

BAB IV. METODE PENELITIAN

Penelitian dibagi menjadi 2 tahap, tahap pertama adalah penelitian koleksi eksploratif, dan tahap kedua adalah penelitian eksperimental elisitasi nutrisi mikro yang paling dominan di rumah kaca.

4.1. Penelitian Tahap 1 : Hubungan Faktor Lingkungan dan Nutrisi Dalam Tanah Dengan Kandungan Diosgenin Rimpang *Costus speciosus* Alami

4.1.1. Rancangan penelitian yang digunakan

Penelitian berbentuk observasi korelasional yang dilakukan dengan cara koleksi eksploratif, untuk melihat hubungan antara faktor-faktor yang berpengaruh terhadap kandungan diosgenin rimpang tanaman *Costus speciosus* yang tumbuh secara alami.

Data lapangan yang diamati meliputi 3 parameter, yaitu lingkungan, nutrisi tanah dan biomassa tanaman. Data lingkungan (suhu mikro, kelembaban relatif mikro dan ketinggian tempat), data nutrisi tanah terdiri dari kandungan nutrisi mikro tersedia (Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} dan Zn^{2+}), sifat-sifat tanah (pH, tekstur, kapasitas tukar kation, kejenuhan basa), bahan organik (N, P dan C-organik), serta nutrisi makro non-organik (K^+ , Ca^{2+} dan Mg^{2+}). Data biomassa tanaman yang diambil meliputi luas daun, biomassa tanaman yang terdiri dari bobot kering (bk) daun, bk batang, bk rimpang, bk akar, total biomassa tanaman, kadar diosgenin dan total diosgenin pada rimpang *Costus speciosus* serta kadar nutrisi mikro pada daun yaitu Al^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} dan Zn^{2+} .

Data yang diperoleh selanjutnya dilakukan analisis untuk mengetahui variabel yang berpengaruh terhadap kandungan diosgenin rimpang tanaman *Costus speciosus* yang tumbuh alami, selanjutnya variabel yang dominan digunakan sebagai acuan dalam penelitian tahap 2.

4.1.2. Populasi dan besar contoh

Contoh yang digunakan berasal dari 31 lokasi dengan ulangan 3 kali, jumlah lokasi tersebut dengan pertimbangan bahwa kandungan nutrisi mikro pada tanah telah berada pada tingkat kurang hingga berlebihan, sehingga dapat digunakan sebagai acuan untuk menetapkan nutrisi mikro tersebut telah menyebabkan keracunan pada tanaman *Costus speciosus* alami.

Contoh tanaman *Costus speciosus* diambil satu rumpun (*cluster*) sedangkan contoh tanah tempat tumbuh tanaman diambil sebanyak 20 kg. Total contoh tanaman berjumlah 93 rumpun dan tanah sebanyak 93 karung (@ 20 kg).

4.1.3. Variabel penelitian

Variabel bebas yang diamati pada tanah meliputi nutrisi makro (N, P, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, C-organik dan nisbah C/N), nutrisi mikro (Al³⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺ dan Zn²⁺), serta karakteristik tanah yang terdiri dari kapasitas tukar kation (KTK), kejenuhan basa, jumlah basa dan pH tanah. Sedangkan variabel bebas pada tanaman meliputi luas daun, biomassa tanaman (yang terdiri dari bobot kering (bk) daun, bk batang, bk rimpang, bk akar dan total biomassa), serta kadar nutrisi mikro pada daun (Al³⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺ dan Zn²⁺).

