowali + bionutrien S-367B) dan kelompok kontrol pelarut (etanol + aquades). Pengukuran dilakukan menggunakan alat pH meter analog ETP306 3in1 yang diukur setiap seminggu sekali

c) Hasil Panen

Hasil panen dari tanaman dicatat dan ditimbang massa yang diperoleh dari masing-masing kelompok tanaman yang diamati. Proses penimbangan tanaman kailan hasil panen menggunakan alat timbang digital. Waktu panen tanaman kailan dilakukan pada pagi hari dan saat cuaca cerah.