

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Objek dan Lokasi Penelitian

Objek atau bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah tanaman dengan kode AGF yang diperoleh dari daerah Taman Sari Bandung dan Banyuresmi Garut. Penelitian berlangsung sekitar 8 bulan, terhitung dari Maret 2013 sampai Oktober 2013. Penelitian ini terdiri dari empat tahap utama yaitu tahap preparasi sampel, tahap ekstraksi dan pemisahan, tahap analisis dan karakterisasi, serta tahap aplikasi.

Tempat penelitian pada masing-masing tahapan berbeda-beda, antara lain: Tahap preparasi sampel, ekstraksi, dan analisis dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Lingkungan FPMIPA UPI Bandung, tahap pemisahan dilakukan di Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia FPMIPA UPI Bandung, tahap karakterisasi dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA UPI Bandung, sedangkan tahap aplikasi dilakukan di Kebun Riset Kimia Lingkungan FPMIPA UPI Bandung.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah lumpang dan alu, neraca analitik, gelas kimia 3 L, spatula, batang pengaduk, labu Erlenmeyer berpenghisap, corong Buchner, kertas saring, botol semprot, pemanas listrik, *magnetic stirrer*, set alat destilasi, set alat penguap berputar vakum (*vacuum rotary evaporator*), pompa vakum, set alat *freeze dryer* Eyela FD-5N, botol kaca 1 L, botol pial 100 mL, mikro pipet 5mL, labu erlemeyer 150 mL, gelas ukur 100 mL, *staining jar*, *chamber*, set alat kromatografi kolom vakum cair (KVC) diameter 7 cm, UV *box*, tabung reaksi, rak tabung, penjepit tabung, ember, semprotan tanaman, plastik *wrap*, aluminium *foil*, penggaris, meteran, pot ukuran diameter 30 cm, botol bekas ukuran diameter minimal 10 cm, kertas label, selang,

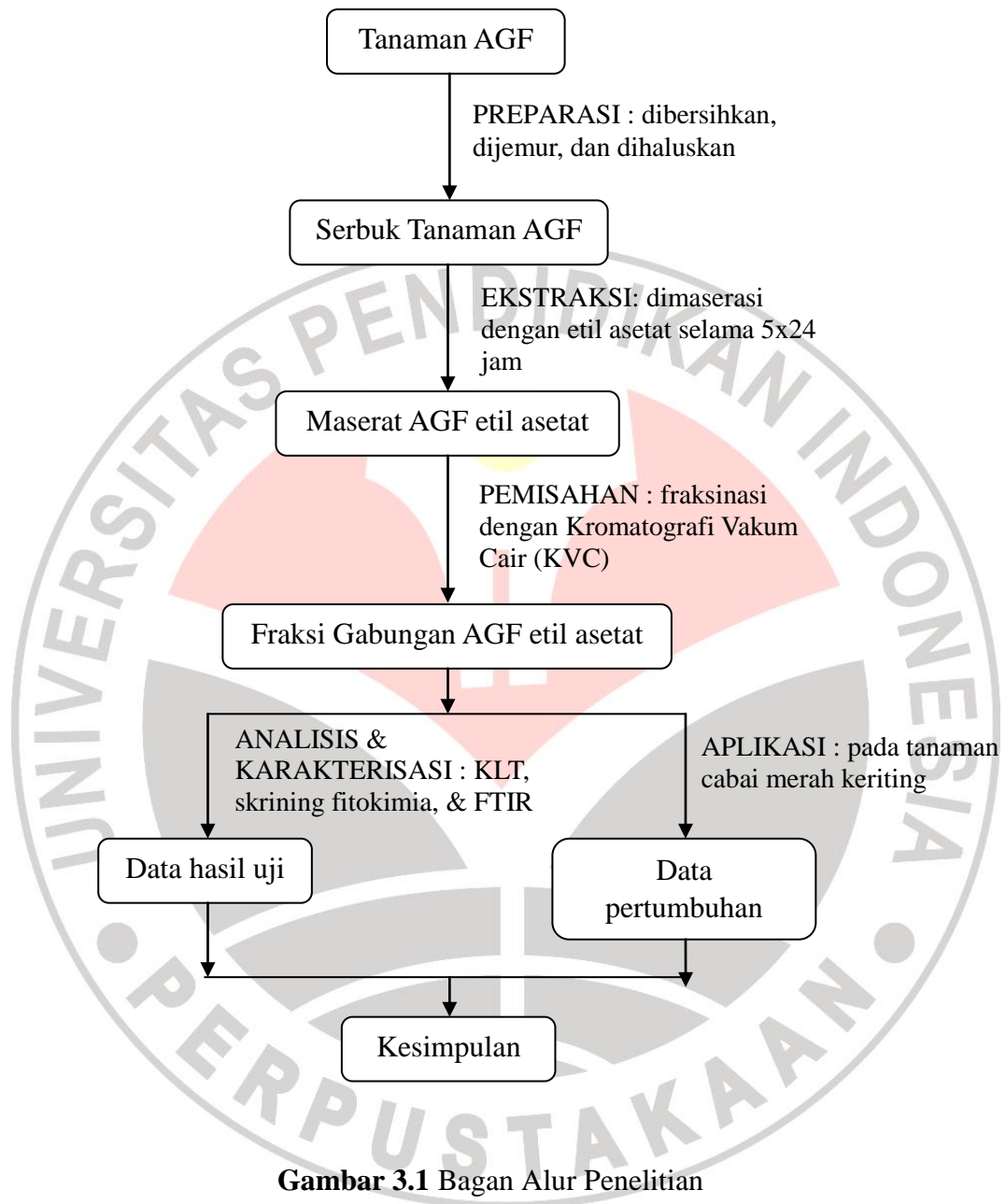
takemura soil pH and moisture tester tipe DM-15, spektrofotometer FT-IR (*Fourier Transform-Infra Red*) Shimadzu 8400.