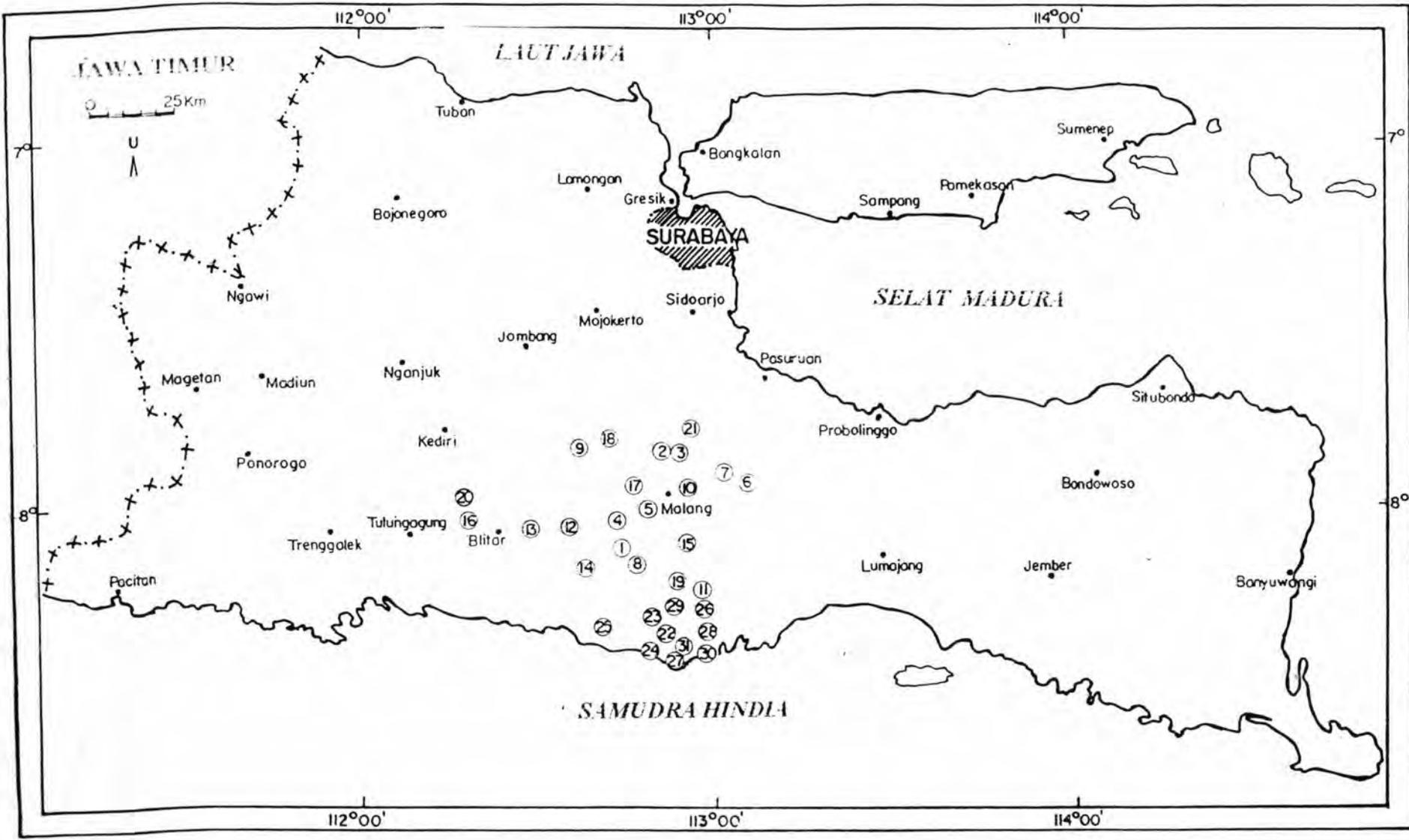
Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kandungan diosgenin yang terdiri dari kadar diosgenin dan total diosgenin pada rimpang tanaman *Costus speciosus*. Kadar diosgenin mencerminkan konsentrasi diosgenin pada matriks rimpang, sedangkan total diosgenin mencerminkan produktivitas diosgenin pada masing-masing tanaman.

4.1.4. Bahan

Bahan penelitian berupa tanah tempat tumbuh dan tanaman *Costus speciosus* yang tumbuh alami (untuk penyeragaman tanaman digunakan ketentuan jumlah batang 4-5 tiap rumpun dan tinggi tanaman 75 cm hingga 150 cm), diambil di wilayah Kabupaten Malang, Pasuruan, Blitar dan Kediri. Untuk dataran rendah (<200 m dpl) diambil dari kecamatan Sumbermanjing Wetan, Sumbermanjing Kulon dan Donomulyo wilayah kabupaten Malang. Dataran sedang (200-500 m dpl) diambil dari wilayah kecamatan Purwodadi (Pasuruan), Wagir, Kepanjen, Pakisaji, Gondanglegi, Bantur (Malang), kecamatan Garum, Kesamben dan Wlingi (Blitar) serta kecamatan Kandat (Kediri). - Dataran tinggi (>500 m dpl) diwakili oleh daerah kecamatan Kromengan, Ngajum, Lawang, Ngantang, Singosari, Batu, Pujon wilayah kabupaten Malang dan kecamatan Nongkojajar kabupaten Pasuruan. Peta lokasi pengambilan contoh disajikan pada Gambar 4.1

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian dengan spesifikasi seperti disajikan pada Tabel 4.1.

