

BAB 3

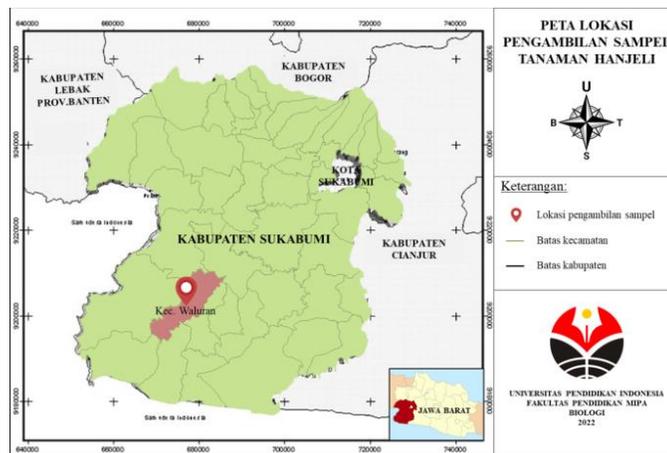
METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif. Penelitian deskriptif menggambarkan suatu fenomena apa adanya dengan mengutamakan objektivitas. Dalam penelitian deskriptif, tidak ada perlakuan yang diberikan atau dikendalikan, dan tidak adanya uji hipotesis (Furchan, 2004).

3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian mulai dari pengambilan sampel hingga analisis data dilakukan selama 3 bulan yaitu Maret hingga Mei 2023. Lokasi pengambilan sampel dilakukan di Desa Wisata Hanjeli, Kecamatan Waluran, Kabupaten Sukabumi, Jawa Barat (Gambar 3.1). Persiapan alat dan bahan, serta proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi FPMIPA UPI. Analisis metabolit pada sampel dengan menggunakan alat GC-MS di Pusat Laboratorium Forensik Bareskrim Polri dan analisis aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dilakukan di Pusat Penelitian *Basic Science* Universitas Padjajaran.



Gambar 3.1 Lokasi pengambilan sampel

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah hanjeli ketan dan hanjeli batok yang berada di kawasan Desa Wisata Hanjeli, Kecamatan Waluran, Kabupaten Sukabumi, Jawa Barat. Sampel yang digunakan adalah buah dan tangkai buah dari hanjeli ketan dan hanjeli batok yang sudah siap panen. Buah yang digunakan mulai dari bagian perikarp hingga endosperm bijinya. Tangkai buah yang digunakan sebagai sampel mulai dari pangkal tempat melekatnya buah hingga ke ujung yang melekat di batang.

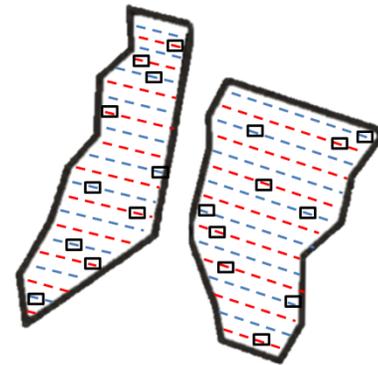
3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengambilan sampel

Sampel buah dan tangkai buah dari hanjeli ketan dan hanjeli batok diperoleh pada waktu panen Maret 2023 di lahan budidaya Desa Wisata Hanjeli (Gambar 3.2). Dalam penelitian ini, pengambilan sampel hanya dilakukan pada lahan yang ditanami hanjeli ketan dan hanjeli batok yang siap panen. Teknik pengambilan sampel dilakukan berdasarkan teknik *cluster random sampling*, dipilih dua kluster dengan masing-masing luas kluster A 300 m² dan kluster B 400 m² (Gambar 3.3). Dari dua kluster tersebut, diambil sampel 10 tanaman setiap kultivar secara acak menggunakan undian (Gambar 3.5).



