

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

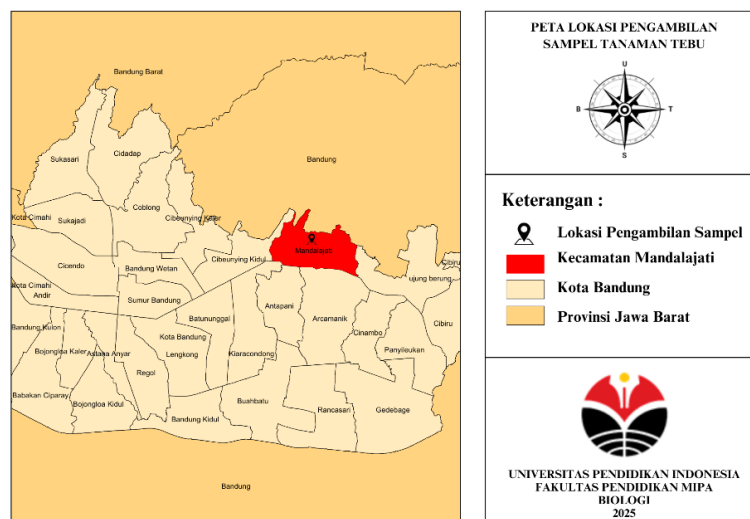
Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif. Penelitian ini hanya mendeskripsikan dan menginterpretasikan kandungan metabolit dan aktivitas antioksidan pada kalus tebu dengan frekuensi subkultur berbeda yang dikultur pada media yang sama dan pada planlet tebu dengan frekuensi subkultur berbeda yang dikultur pada media yang berbeda menggunakan instrumen *Gas Chromatography-Mass-Spectrometry* (GC-MS) dan metode DPPH. Menurut Rusandi & Rusli (2021), penelitian deskriptif adalah suatu bentuk penelitian yang ditujukan untuk mendeskripsikan fenomena sebagaimana adanya.

3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2024 – Maret 2025 yang meliputi pengambilan bahan (kalus dan planlet) hingga analisis data. Lokasi pengambilan kalus dan planlet tanaman tebu dilakukan di Balai Pengembangan dan Produksi Benih Perkebunan (BPPBP) Dinas Perkebunan Provinsi Jawa Barat Jl. Arcamanik No.106, Sindang Jaya, Kec. Mandalajati, Kota Bandung, Jawa Barat (Gambar 3.1 dan Gambar 3.2). Persiapan alat dan bahan penelitian serta ekstraksi kalus dan planlet dilaksanakan di Laboratorium Riset Lingkungan Program Studi Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (Lampiran 1). Analisis metabolit menggunakan GC-MS dilaksanakan di Pusat Laboratorium Forensik Badan Reserse Kriminal Kepolisian Negara Republik Indonesia, Sentul, Kabupaten Bogor, dan uji aktivitas antioksidan dilaksanakan di Laboratorium Aplikasi Kimia dan Pelayanan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran.



Gambar 3.1. Balai Pengembangan dan Produksi Benih Perkebunan (BPPBP)



Gambar 3.2. Peta Lokasi Pengambilan Kalus dan Planlet

3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan yaitu pengambilan kalus dan planlet tebu, pengukuran faktor abiotik, persiapan bahan, pembuatan ekstrak kalus dan planlet tebu, analisis metabolit menggunakan GC-MS, uji aktivitas antioksidan menggunakan DPPH, dan analisis data.