Gambar 4.1. Peta lokasi pengambilan contoh tanaman *Costus speciosus* alami



Tabel 4.1. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian

Nomer	Nama bahan	Merek
1.	Plat TLC	Merck
2.	Kloroform	Riedel de Hein
3.	HCl	Merck
4.	NaOH	Merck
5.	n-Heksan	Merck
6.	Etil asetat	Merck
7.	Asam sulfat	Merck
8.	Anisaldehyda	Merck

4.1.5. Peralatan penelitian

Peralatan yang digunakan dalam percobaan dengan rincian seperti pada Tabel 4.2.

4.1.6. Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di beberapa laboratorium yang terdiri dari :

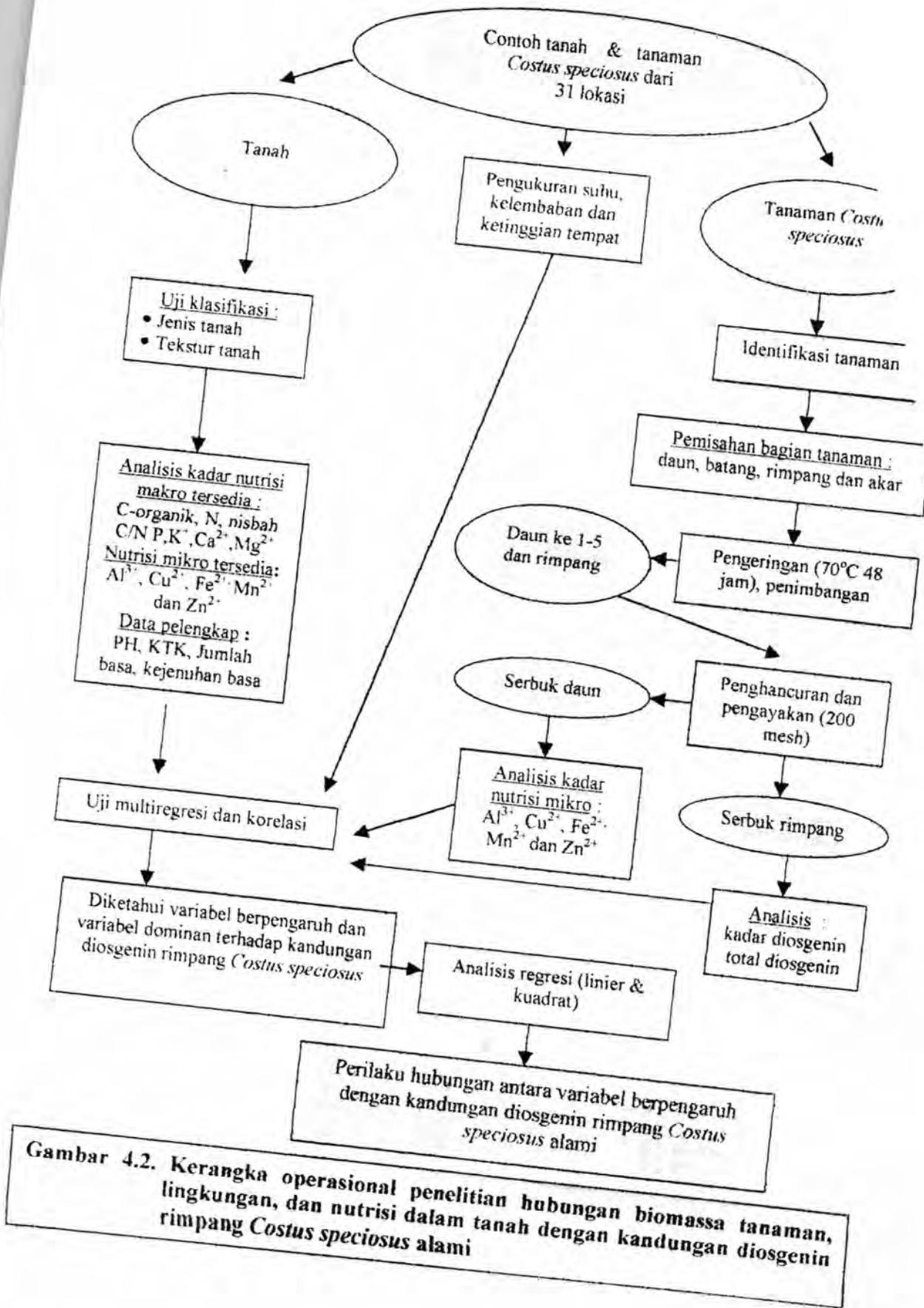
- a>. Lab. Kimia dan Fisika Tanah, Jurusan Ilmu Tanah, Fakultas Pertanian Univ. Brawijaya (bahan organik, KTK, kandungan basa, kelas dan tekstur tanah);
- b>. Lab. Penginderaan Jarak Jauh, Jurusan Ilmu Tanah, Fakultas Pertanian, Univ. Brawijaya (data ketinggian tempat dan gambar lokasi pengambilan contoh);
- c>. Lab. Kimia, Fakultas MIPA, Univ. Brawijaya (kandungan nutrisi mikro pada tanah dan daun);
- d>. Lab. Klimatologi, Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya (analisis luas daun);