3.2.2 Bahan

Pada penelitian ini, bahan utama yang digunakan adalah tanaman AGF yang telah dibersihkan, dikeringkan, ditumbuk halus, dan diayak sebanyak 1 kg. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan-bahan teknis. Untuk tahap pemisahan, bahan dengan kualitas teknis didestilasi terlebih dahulu sebelum digunakan sehingga diperoleh bahan-bahan redestilasi. Bahan-bahan yang digunakan pada tahap pemisahan adalah etil asetat teknis, n-heksana teknis, diklorometana teknis, metanol teknis, aquades, aseton, silica gel 60 GF₂₅₄ for TLC, silica gel 60 230–400 mesh for CC. Pada skrining fitokimia digunakan pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, HCl 1%, larutan FeCl₃, Pb asetat 10%, kloroform, H₂SO₄ 2M. Sedangkan pada tahap aplikasi digunakan air keran, tanah, pupuk kompos, pupuk phonska, dan pestisida “curacron EC 500”.

3.3 Alur Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi empat tahap utama. Tahap pertama yaitu tahap preparasi sampel tanaman AGF. Tahap kedua adalah tahap ekstraksi dan pemisahan dengan menggunakan: Metode Maserasi dan Kromatografi Vakum Cair (KVC). Selanjutnya tahap ketiga adalah tahap analisis dan karakterisasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), skrining fitokimia, dan spektroskopi FTIR. Tahap terakhir adalah aplikasi konsentrat etil asetat fraksi gabungan hasil dari tahap pemisahan bionutrien AGF pada tanaman cabai merah keriting (*Capsicum annum L.*) untuk mengetahui potensinya sebagai bionutrien pada pertumbuhan tanaman cabai merah keriting. Bagan dari alur penelitian secara umum dapat dilihat pada Gambar 3.1 di bawah ini.



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian

Uraian dari masing-masing langkah kerja yang dilakukan adalah sebagai berikut:

3.3.1 Penyiapan Sampel Serbuk Tanaman AGF

Sampel tanaman AGF yang akan digunakan dibersihkan terlebih dahulu dari kotoran seperti tanah dan tanaman parasit lain. Setelah itu dipotong bagian akarnya dan dijemur di bawah sinar matahari sampai kering. Selanjutnya tanaman dihaluskan dengan cara ditumbuk dengan lumpang dan alu hingga menjadi serbuk. Serbuk tanaman AGF kemudian diayak agar serbuk tersebut memiliki ukuran yang homogen dan halus sebelum dimaserasi.