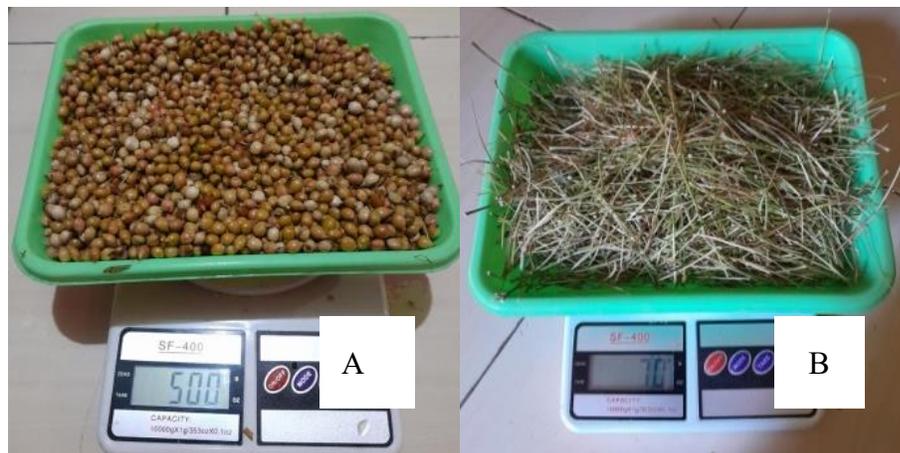
Gambar 3.2 Lahan budidaya Desa Wisata Hanjeli



Keterangan:
 --- Hanjeli ketan
 --- Hanjeli batok

Gambar 3.3 Kluster pengambilan sampel Gambar 3.4 Ilustrasi sebaran sampel

Sampel yang diambil hanya tanaman hanjeli yang sudah siap panen saja. Menurut Kornelus (2009) tanaman hanjeli yang sudah siap panen ditandai dengan kondisi biji telah mencapai masak fisiologis, yaitu hilangnya cairan dan berganti tepung saat biji dihancurkan dengan jari. Seluruh sampel dikumpulkan, buah mencapai berat basah 500 gram sedangkan tangkai buah mencapai berat basah 70 gram (Gambar 3.5).



Gambar 3. 5 Penimbangan basah (a) buah, dan (b) tangkai buah

3.4.2 Pengukuran Abiotik

Pengukuran faktor abiotik dilakukan pada saat pengambilan sampel. Faktor abiotik yang diukur meliputi faktor fisiografis, klimatik dan faktor edafik dari tanah

Frita Annisa Reina Azis, 2023

PROFIL METABOLIT DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BUAH DAN TANGKAI BUAH HANJELI (*Coix lacryma-Jobi L.*) DI SUKABUMI

UNIVERSITAS PENDIDIKAN INDONESIA | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

yang menjadi tempat tumbuhnya hanjeli. Faktor fisiografis yang diukur adalah ketinggian. Faktor klimatik meliputi suhu udara, kelembaban udara, dan tekanan udara di titik pengambilan sampel. Faktor edafik meliputi suhu tanah, pH tanah, dan kandungan senyawa organik dalam tanah. Ketinggian dan tekanan udara diukur menggunakan altimeter (Gambar 3.6). Suhu dan kelembaban udara diukur menggunakan termohigrometer. Suhu tanah diukur menggunakan termometer (Gambar 3.7) dan pH tanah diukur menggunakan soil tester (Gambar 3.8). Kandungan organik dalam tanah dianalisis menggunakan metode uji Materi Organik Tanah (MOT) *Walkey-Black* (Gambar 3.9).



Gambar 3.6 Altimeter



Gambar 3.7 Termometer



Gambar 3.8 Soil tester



Gambar 3.9 Hasil titrasi uji MOT

3.4.3 Ekstraksi

Sampel yang telah terkumpul dibersihkan secara manual untuk menghilangkan bahan asing dan bagian-bagian yang tidak perlu, kemudian dilakukan pengeringan. Pengeringan sebelum proses ekstraksi bertujuan untuk mengurangi kadar air dalam sampel dan mencegah berkembangnya jamur. Sampel buah dan tangkai buah hanjeli sudah cukup kering saat memasuki usia panen, sehingga proses pengeringannya cukup dilakukan dengan cara diangin-anginkan selama 3 hari. Sampel yang sudah kering dihaluskan menggunakan *blender* (Gambar 3.10). Serbuk simplisia diayak dengan menggunakan pengayak 100 mesh dan disimpan dalam wadah.