- e>. Lab. Rekayasa Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya (analisis biomassa tanaman);
- f> Lab. Sentral Ilmu dan Teknologi Pangan, Universitas Brawijaya (ekstraksi diosgenin);
- g>. Lab. Bioteknologi Farmasi, Fak. Farmasi Univ. Airlangga (preparasi analisis dengan densitometer);
- h>. Lab. Dasar Bersama Univ. Airlangga (analisis diosgenin dengan densitometer).
- i>. Balai Materia Medica Batu, Malang (identifikasi tanaman *Costus speciosus*).

Tabel 4.2. Jenis dan tipe peralatan yang digunakan dalam penelitian

Nama peralatan	Merek	Tipe
Timbangan mikro analitis	Ohaus	AS 120
Oven (pengukuran kadar air)	Heraeus	T 6
Pengukur luas daun	Li-Cor	LI-3100
<i>Atomic Absorption Spectroscopy</i>	Philip	PU 9100 X
<i>Densitometer</i>	Shimadzu	CS-930
<i>Shaker</i> (pengocok)	Thermolyne	16700 Linier
<i>Vortex</i>	Janke & Kunkel	Vibrofix UF ₁
Sentrifus	Heraeus	Labofug 200
Waring blender	National	-
<i>Flame photometer</i>	Corning	400
Leaf area meter	LI-COR	3100

Penelitian dilakukan mulai bulan Juni 1995 sampai dengan bulan Desember 1995, kerangka operasional penelitian secara rinci dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2. Kerangka operasional penelitian hubungan biomassa tanaman, lingkungan, dan nutrisi dalam tanah dengan kandungan diosgenin rimpang *Costus speciosus* alami

4.1.7. Prosedur pengumpulan data

a. Identifikasi tanaman

Tanaman *Costus speciosus* alami yang diperoleh dari berbagai lokasi dipisahkan dari kotoran bahan asing, bagian pangkal dicuci dengan air bersih dan diangin-anginkan sampai air menguap. Tanaman selanjutnya dilakukan identifikasi di Balai Materia Medica Batu, Malang untuk memastikan bahwa contoh yang diambil adalah *Costus speciosus* (Koen.) Smith dengan menggunakan dasar taksonomi buku Flora of Java oleh Backer dan Brink (1968). Contoh tanaman *Costus speciosus* seperti disajikan pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3. Tanaman *Costus speciosus*