3.3.2 Ekstraksi Bionutrien AGF dengan Metode Maserasi

Metode yang digunakan untuk mengekstrak AGF adalah dengan metode maserasi. Metode maserasi merupakan metode ekstraksi cair-padat. Serbuk tanaman AGF ditimbang sebanyak 1 kg kemudian diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat. Pelarut etil asetat yang digunakan adalah sebanyak 4 liter pada hari pertama atau hingga seluruh serbuk terendam. Setelah satu hari proses perendaman, filtrat kemudian disaring menggunakan corong Buchner sehingga diperoleh ekstrak AGF etil asetat dan residunya. Residu yang dihasilkan dimaserasi kembali dengan etil asetat sebanyak 3 liter. Kemudian disaring dan residu yang diperoleh dimaserasi kembali dengan 1 liter etil asetat selama 3 x 24 jam. Filtrat hasil maserasi keseluruhan dipekatkan menjadi 1 liter menggunakan alat penguap berputar vakum (*vacuum rotary evaporator*). Ekstrak AGF kemudian di *freeze drying* sehingga diperoleh pasta AGF untuk tahapan pemisahan.

3.3.3 Pemisahan Bionutrien AGF dengan Metode Kromatografi Vakum Cair (KVC)

Tahapan pemisahan dalam penelitian ini dilakukan menggunakan metode kromatografi vakum cair (KVC). Sebelum dilakukan proses pemisahan dilakukan terlebih dahulu kromatografi lapis tipis (KLT) untuk menentukan eluen yang tepat pada proses pemisahan menggunakan kromatografi vakum cair (KVC).

Pasta bionutrien AGF yang telah ditentukan eluennya dengan metode KLT, dilakukan pemisahan dengan metode KVC. Berdasarkan hasil KLT, eluen untuk memisahkan senyawa dalam pasta bionutrien AGF adalah n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan sebagai berikut; 10:0 sebanyak 2 kali elusi, 8:2 sebanyak 4 kali elusi, 7:3 sebanyak 4 kali elusi, 6:4 sebanyak 3 kali elusi, 3:7 sebanyak 3 kali elusi, dan 0:10 sebanyak 2 kali elusi. Setiap kali elusi, eluen yang digunakan sebanyak 100 mL. Adapun langkah kerja yang dilakukan adalah sebagai berikut:

Sebanyak 10 gram pasta dari hasil ekstraksi tanaman AGF diimpregnasi menggunakan pelarut aseton ke dalam 10 gram silica gel 60 230-400 mesh *for CC*. Mula-mula silica gel dimasukkan ke dalam lumpang kemudian sedikit demi sedikit ditetesi AGF yang telah dilarutkan dalam aseton sambil terus diaduk menggunakan alu. Didiamkan selama 1 malam agar silica yang diimpregnasi tersebut kering.

Sebanyak 100 gram silica gel 60 230-400 mesh *for CC* dimasukkan ke dalam kolom pada set alat KVC. Silica tersebut dihisap dengan menggunakan vakum sampai padat dan tidak terdapat rongga dalam silica. Permukaan kolom diratakan dan dikondisikan agar tidak ada celah dalam kolom. Sebelum sampel dimasukkan, permukaan kolom dilapisi kertas saring dan kolom dielusi terlebih dahulu menggunakan pelarut yang paling non polar (n-heksana) sampai eluat yang keluar tidak berwarna. Setelah itu, silica gel yang telah diimpregnasi dimasukkan ke dalam kolom kemudian diratakan dan diletakkan kertas saring di atas permukaan silica impreg. Sampel pada kolom dielusi dengan eluen yang telah ditentukan. Eluat ditampung dalam botol terpisah sesuai dengan volume eluen yang digunakan, kemudian diberi label. Pada tahap ini diperoleh beberapa fraksi yang kemudian akan digabungkan berdasarkan kemiripan pola pemisahan pada analisa KLT hasil KVC.