Gambar 3.10 Penghalusan sampel

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi didasari penelitian yang dilakukan oleh Senja dkk., (2014) dengan modifikasi. Serbuk kering simplisia sebanyak 20 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer, lalu ditambah 200 mL pelarut etanol 70% p.a. Larutan diaduk kemudian didiamkan selama 3 x 24 jam dalam suhu ruang (Gambar 3.11). Residu dan filtrat dipisahkan dengan cara yang didasari penelitian Bintoro dkk. (2017), yaitu disaring menggunakan kertas saring *Whatman* No. 1 kemudian ampas ditambah pelarut etanol 70% p.a sebanyak 50 ml di-*shaker* selama 5 menit, lalu disaring dengan kertas saring *Whatman* No 1 dan menghasilkan filtrat II. Filtrat I dan II dicampur dan disaring dengan kertas saring *Whatman* No. 1. Ekstrak yang diperoleh dimasukkan ke dalam *waterbath shaker* dengan suhu 60°C untuk dihilangkan pelarut yang terdapat dalam ekstrak sehingga didapatkan ekstrak kental.

Frita Annisa Reina Azis, 2023

PROFIL METABOLIT DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BUAH DAN TANGKAI BUAH HANJELI (*Coix lacryma-Jobi L.*) DI SUKABUMI

UNIVERSITAS PENDIDIKAN INDONESIA | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Metode penguapan ini didasari oleh penelitian Azzahra (2019). Ekstrak kental yang diperoleh dimasukkan ke dalam botol sampel kemudian ditambahkan 1 ml etanol p.a untuk memudahkan injeksi pada alat GC-MS (Gambar 3.12).



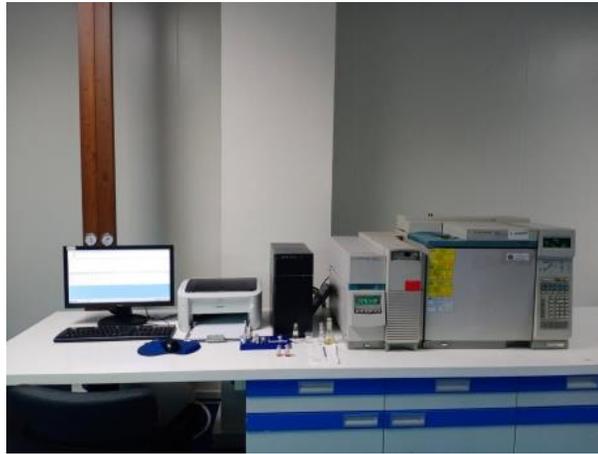
Gambar 3.11 Proses *shaker* dan maserasi Gambar 3.12 Sampel untuk diinjeksikan

3.4.4 Analisis Metabolit

Analisis metabolit dilakukan menggunakan alat GC-MS (Gambar 3.13) dengan spesifikasi AGILENT 5973. Spesifikasi inlet menggunakan tipe split dengan rasio split 20:1 dan tipe gasnya adalah gas helium. Spesifikasi kolom yaitu bertipe Agilent 19091s-433 HP-5MS ultra Inert (5% Phenyl Methyl Siloxane), panjang kolom 30 m, ketebalan kolom 0,25 μm , dan diameter kolom 250 μm (30 m x 250 μm x 0.25 μm). Sampel sebanyak 1 μL yang telah diencerkan dengan etanol p.a diinjeksikan pada GC-MS. Suhu GC-MS yang digunakan berada pada kisaran 60°C-450°C dengan waktu kesetimbangan 0,50 menit.

Analisis pada GC MS ini akan menampilkan data grafik yang menunjukkan jenis dan intensitas *peak* yang menunjukkan kadar metabolit. Data hasil GC-MS ini dilihat kemiripannya (*similarity index*) dengan data yang ada di pustaka *National Institute of Standards and Technology* (NIST) dan *Pubchem National Center for biotechnology information* (NCBI). Hasil kromatogram dan spektrum massa dari proses GC-MS diidentifikasi menggunakan perangkat lunak WILLEY⁰⁹ TH. Data

yang telah diolah, disajikan dendalam bentuk tabel, diagram venn, dan *heatmap* yang dibuat menggunakan *Microsoft Excel* 2019.



Gambar 3.13 Perangkat GC-MS
(Komunikasi Pribadi, 2023)

3.4.5 Uji Aktivitas Antioksidan

Dalam melakukan uji aktivitas antioksidan, metode yang digunakan adalah 1,1- difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Uji ini dilakukan di Pusat Penelitian *Basic* Universitas Padjajaran. Metode uji DPPH yang dilakukan menyesuaikan metode yang digunakan di tempat pengujian.