b. Preparasi tanaman

Setelah tanaman diidentifikasi, selanjutnya bagian tanaman dipotong-potong sehingga terpisah antara bagian daun, batang, rimpang dan akar. Selanjutnya dilakukan pengukuran terhadap luas daun dan bobot basah daun, batang, rimpang, dan akar, tahap selanjutnya bagian tanaman dikeringkan pada suhu 70-80 °C selama 48 jam dan setelah didinginkan pada desikator ditimbang. Daun ke 1 sampai 5, serta rimpang dilakukan penepungan dengan *waring blender* sampai lolos ayak 200 mesh, bahan disimpan dalam plastik polietilena (PE) menunggu proses analisis. Analisis daun meliputi kadar nutrisi mikro (Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} dan Zn^{2+}), luas daun, bobot kering daun, bk. batang, bk. rimpang, bk. akar dan total biomassa, sedangkan pada rimpang *Costus speciosus* dilakukan analisis terhadap kandungan diosgenin.

b. Preparasi contoh tanah

Untuk tanah berat dan tanah berkerikil ringan, dilakukan dengan metoda basah. Sejumlah tanah direndam dalam air suling selama semalam dalam silinder (diameter 8,5 cm dan tinggi 25 cm). Setelah perendaman, tanah diremas-remas dengan air, dipisahkan sedikit demi sedikit ke bejana plastik melalui pengayak diameter 2 mm. Tanah hasil pengayakan dicampur dengan pengadukan berulang-ulang, selanjutnya dilakukan pengeringan pada penangas air dan setelah kering dianginkan di tempat teduh. Kecuali untuk analisis elemen karbon dan nitrogen diperlukan contoh dengan ukuran partikel <0,5 mm.

Tanah yang telah kering udara dihaluskan dengan alu kayu dan porselin, kemudian ditimbang untuk mengetahui persentase tanah dan kerikil.

Bahan disimpan, setiap akan dilakukan analisis dilakukan pengadukan hingga merata.

Untuk tanah yang gembur dilakukan dengan metode kering, sebelum tanah ditumbuk, bongkahan tanah dihancurkan dengan tangan dalam lumpang porselin. Kemudian tanah dihaluskan perlahan-lahan dengan alu kayu dan diayak dengan pengayak berlubang bundar 2 mm. Sisa tanah yang tidak lolos saringan dihaluskan lagi dengan pemerasan, selanjutnya dilakukan pengayakan ulang. Sisa akhir yang tidak lolos ayak dinyatakan sebagai jumlah kerikil. Fraksi yang lolos ayak 2 mm dicampurkan dan dimasukkan ke dalam botol contoh, untuk analisis selanjutnya.

d. Metode analisis

📄 Validasi Metode Analisis Kuantitatif

Sebelum dilakukan analisis terhadap contoh percobaan terlebih dahulu dilakukan validasi metode yang digunakan untuk analisis kuantitatif. Validasi metode diperlukan agar analisis kimia yang dilakukan memberikan hasil yang mendekati kebenaran (Indrayanto, 1994). Dalam penelitian ini metode validasi dilakukan pada analisis kuantitatif kadar kation logam dengan metoda AAS (*Atomic absorption spectroscopy*).

Parameter yang diuji dalam validasi metode biasanya meliputi selektivitas, linieritas, limit deteksi, limit kuantitasi, akurasi, presisi, stabilitas sistem dan *ruggedness* atau ketidakrataan (Sumadi, 1991 dan Indrayanto, 1994). Dalam penelitian ini parameter yang diuji meliputi selektivitas, linieritas dan akurasi.

▣ Selektivitas

Uji selektivitas dilakukan untuk memperoleh nilai analisa yang baik pada penggunaan kromatografi maupun AAS. Pada analisis kadar diosgenin dengan menggunakan metoda densitometri dilakukan pemeriksaan panjang gelombang 270-700 nm dan hasilnya dibandingkan dengan standar diosgenin yang serapannya pada 430 nm.