3.3.4 Analisis Bionutrien AGF dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Tahap analisis yang dilakukan adalah dengan metode KLT. Adapun langkah kerja yang dilakukan adalah sebagai berikut:

Kromatografi lapis tipis digunakan dalam penentuan eluen yang tepat untuk proses pemisahan (fraksinasi) dengan teknik KVC. Selain itu, KLT juga digunakan untuk menganalisis senyawa hasil pemisahan dengan KVC telah terpisah dengan baik atau telah murni.

Dalam pengerjaannya, lempeng tipis dengan adsorben silika gel 60 F₂₅₄ disiapkan dengan ukuran panjang 5 cm sedangkan lebarnya disesuaikan dengan jumlah fraksi yang akan ditotolkan. Pada bagian atas dan bawah lempeng diberi garis batas dengan jarak 0,5 cm dari tepi lempeng. Sampel yang akan dianalisis ditotolkan pada bagian tengah garis batas bawah dengan menggunakan pipa kapiler. Lakukan penotolan berulang kali hingga cukup tebal dan dibiarkan beberapa saat agar kering.

Chamber atau *staining jar* diisi dengan eluen yang akan digunakan untuk mengelusi lempeng tipis, dihomogenkan, dan didiamkan beberapa saat dengan kondisi tertutup agar *chamber* atau *staining jar* jenuh dengan uap eluen. Lempeng tipis yang telah disiapkan sebelumnya, kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* atau *staining jar* dengan menggunakan pinset hingga bagian bawah lempeng tercelup sebagian. Lempeng tipis tersebut diletak tegak bersandar pada dinding *chamber* atau *staining jar* kemudian ditutup.

Apabila eluen yang telah naik hingga mencapai garis batas atas maka proses KLT dihentikan dengan cara mengangkat lempeng dari *chamber* atau *staining jar* menggunakan pinset. Lempeng kemudian dibiarkan kering di udara terbuka. Noda pada lempeng diamati di bawah sinar UV.

3.3.5 Karakterisasi Bionutrien AGF dengan Skrining Fitokimia dan Spektroskopi FTIR

Karakterisasi yang dilakukan adalah dengan skrining fitokimia dan spektroskopi FTIR. Adapun langkah kerja yang dilakukan adalah sebagai berikut:

Astri Rizki Nurmala, 2013

Fraksinasi Dan Karakterisasi Ekstrak Etil AGF Serta Kajian Potensinya Sebagai Bionutrien Pada Pertumbuhan Tanaman Cabai Merah Keriting (*Capsicum annum L.*)

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

3.3.5.1 Karakterisasi Bionutrien AGF dengan Skrining Fitokimia

Fraksi gabungan (FG) bionutrien AGF hasil dari tahap pemisahan, diidentifikasi komponen fitokimianya dengan metode uji warna. Uji fitokimia ini bertujuan untuk mengetahui kelompok senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam FG bionutrien AGF. Skrining fitokimia ini dilakukan terhadap metabolit sekunder golongan alkaloid, tanin, flavonoid, dan terpenoid. Adapun prosedur kerja yang dilakukan adalah sebagai berikut:

A. Identifikasi Alkaloid

Sebanyak 3 mL konsentrat etil asetat FG bionutrien AGF dimasukkan masing-masing ke dalam tabung reaksi A dan B. Kemudian dicampurkan dengan 3 mL HCl 1 % di dalam *steam bath*. Tabung reaksi A ditambahkan pereaksi Mayer dan tabung reaksi B ditambahkan pereaksi Wagner. Terbentuknya endapan putih mengindikasikan adanya alkaloid (Kavit Mehta, B.N. Patel, B.K. Jain, 2013).

Pembuatan Pereaksi Mayer

Sebanyak 1 gram KI dilarutkan dalam 20 mL aquades. Kemudian ditambahkan 0,2 gram HgCl₂ dan diaduk hingga larut (Fadlie M., 2011).