3.3.1 Subjek Penelitian

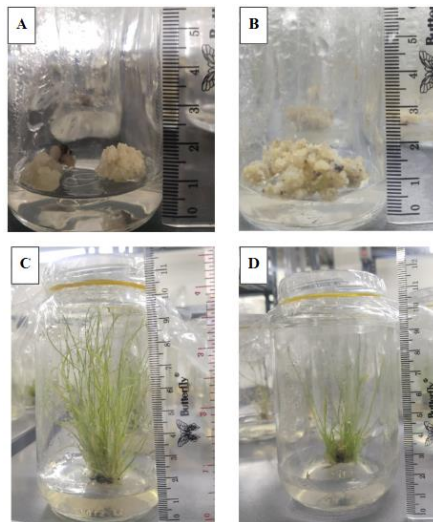
Penelitian ini menggunakan kalus dan planlet tanaman tebu yang dibudidayakan di Balai Pengembangan dan Produksi Benih Perkebunan (BPPBP) Dinas Provinsi Jawa Barat. Sumber eksplan yang digunakan untuk kalus dan planlet adalah batang Tebu Var. PSJT 941 yang berusia 5 bulan dan berasal dari kebun Dinas Sindanglaya. Kalus dan planlet yang akan digunakan diambil berdasarkan frekuensi subkultur yang berbeda, yaitu kalus tebu subkultur ke-3 (KS3) dan kalus tebu subkultur ke-4 (KS4), planlet tebu subkultur ke-10 (PS10), dan planlet tebu subkultur ke-11 (PS11) (Gambar 3.3). Medium yang digunakan untuk pertumbuhan dan subkultur KS3 dan KS4 adalah media Murashige dan Skoog (MS) dengan penambahan 2,4-D (asam 2,4-diklorofenoksiasetat) 3 ppm. Multiplikasi PS10 dilakukan pada media MS dengan penambahan Kinetin 0,2 ppm dan Air Kelapa 10%, sedangkan PS11 disubkultur ke media selanjutnya yaitu media MS dengan penambahan Tidiazuron (TDZ) 0,3 ppm dan Kinetin 0,2 ppm setiap 1 bulan sekali. Planlet yang terlihat memiliki pertumbuhan batang, daun, tunas, dan akar yang tinggi terseleksi sebagai bahan yang digunakan untuk analisis. Bagian planlet yang

Yualinda Durotul Marhamah, 2025

KANDUNGAN METABOLIT DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PADA KALUS DAN PLANLET TANAMAN TEBU (*Saccharum officinarum* L.)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

digunakan adalah bagian dari pangkal hingga ke ujung daun planlet (*shoot*). Masing-masing kalus dan planlet dikumpulkan kira-kira sebanyak 20 g untuk berat basahnya (40 botol untuk planlet) dan disimpan pada wadah yang berbeda.



Gambar 3.3. Kalus dan Planlet Tebu yang digunakan : (A) Kalus Subkultur ke-3 (KS3), media: MS+2,4D; (B) Kalus Subkultur ke-4 (KS4), media: MS+2,4D; (C) Planlet Subkultur ke-10 (PS10), media: MS+Kinetin+Air Kelapa; (D) Planlet Subkultur ke-11 (PS11), media: MS+Kinetin+Tidiazuron

Data faktor abiotik diukur pada ruangan tempat tumbuh kalus dan planlet tanaman tebu. Pengukuran faktor abiotik meliputi kelembapan dan suhu ruang yang diukur dengan menggunakan *humidity* meter dan intensitas cahaya diukur menggunakan lux meter (Gambar 3.4).



Gambar 3.4. Alat Pengukuran Faktor Abiotik : A. Lux meter, B. *Humidity* meter

3.3.2 Persiapan Bahan

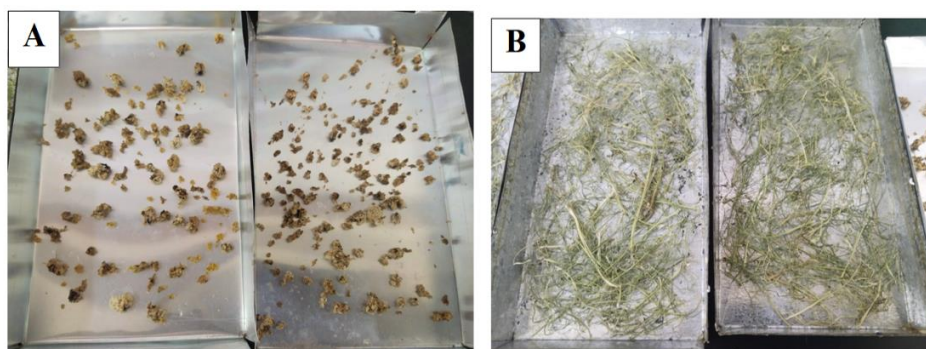
Kalus dan planlet tanaman tebu yang telah dikeluarkan dari botol kultur dibersihkan untuk menghilangkan kotoran dan bahan asing lain pada