3.4.5.1 Pembuatan Larutan DPPH

Persiapan yang pertama dilakukan adalah membuat larutan DPPH 0,4 mM dalam metanol. Padatan DPPH (Mr: 394,32 gram/mol) sebanyak 1 mg ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam vial 10 mL. Padatan DPPH dilarutkan dengan metanol hingga volume mencapai 6,25 mL. Larutan DPPH yang telah dibuat kemudian dimasukkan ke dalam botol gelap untuk menghindari kerusakan akibat cahaya. Cara penyimpanan larutan ini didasari penelitian Hamzah dkk. (2014).

3.4.5.2 Pembuatan Larutan Kontrol

Larutan kontrol yang digunakan adalah metanol yang ditambahkan DPPH tanpa sampel. Larutan kontrol dibuat dengan 0,2 ml larutan DPPH (0.4 mM) ditambahkan metanol sebanyak 0,8 ml, sehingga volume larutan menjadi 1 ml.

Frita Annisa Reina Azis, 2023

PROFIL METABOLIT DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BUAH DAN TANGKAI BUAH HANJELI (*Coix lacryma-Jobi L.*) DI SUKABUMI

UNIVERSITAS PENDIDIKAN INDONESIA | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Larutan kemudian dihomogenkan dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi. Seluruh permukaan tabung reaksi ditutup menggunakan aluminium foil agar tidak tembus cahaya karena DPPH sensitif terhadap cahaya. Larutan kontrol diinkubasi dalam ruangan gelap selama 30 menit.

3.4.5.3 Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Buah dan Tangkai Buah Hanjeli

Pembuatan larutan stok dilakukan untuk menyediakan cadangan sehingga menghindari pengulangan penimbangan pada sampel saat akan dilakukan uji DPPH. Sampel hasil dari ekstraksi buah dan tangkai buah hanjeli ditimbang sekitar 20 mg. Untuk menimbang ekstrak pasta secara akurat sangat sulit dilakukan sehingga dalam penelitian ini ekstrak buah dan tangkai buah yang digunakan secara berturut-turut adalah 19,5 mg dan 20,4 mg. Ekstrak yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* 10 mL, kemudian ditambahkan 5 mL metanol dan dihomogenkan. Jika sampel sulit larut maka digunakan *ultrasonic homogenizer* (Gambar 3.14).



Gambar 3.14 *Ultrasonic homogenizer*

Pada setiap sampel dilakukan lima kali pengenceran dengan deret angka pengenceran yang berbeda. Hal ini karena setiap sampel memiliki karakteristik berbeda yang dapat mempengaruhi nilai absorbansinya, sehingga memungkinkan dalam konsentrasi pengenceran yang sama, salah satunya menunjukkan nilai absorbansi lebih dari 1,0 dan itu tidak dapat digunakan. Sesuai dengan hukum Beer dan praktek normal dalam spektrofotometri, konsentrasi awal DPPH harus dipilih untuk memberikan nilai absorbansi kurang dari 1, artinya intensitas cahaya yang

direduksi saat melewati sampel tidak boleh lebih dari sepuluh kali lipat (Pekal dan Pyrzynska, 2012). Setelah melewati beberapa percobaan, didapatkan deret pengenceran buah hanjeli batok adalah 514 ppm, 770 ppm, 1027 ppm, 1284 ppm, dan 1541 ppm. Tangkai hanjeli batok menggunakan pengenceran 65 ppm, 162 ppm, 260 ppm, 357 ppm, dan 455 ppm.

Untuk melakukan pengukuran absorbansi, larutan DPPH, sampel, dan metanol dihomogenkan hingga 1 ml. Setiap sampel menggunakan perbandingan volume metanol dan sampel yang berbeda untuk mendapat deret nilai absorbansi terbaik, sementara nilai larutan dpph semua sama yaitu sebanyak 0.2 ml. Pada ekstrak buah hanjeli, volume sampel yang digunakan adalah 0.2 ml, 0.3 ml, 0.4 ml, 0.5 ml, dan 0.6 ml. Pada ekstrak tangkai buah hanjeli, volume yang digunakan adalah 0.08 ml, 0.2 ml, 0.32 ml, 0.44 ml, 0.56 ml. Seluruh permukaan tabung reaksi ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi dalam ruangan gelap selama 30 menit (Molyneux, 2004).