Pembuatan Pereaksi Wagner

Sebanyak 2,5 gram I₂ dan 2 gram KI dimasukkan ke dalam 10 mL aquades. Kemudian dilarutkan dan diencerkan dengan aquades hingga mencapai volume 200 mL (Diana K.M., Pringgenies D., Karna O.R., 2012)

B. Identifikasi Tanin

Sebanyak 2 mL konsentrat dicampurkan dengan 2 mL aquades. Campuran tersebut ditambahkan sedikit larutan FeCl₃. Terbentuknya endapan hijau menunjukkan adanya tanin (Kavit Mehta, *et.al.*, 2013).

C. Identifikasi Flavonoid

Sebanyak 1 mL Pb asetat 10% ditambahkan ke dalam 1 mL konsentrat lalu dikocok. Timbulnya endapan kuning mengindikasikan konsentrat positif mengandung flavonoid (Kavit Mehta, *et.al.*, 2013).

D. Identifikasi Terpenoid

Ke dalam 2 mL konsentrat ditambahkan 2 mL kloroform dan dievaporasi hingga kering. Setelah itu, ditambahkan 2 mL H₂SO₄ 2M dan dipanaskan kembali selama 2 menit. Terbentuknya warna keabu-abuan menunjukkan adanya terpenoid (Kavit Mehta, *et.al.*, 2013).

3.3.5.2 Karakterisasi Bionutrien AGF dengan Spektroskopi FTIR

FG bionutrien AGF dikarakterisasi dengan spektrofotometer FTIR untuk mengetahui gugus fungsi yang kemungkinan ada dalam senyawa yang terdapat pada FG bionutrien AGF. Alat spektroskopi FTIR yang digunakan adalah FT-IR Shimadzu 8400.

3.3.6 Aplikasi Bionutrien AGF pada Tanaman Cabai Merah Keriting (*Capsicum annum L.*)

Pada tahap aplikasi digunakan konsentrat etil asetat FG bionutrien AGF. Aplikasi ini dilakukan untuk mengetahui potensi FG bionutrien AGF pada tanaman pertanian khususnya cabai merah keriting (*Capsicum annum L.*) di lapangan. Tahap aplikasi ini dilakukan di Kebun Riset Kimia Lingkungan FPMIPA UPI.

3.3.6.1 Tahap Persiapan Aplikasi Bionutrien AGF pada Tanaman Cabai Merah Keriting

Budidaya cabai merah keriting dimulai dari tahapan persiapan benih hingga penanaman. Tahap persiapan benih cabai merah keriting untuk aplikasi meliputi tahap penyortiran, pemeraman, persiapan media tanam, dan penyemaian. Sebelum pembenihan, biji cabai disortir terlebih dahulu untuk memperoleh biji

Astri Rizki Nurmala, 2013

Fransinasi Dan Karakterisasi Ekstrak Etil AGF Serta Kajian Potensinya Sebagai Bronutrien Pada Pertumbuhan Tanaman Cabai Merah Keriting (*Capsicum annum L.*)

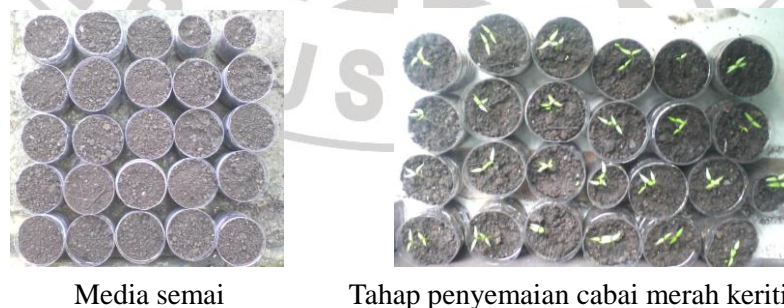
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

cabai yang memiliki kualitas baik. Penyortiran biji cabai tersebut dilakukan dengan cara merendam biji cabai di dalam air selama 1 malam. Biji yang digunakan adalah biji yang tenggelam karena mengindikasikan kualitas biji yang baik. Setelah itu, biji cabai diperam terlebih dahulu agar lebih cepat berkecambah dan nantinya saat proses penyemaian hanya akan diambil benih cabai yang telah berkecambah saja.