Yualinda Durotul Marhamah, 2025

KANDUNGAN METABOLIT DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PADA KALUS DAN PLANLET TANAMAN
TEBU (*Saccharum officinarum* L.)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

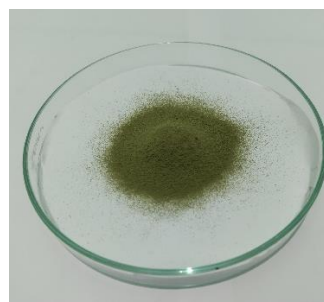
permukaannya. Planlet tebu yang akan digunakan dipisahkan dengan membuang bagian yang tidak digunakan. Kalus dan planlet yang telah dibersihkan, kemudian ditimbang untuk mengetahui berat segarnya. Pengeringan kalus dan planlet dilakukan sesuai metode Sánchez-Ramos dkk. (2018), kalus dan planlet tanaman tebu yang telah ditimbang untuk mengetahui berat segarnya kemudian disimpan di wadah dan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu pengeringan 40⁰C hingga berat konstan (Gambar 3.5). Merujuk pada penelitian Rivai dkk. (2010), selama pengeringan penimbangan secara berkala pada kalus dan planlet dilakukan hingga beratnya konstan. Apabila berat kalus dan planlet konstan maka pengeringan dihentikan. Kalus dan planlet yang telah selesai dikeringkan kemudian ditimbang kembali untuk mengetahui berat keringnya dan kemudian dihaluskan dengan menggunakan lumpang dan alu, selanjutnya diayak menggunakan saringan berukuran 100 *mesh* (Gambar 3.6 dan Gambar 3.7). Serbuk simplisia kalus dan planlet tebu yang diperoleh disimpan dalam botol vial hingga digunakan untuk membuat ekstrak (Gambar 3.8).



Gambar 3.5. Hasil Pengeringan: (A) Kalus Tebu dan (B) Planlet Tebu



Gambar 3.6. Penghalusan menggunakan Lumpang dan Alu



Gambar 3.7. Hasil Pengayakan menggunakan Saringan 100 *mesh*



Gambar 3.8. Serbuk Simplisia Kalus dan Planlet Tebu

3.3.3 Ekstraksi

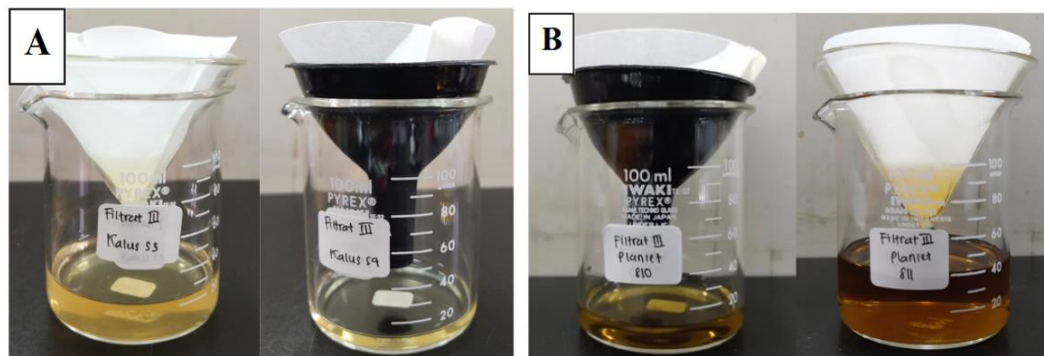
Proses ekstraksi dilakukan berdasarkan penelitian Zamir dkk. (2012) dan Potenza dkk. (2020) yaitu metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol p.a 70% (Lampiran 2). Berdasarkan penelitian Valenzuela-Atondo dkk. (2020), perbandingan serbuk simplisia dan pelarut yang digunakan adalah 1 : 10. Masing-masing serbuk simplisia kalus dan planlet tebu ditimbang sebanyak 2 gram kemudian dilarutkan dalam 20 mL pelarut etanol p.a 70% pada labu erlenmeyer (Gambar 3.9).