3.4.5.4 Pengukuran Nilai Absorbansi

Pengukuran nilai absorbansi dilakukan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (Gambar 3.15) dengan λ 515 nm sebagai absorbansi kontrol dalam pengujian ini. Spektrofotometer yang digunakan sebelumnya dikalibrasi menggunakan larutan metanol. Larutan kontrol dan larutan stok yang telah diinkubasi di ruang gelap selanjutnya diukur nilai absorbansinya.



Gambar 3.15 Spektrofotometer UV Vis

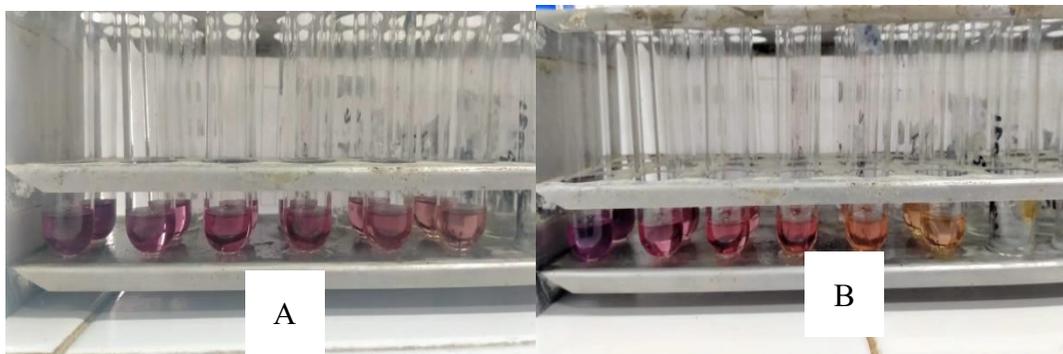
Frita Annisa Reina Azis, 2023

PROFIL METABOLIT DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BUAH DAN TANGKAI BUAH HANJELI (Coix lacryma-Jobi L.) DI SUKABUMI

UNIVERSITAS PENDIDIKAN INDONESIA | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

3.4.5.5 Penentuan Nilai Aktivitas Antioksidan

Indikator fisik adanya aktivitas antioksidan larutan dapat dilihat dari perubahan warna larutan dari warna violet yang kemudian akan berkurang intensitasnya setelah proses inkubasi menjadi warna kuning pucat (Gambar 3.16 dan 3.17). Pengurangan intensitas warna ini sebanding dengan jumlah radikal bebas DPPH yang ditangkap oleh senyawa antioksidan. Persentase berkurangnya intensitas warna DPPH sebanding dengan aktivitas antioksidan yang dilakukan. Semakin tinggi pengurangan warna yang dihasilkan maka dapat diartikan aktivitas antioksidan semakin tinggi.



Gambar 3.16 Ekstrak buah hanjeli batok (a) sebelum dan (b) sesudah inkubasi (Komunikasi Pribadi, 2023)



Gambar 3.17 Ekstrak tangkai buah hanjeli batok (a) sebelum dan (b) sesudah inkubasi (Komunikasi Pribadi, 2023)

Parameter yang digunakan untuk aktivitas antioksidan dengan metode penangkapan radikal DPPH ini adalah IC_{50} yakni konsentrasi senyawa uji yang

Frita Annisa Reina Azis, 2023

PROFIL METABOLIT DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BUAH DAN TANGKAI BUAH HANJELI (Coix lacryma-Jobi L.) DI SUKABUMI

UNIVERSITAS PENDIDIKAN INDONESIA | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

dibutuhkan untuk mengurangi radikal DPPH sebesar 50%. Nilai IC_{50} diperoleh dari suatu persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi senyawa uji dengan persen aktivitas antioksidan (Zou, dkk., 2004). Nilai IC_{50} dapat dihitung dengan mengetahui persen penghambatan (inhibisi) dari pengujian yang dilakukan. Persen penghambatan dapat dihitung dengan menggunakan persamaan (Oentarini, dkk., 2011). Perhitungan persen aktivitas antioksidan DPPH digunakan rumus sebagai berikut:

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

A blanko = serapan radikal DPPH 0,4 mM

A sampel = serapan radikal DPPH 0,4 mM setelah diberi perlakuan

Nilai seluruh konsentrasi sampel ekstrak dan persen penghambatan yang diperoleh kemudian dibuat kurva regresi linear sehingga diperoleh persamaan :

$$Y = a + bx$$

Keterangan :

Y: variabel terikat (persentase penangkapan radikal = 50)

X: variabel bebas (Nilai IC_{50})

a: intersep

b: kemiringan/*slope*

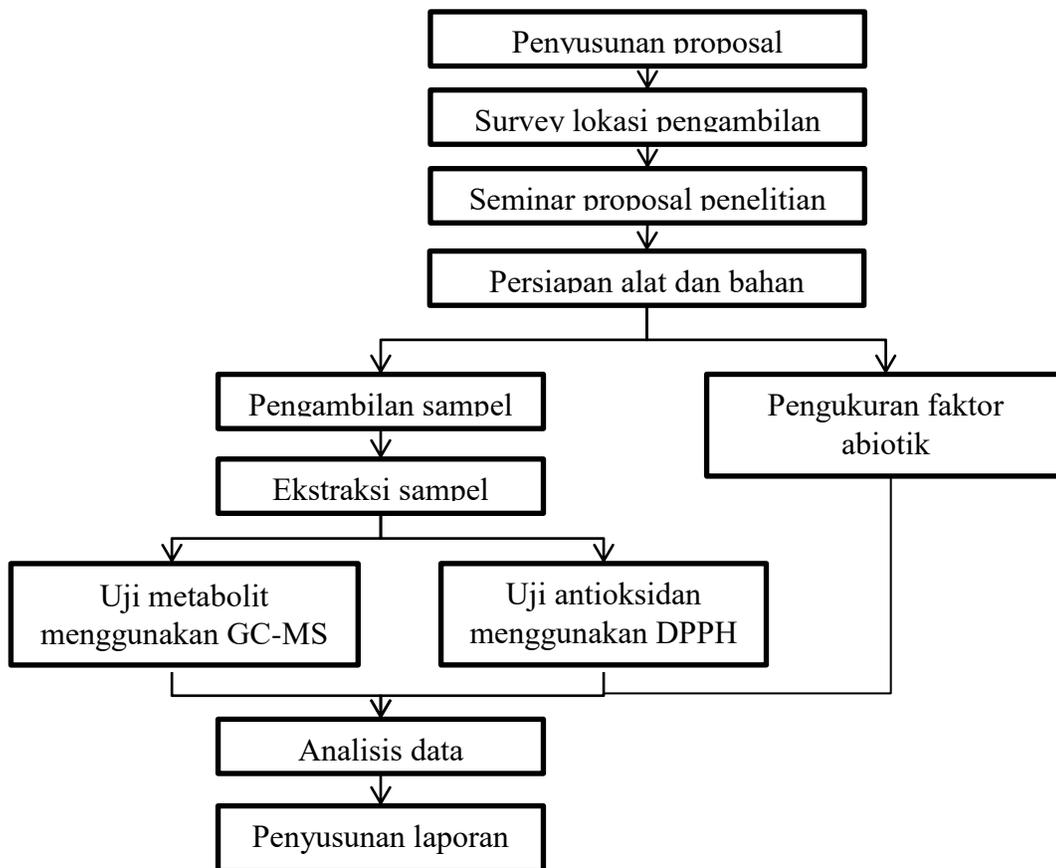
Persamaan regresi linear dapat digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} (X) dengan cara memasukkan angka 50 sebagai Y, sehingga diperoleh rumus untuk mencari IC_{50} adalah sebagai berikut:

$$IC_{50} = \frac{(50 - \text{intersep})}{\text{Slope}}$$

Dalam penelitian ini, pembuatan kurva regresi linear dilakukan menggunakan perangkat lunak *Microsoft Excel* 2019. Perangkat ini dapat membantu perhitungan dan menampilkan hasil kurva secara otomatis.

3.5 Alur Penelitian

Alur penelitian dilaksanakan berdasarkan Gambar 3.19 sebagai berikut.



Gambar 3.18 Alur penelitian