Gambar 3.2. Biji Cabai Merah Keriting Pada Tahap Penyortiran dan Pemeraman

Setelah tahap penyortiran dan pemeraman, tahap selanjutnya adalah penyemaian. Akan tetapi, sebelumnya dipersiapkan terlebih dahulu media yang akan digunakan untuk persemaian. Media yang digunakan adalah tanah dan kompos dengan perbandingan 2:1. Media tanam tersebut dimasukkan ke dalam botol bekas air mineral 1L yang telah dipotong dengan tinggi ± 12 cm. Kemudian benih cabai yang telah berkecambah dimasukkan ke dalam media tanam tersebut.



Gambar 3.3 Media Semai dan Tahap Penyemaian Cabai Merah Keriting

3.3.6.2 Tahap Aplikasi Bionutrien AGF pada Tanaman Cabai Merah Keriting

Pada tahap aplikasi ini dibuat pengelompokkan tanaman yang masing-masing terdiri dari lima tanaman. Pengelompokkan tanaman tersebut adalah sebagai berikut:

1. Tanaman yang diberi FG 1 bionutrien AGF diberi kode 1A, 1B, 1C, 1D, 1E.
2. Tanaman yang diberi FG 2 bionutrien AGF diberi kode 2A, 2B, 2C, 2D, 2E.
3. Tanaman yang diberi FG 3 bionutrien AGF diberi kode 3A, 3B, 3C, 3D, 3E.
4. Tanaman yang diberi FG 4 bionutrien AGF diberi kode 4A, 4B, 4C, 4D, 4E.
5. Tanaman yang diberi FG 5 bionutrien AGF diberi kode 5A, 5B, 5C, 5D, 5E.

Untuk mengetahui pengaruh pelarut yang digunakan maka dilakukan perlakuan pada kelompok tanaman yang diberi blanko etil asetat dengan kode ET1, ET2, ET3, ET4, ET5. Sedangkan untuk mengetahui pola pertumbuhan tanaman yang diberikan perlakuan seperti oleh petani maka dilakukan perlakuan pada kelompok tanaman yang diberi pupuk phonska dan pestisida “curacron EC 500” dengan kode K1, K2, K3, K4, K5. Setiap kelompok tanaman mendapatkan perlakuan yang berbeda ditampilkan pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Pembagian Kelompok Tanaman dan Perlakuan yang Diberikan

Kelompok tanaman	Perlakuan	Phonska	Pestisida	Bionutrien
I	FG 1 Bionutrien AGF	X	X	√
II	FG 2 Bionutrien AGF	X	X	√
III	FG 3 Bionutrien AGF	X	X	√
IV	FG 4 Bionutrien AGF	X	X	√
V	FG 5 Bionutrien AGF	X	X	√
VI	Blanko Etil Asetat (ET)	X	X	X
VII	Kontrol Positif (K)	√	√	X

Keterangan : √ = diberi ; x = tidak diberi

Tanaman yang diberi perlakuan dengan bionutrien AGF dan blanko etil asetat tidak diberi pestisida untuk melihat ketahanan tanaman terhadap penyakit dan hama. Berikut ini adalah konsentrasi etil asetat FG bionutrien AGF dan blanko etil asetat yang akan digunakan untuk aplikasi:



Gambar 3.4 Bionutrien AGF dan Blanko Etil Asetat yang akan Digunakan untuk Aplikasi

Tanaman cabai merah keriting mulai diberikan perlakuan saat dalam tahap penyemaian yaitu ketika umur cabai 26 hari setelah tanam (HST) atau pada minggu pertama pengamatan dengan dosis 2 mL/L air. Pemberian dosis yang rendah ini dipertimbangkan dari umur tanaman yang masih muda. Akan tetapi, pemberian bionutrien AGF tetap dilakukan untuk menjaga bibit tanaman dari serangan penyakit dan hama. Hal tersebut berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh M.Fadlie (2011) yang menyatakan bahwa ekstrak AGF etil asetat berpotensi sebagai biopestisida. Setelah tanaman cabai merah keriting mencapai umur 54 HST, diberikan perlakuan dengan dosis 10 mL/L air. Hal ini dimaksudkan agar kondisi tanaman cabai sudah kuat setelah dipindahkan dari tempat pembibitan ke dalam pot sehingga siap menerima perlakuan uji dengan dosis yang sesuai.