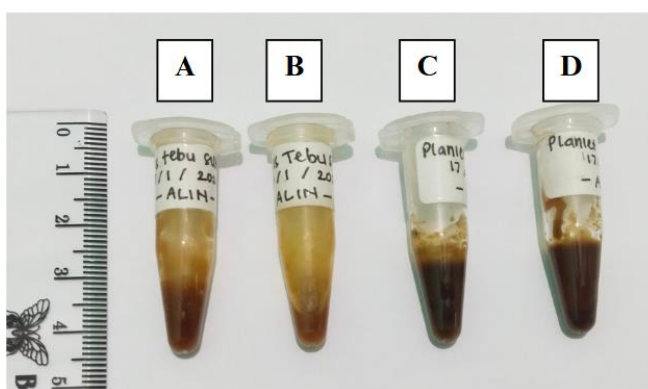
Gambar 3.9. Maserasi Serbuk Simplisia Kalus dan Planlet Tebu

Proses maserasi dilakukan berdasarkan penelitian Mata (2021) dengan modifikasi yaitu selama 2x24 jam dan pengadukan dilakukan setiap 24 jam sekali menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Selama maserasi labu erlenmeyer ditutup menggunakan aluminium foil dengan tujuan menghindari terjadinya penguapan. Setelah 2x24 jam, hasil rendaman disaring dengan menggunakan kertas saring *Whatman* no.1 sehingga diperoleh filtrat I dan ampasnya. Berdasarkan penelitian Antari dkk. (2015), ampas yang telah dipisahkan dengan filtrat I dimaserasi kembali dengan menambahkan 20 mL pelarut etanol p.a 70% serta diaduk dengan menggunakan *shaker* selama 5 menit dan disaring kembali dengan

kertas saring *Whatman* no.1 (filtrat II). Filtrat I dan Filtrat II dicampur dan disaring kembali dengan menggunakan kertas saring *Whatman* no.1 menghasilkan filtrat III (Gambar 3.10). Filtrat selanjutnya diuapkan menggunakan *waterbath* dengan suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak yang kental (Gambar 3.11). Hasil ekstraksi kemudian disimpan pada suhu ruang hingga digunakan untuk analisis GC-MS.



Gambar 3.10. Penyaringan Ekstrak : (A) Kalus; (B) Planlet



Gambar 3.11. Ekstrak Kental Kalus dan Planlet Tebu
(A) KS3; (B) KS4; (C) PS10; (D) PS11

3.3.4 Analisis Senyawa Bioaktif dengan GC-MS

Kandungan senyawa metabolit pada kalus dan planlet tebu dianalisis menggunakan instrumen GC-MS. Instrumen GC-MS yang digunakan dalam analisis yaitu AGILENT 5973 Tahun 2004 (Gambar 3.12). Instrumen tersebut memiliki tipe kolom Agilent 190915-433UI HP 5 MS ultra Inert (5% *Phenyl Methyl Siloxane*) dengan panjang kolom 30 m, ketebalan kolom 0,25 μm , serta diameter kolom 250 μm . Gas pembawa yang digunakan adalah gas helium dengan laju aliran konstan 1 mL/menit. Volume ekstrak sebanyak 1 μL diinjeksikan ke dalam instrumen GC-MS. Suhu oven diatur pada 60°C lalu ditingkatkan sampai 290°C. Detektor spektrofotometer massa dioperasikan dengan pemindaian 35-650 m/z dan

Yualinda Durotul Marhamah, 2025

KANDUNGAN METABOLIT DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PADA KALUS DAN PLANLET TANAMAN
TEBU (*Saccharum officinarum* L.)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Electron Multiplier Voltage (EM Voltage) pada 1247 V. Total waktu yang diperlukan adalah 43 menit untuk pengoperasian GC-MS.



Gambar 3.12. Instrumen GC-MS Agilent 5973
(Komunikasi Pribadi, 2025)

3.3.5 Analisis Data Senyawa Bioaktif dengan GC-MS

Data yang diperoleh dari hasil analisis metabolit menggunakan GC-MS adalah grafik kromatogram yang menampilkan jenis dan kadar metabolit yang ditunjukkan dengan intensitas puncak (*peak*). Identifikasi metabolit dilakukan dengan melihat indeks kemiripannya (*similarity index*) dengan data pada pustaka *National Institute of Standards and Technology* (NIST) dengan batas minimal indeks kesamaan 80%. Informasi mengenai nama umum dan IUPAC setiap senyawa metabolit diperoleh dari situs PubChem *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Data yang telah diolah disajikan dalam bentuk tabel, diagram venn, dan *heatmap*. Informasi mengenai sifat bioaktif serta manfaat dari setiap senyawa diperoleh dari studi literatur.