Untuk analisis kation logam dengan menggunakan metoda AAS, pemeriksaan spektrumnya pada panjang gelombang 190-700 nm dan hasilnya dibandingkan dengan standar. Untuk Al^{3+} pada 309,3 nm, Cu^{2+} 324,7 nm, Zn^{2+} pada 213,9 nm, Fe^{2+} 248,3 nm dan Mn^{2+} 279,5 nm (Pecsok *et al.*, 1976). Larutan standar yang digunakan adalah $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ untuk kation Al^{3+} , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ untuk Zn^{2+} , KMnO_4 untuk Mn^{2+} , $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ untuk Fe^{2+} dan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ untuk Cu^{2+} (Sudjadi *et al.*, 1971).

▣ Uji Linieritas

Uji linieritas diperlukan untuk mengetahui kisaran konsentrasi yang memberikan respon linier pada detektor. Untuk analisis diosgenin dengan metoda densitometri, penentuan linieritas dilakukan dengan membuat larutan standar diosgenin 0,03 sampai dengan 0,7 mikrogram per noda dalam plat Silika gel, kemudian ditentukan luas area spektrumnya pada panjang gelombang optimal yaitu 430 nm. Tahap selanjutnya adalah membuat kurva linier luas area dan konsentrasi senyawa diosgenin (mikrogram/noda) atau dengan memasukkan pada program validasi.

Pada analisis kation logam dengan menggunakan AAS, penentuan linieritas dengan larutan standar pada kisaran konsentrasi 0,5-10 ppm untuk

kation Al^{3+} , 0,5-5 ppm untuk Zn^{2+} dan Cu^{2+} , 5-50 ppm untuk Mn^{2+} dan 1-10 ppm untuk Fe^{2+} .

▢ Akurasi

Untuk mengetahui efek atau pengaruh dari matrik bahan selama analisis pada masing-masing metoda yang digunakan dalam analisis kimia, dilakukan perhitungan persentase penemuan kembali dengan dan tanpa penambahan senyawa standar pada konsentrasi tertentu (cara adisi), kemudian respon detektornya ditentukan.

Data hasil pengamatan selanjutnya digunakan untuk membuat kurva hubungan antara x_f (kadar senyawa yang sesungguhnya melalui percobaan/hasil pengamatan) dan x_c (kadar senyawa yang sesungguhnya/teoritis) dengan persamaan regresi linier (Funk et al., 1992) :

$$x_f = a_f + b_f \cdot x_c.$$

Selanjutnya dihitung harga *confidence range* dan a_f (VBaf) dan *confidence range* dari b_f (VBbf). Harga VBbf harus melewati nol dan harga VBaf harus melewati satu.

Hasil pengukuran penemuan kembali matrik contoh tanah untuk kation Al^{3+} sebesar 106,96 persen, Cu^{2+} 103,95 persen, Fe^{2+} 105,25 persen, Mn^{2+} 95,34 persen dan Zn^{2+} 96,27 persen. Nilai penemuan kembali matrik daun tanaman *Costus speciosus* untuk kation Al^{3+} sebesar 107,37 persen, Cu^{2+} 103,00 persen, Fe^{2+} 104,26 persen, Mn^{2+} 98,11 persen dan Zn^{2+} 97,10 persen.

Prosedur Analisis

Kadar diosgenin (Indrayanto et al., 1994)

Irisan rimpang tanaman *Costus speciosus* yang telah dikeringkan selama 24 jam pada suhu 70° C, dihancurkan dengan *waring blender*, selanjutnya dilakukan pengayakan sampai lolos saringan 20 mesh. Serbuk contoh sebanyak 0,9-1,1 g dimasukkan pada Erlenmeyer 50 ml, ditambah dengan 10 ml kloroform ditutup dengan aluminium foil dan dikocok dengan *vortex shaker* selama 10 menit. Ekstrak kloroform disaring dengan kertas saring Whatman 40, filtrat ditampung dalam botol kecil 30 ml. Residu pada kertas saring dimasukkan ke dalam erlenmeyer bersama dengan kertas saring yang digunting kecil-kecil, untuk diekstrak lagi dengan kloroform sampai 3 kali. Filtrat yang diperoleh tersebut merupakan ekstrak komponen sterol.

Residu hasil ekstraksi sterol ditambah dengan HCl 2 N sebanyak 10 ml, erlenmeyer ditutup dengan Aluminium foil dan dihidrolisis selama 2 jam pada suhu 100° C. Setelah dingin dinetralkan dengan NaOH 10 N, selanjutnya ditambah dengan kloroform 10 ml, dikocok pada *vortex shaker*, selanjutnya dimasukkan dalam tabung sentrifus.