Tanaman cabai merah keriting berumur 26 HST



Tanaman cabai merah keriting berumur 54 HST

Gambar 3.5 Tanaman Cabai Merah Keriting saat Berumur 26 HST dan 54 HST

Astri Rizki Nurmala, 2013

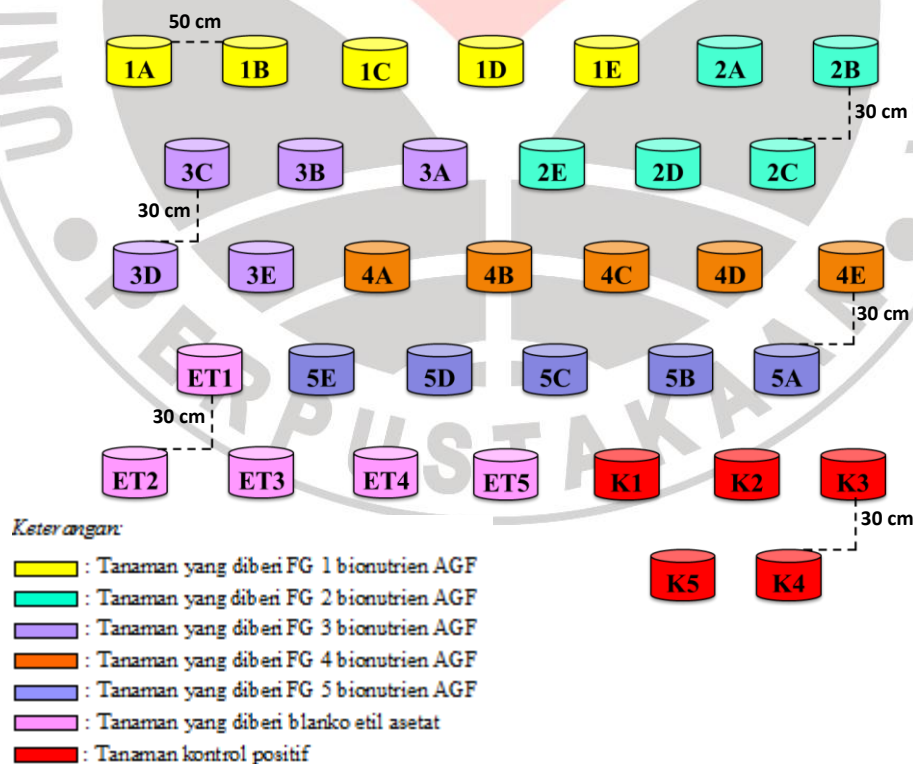
Fransinasi Dan Karakterisasi Ekstrak Etil AGF Serta Kajian Potensinya Sebagai Bronutrien Pada Pertumbuhan Tanaman Cabai Merah Keriting (*Capsicum annum L.*)

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

Pemupukan pada tanaman dilakukan dengan selang waktu satu minggu sekali dengan cara disemprot dan disiram. Adapun parameter pertumbuhan vegetatif yang diamati adalah:

1. Tinggi tanaman (cm), diukur dari pangkal akar hingga pangkal pucuk daun paling atas.
2. Lebar daun (cm), diukur dari sisi daun ke sisi daun lainnya.
3. Panjang daun (cm), diukur dari ujung daun sampai ke pangkal daun.
4. Jumlah buah cabai (buah), dihitung dari mulai cabai yang memiliki panjang ± 2 cm.
5. Bobot cabai (gram) yang dihasilkan setelah panen.

Selain itu, dilakukan pengamatan terhadap hama dan penyakit yang menyerang tanaman cabai merah keriting. Pengamatan dilakukan dari satu minggu sebelum diberikan perlakuan dan terus dilakukan hingga panen. Adapun *layout* penanaman cabai merah keriting di pot untuk aplikasi tersebut tergambar dalam skema berikut



Gambar 3.6 *Layout* Penanaman Cabai Merah Keriting di Pot untuk Aplikasi