3.3.6 Uji Aktivitas Antioksidan

Pada penelitian aktivitas antioksidan, metode yang digunakan adalah 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) dengan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Metanol merupakan pelarut yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan karena pelarut metanol dapat menguji aktivitas non polar dan pelarut metanol tidak akan mempengaruhi reaksi antara larutan DPPH sebagai radikal dan sampel uji sebagai aktivitas antioksidan (Molyneux, 2004; Salamah & Widyasari, 2015).

3.3.6.1 Pembuatan Larutan DPPH

Pada penelitian ini, sebanyak 1 mg serbuk DPPH ditimbang dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dalam 6,25 mL metanol, kemudian

Yualinda Durotul Marhamah, 2025

KANDUNGAN METABOLIT DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PADA KALUS DAN PLANLET TANAMAN
TEBU (*Saccharum officinarum* L.)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

dihomogenkan dengan menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut. Larutan DPPH yang telah dibuat pada seluruh permukaan erlenmeyernya ditutup dengan menggunakan aluminium foil dengan tujuan mencegah kerusakan akibat cahaya (Parawansah & Qodri, 2023) (Gambar 3.13).



Gambar 3.13. Pengadukan DPPH dengan *magnetic stirrer*

3.3.6.2 Pembuatan Larutan Standar

3.3.6.2.1 Pembuatan Larutan Kontrol

Pada penelitian ini larutan yang digunakan sebagai kontrol adalah DPPH yang ditambahkan dengan metanol. Larutan kontrol pada uji aktivitas antioksidan ini dibuat dengan melarutkan 0,2 ml larutan DPPH dengan 0,8 ml pelarut metanol, sehingga volume larutan kontrol menjadi 1 ml. Larutan dihomogenkan pada tabung reaksi dan permukaan tabung reaksi ditutup dengan menggunakan aluminium foil, kemudian diinkubasi dalam ruangan gelap selama 30 menit.

3.3.6.2.2 Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Kalus dan Ekstrak Planlet Tebu

Ekstrak kalus dan planlet tebu dengan frekuensi subkultur berbeda masing-masing ditimbang. Ekstrak KS3 ditimbang sebanyak 30,6 mg, ekstrak KS4 ditimbang sebanyak 19,8mg, ekstrak PS10 ditimbang sebanyak 33,4 mg, dan ekstrak PS11 ditimbang sebanyak 22,1 mg. Masing-masing ekstrak dimasukkan ke dalam tabung eppendrof, kemudian ditambahkan metanol sebanyak 5 mL (Gambar 3.14). Sampel dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut. Sampel yang sulit larut dihomogenkan dengan menggunakan *ultrasonic cleaner* dan disentrifugasi pada kecepatan 5100 rpm selama 5 menit hingga sampel larut (Gambar 3.15 dan Gambar 3.16).

Pada setiap larutan ekstrak dibuat larutan seri yang berbeda. Hal ini disebabkan karena masing-masing ekstrak sampel memiliki karakteristik yang berbeda. Pada

ekstrak kalus dan planlet, pengukuran nilai absorbansi dilakukan dengan melarutkan ekstrak kalus atau planlet, metanol, dan DPPH hingga homogen menjadi 1 ml. Pada masing-masing ekstrak perbandingan antara volume sampel dengan metanol yang digunakan berbeda-beda, sedangkan larutan DPPH yang digunakan memiliki volume yang sama yaitu sebanyak 0,2 ml. Volume sampel yang digunakan pada ekstrak KS3, KS4, dan PS11 adalah 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, 0,5 ml, dan 0,6 ml, sedangkan pada ekstrak PS10 adalah 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, dan 0,5 ml. Pada permukaan masing-masing tabung reaksi ditutup menggunakan aluminium foil dan kemudian diinkubasi selama 30 menit di ruangan gelap.



Gambar 3.14. Larutan Ekstrak Sampel



Gambar 3.15. *Ultrasonic Cleaner*



Gambar 3.16. *Centrifuge*

3.3.6.3 Pengukuran Absorbansi dengan Spektrofotometer UV-Vis

Pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (Gambar 3.17) dengan panjang gelombang (λ) 515 nm. Selanjutnya larutan kontrol dan larutan stok ekstrak yang telah diinkubasi di ruang gelap selama 30 menit diukur nilai absorbansinya.

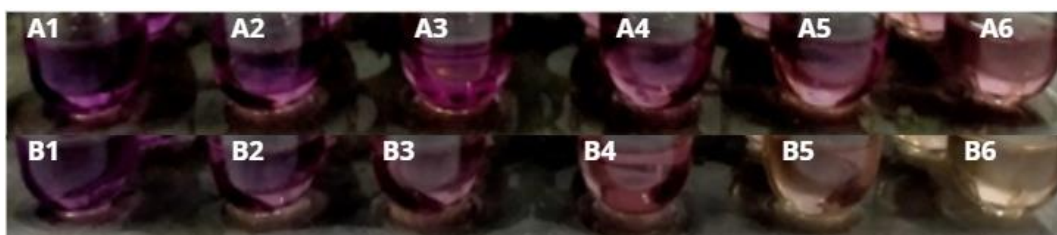


Gambar 3.17. Spektrofotometer UV-Vis
(Dok. Pribadi, 2025)

3.3.7 Analisis Data Uji Aktivitas Antioksidan

3.3.7.1 Penentuan Nilai Inhibisi dan Nilai IC₅₀

Indikator adanya aktivitas antioksidan pada larutan ditunjukkan dengan perubahan warna dari ungu tua menjadi kuning pucat (Gambar 3.18 dan Gambar 3.19). Perubahan warna ini menunjukkan penurunan radikal bebas yang dapat diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Semakin tinggi perubahan warna yang dihasilkan, maka semakin tinggi aktivitas antioksidan pada larutan ekstrak tersebut.



Gambar 3.18. Ekstrak Kalus Tebu : (A) sebelum diinkubasi; (B) setelah diinkubasi

Keterangan: (A1, B1) Kontrol 0,2 ml DPPH + 0,8 ml metanol; (A2, B2) 0,2 ml ekstrak + 0,2 ml DPPH + 0,6 ml metanol; (A3, B3) 0,3 ml ekstrak + 0,2 ml DPPH + 0,5 ml metanol; (A4, B4) 0,4 ml ekstrak + 0,2 ml DPPH + 0,4 ml metanol; (A5, B5) 0,5 ml ekstrak + 0,2 ml DPPH + 0,3 ml metanol (A6, B6) 0,6 ml ekstrak + 0,2 ml DPPH + 0,2 ml metanol



Gambar 3.19. Ekstrak Planlet Tebu : (A) sebelum diinkubasi; (B) setelah diinkubasi

Keterangan: (A1, B1) Kontrol 0,2 ml DPPH + 0,8 ml metanol; (A2, B2) 0,2 ml ekstrak + 0,2 ml DPPH + 0,6 ml metanol; (A3, B3) 0,3 ml ekstrak + 0,2 ml DPPH + 0,5 ml metanol; (A4, B4) 0,4 ml ekstrak + 0,2 ml DPPH + 0,4 ml metanol; (A5, B5) 0,5 ml ekstrak + 0,2 ml DPPH + 0,3 ml metanol (A6, B6) 0,6 ml ekstrak + 0,2 ml DPPH + 0,2 ml metanol

Parameter yang digunakan dalam pengukuran aktivitas antioksidan adalah *Inhibitory Concentration* (IC₅₀). Menurut Molyneux (2004), nilai IC₅₀ ini merupakan konsentrasi efektif (ppm) antioksidan yang dapat menghambat aktivitas radikal bebas sebesar 50%. Perhitungan IC₅₀ dihitung berdasarkan rumus :

(Parawansah & Qodri, 2023).

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Yualinda Durotul Marhamah, 2025

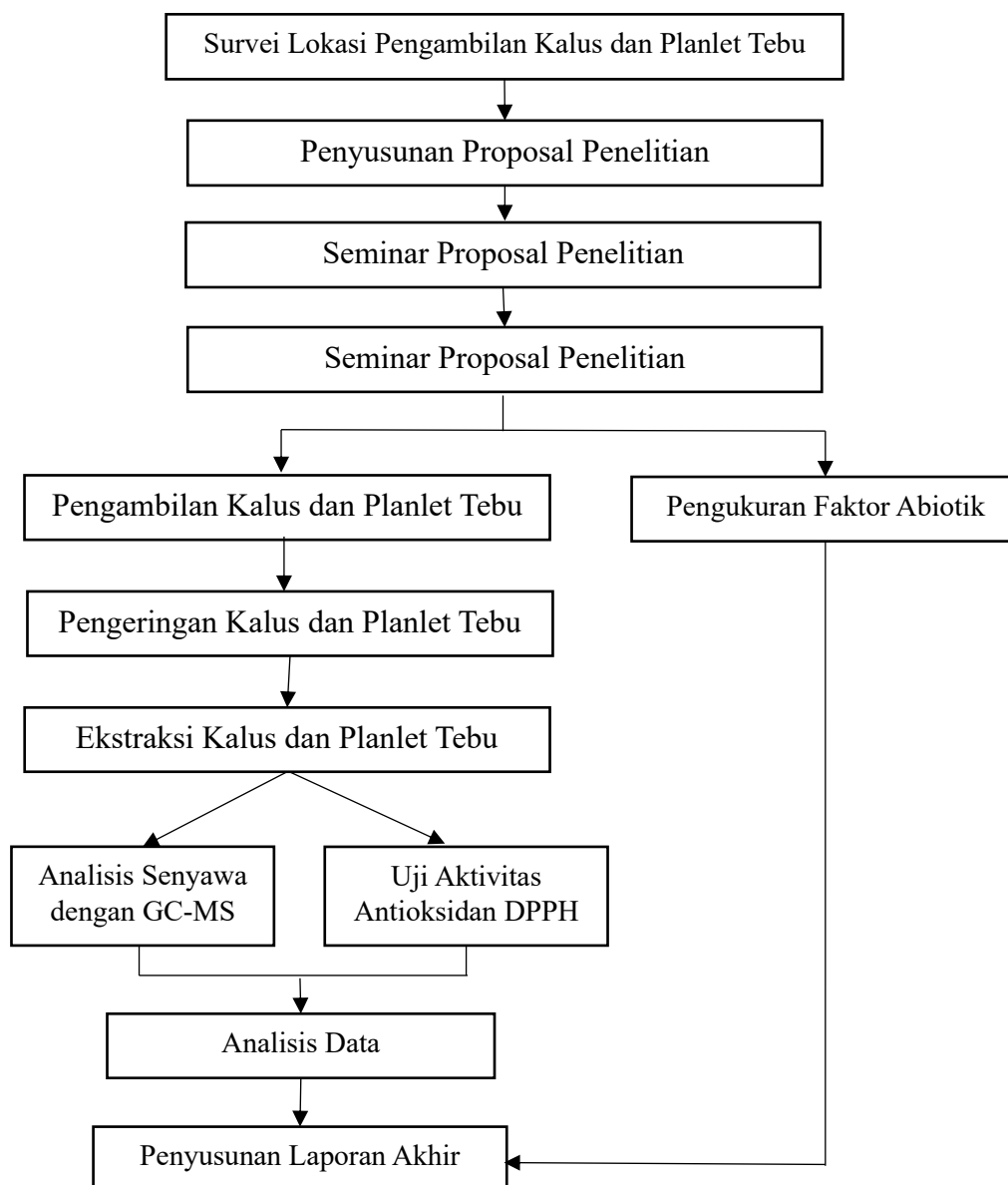
KANDUNGAN METABOLIT DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PADA KALUS DAN PLANLET TANAMAN
TEBU (*Saccharum officinarum* L.)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Perhitungan data aktivitas dianalisis dan nilai IC_{50} dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear ($y = a+bx$) dimana sumbu x mewakili konsentrasi larutan uji maupun pembanding, sedangkan sumbu y mewakili IC_{50} (Parawansah & Qodri, 2023).

3.4 Alur Penelitian

Berdasarkan metode penelitian yang telah dijelaskan, dapat dirumuskan alur penelitian seperti pada Gambar 3.20.



Gambar 3.20. Bagan Alir Alur Penelitian