Sentrifusi dilakukan pada kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, ekstrak kloroform pada bagian bawah tabung (berwarna jernih) diambil dengan pipet dan ditampung dalam botol kecil (volume 30 ml). Sisa larutan pada tabung sentrifus diekstrak lagi dengan kloroform 2 kali, sehingga total ekstrak kloroform yang mengandung diosgenin berjumlah 30 ml. Larutan diosgenin diuapkan pada suhu ruang sampai kering (sekitar 3 hari).

Botol yang berisi padatan diosgenin ditambah dengan kloroform sebanyak 2 ml, dikocok dengan *vortex*, selanjutnya dibagi menjadi 3 botol kecil (1 ml) masing-masing 0,5 ml. Sisa pada botol 30 ml ditotolkan pada plat

Silika gel (Merck) yang telah diaktivasi untuk orientasi sebanyak 2 noda masing-masing 2 mikro liter, pada plat sama juga ditotolkan larutan diosgenin standar dengan interval 6 konsentrasi mulai dari 0,03 sampai 1,54 $\mu\text{gram/noda}$. Plat KLT selanjutnya dilakukan pengembangan dengan eluen kloroform : etil-asetat (4:1), noda diosgenin contoh dan standar diwarnai dengan menggunakan pewarna anisaldehyd-asam sulfat, selanjutnya dilakukan pemanasan pada suhu 100°C selama 10 menit.

Kuantitas warna noda pada plat selanjutnya ditera secara densitometri dengan menggunakan alat KLT *scanner* (Shimadzu CS-930) pada panjang gelombang 430 nm. Dengan mengetahui persamaan regresi linier antara konsentrasi larutan diosgenin standar dan respon kuantitas warna, dapat diketahui konsentrasi diosgenin pada contoh yang ditotolkan. Linieritas larutan standar yang digunakan pada analisis diosgenin dengan densitometer disajikan pada Lampiran 3 dan 4.

Contoh diosgenin pada 3 botol kecil, selanjutnya dilakukan analisis juga pada hari yang berbeda dengan jalan melarutkan dengan kloroform sebanyak 0,5 ml. Ditotolkan pada plat KLT dan dianalisis seperti di atas. Kadar diosgenin dinyatakan dalam satuan mg/g rimpang (basis kering), sedangkan total diosgenin merupakan hasil kali antara kadar diosgenin dengan bobot kering rimpang pada masing-masing tanaman.

$$\text{Kadar diosgenin} = \frac{\mu\text{g/noda} \times \text{Faktor pengenceran (1.000)}}{\text{Bobot contoh (gram bk)}}$$

Untuk mengetahui rerata kadar diosgenin pada setiap contoh, terlebih dahulu dilakukan rejeksi (pembuangan) data yang nilainya terlalu kecil dan

terlalu besar dengan menggunakan metoda Greenberg, Clesceri dan Eaton (1992) dengan menggunakan rumus :

$$T = (X_h - X_{med})/s \quad \text{dan} \quad T = (X_{med} - X_l)/s$$

Dimana X_h merupakan nilai amatan tertinggi, X_l nilai amatan terendah, X_{med} nilai amatan rerata dan s adalah standar deviasi. Nilai T selanjutnya dibandingkan dengan tabel pada Lampiran 5, jika lebih besar dari nilai tabel data ditolak dan jika lebih kecil data diterima.

▣ Total diosgenin

Total diosgenin merupakan hasil kali antara kadar diosgenin (mg/g) dalam rimpang dengan bobot total rimpang (bk) tiap rumpun (*cluster*) yang dinyatakan dalam satuan mg/rimpang.

$\text{Total diosgenin} = \text{Kadar diosgenin (mg/g)} \times \text{bobot rimpang (g/rimpang atau cluster)}$

▣ Kadar nutrisi mikro daun (Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} dan Zn^{2+}) tanaman *Costus speciosus*

• Ekstraksi (Issac dan Kerber, 1971)

Serbuk contoh daun kering sebanyak 0,9-1 g dibakar dalam tungku pembakar pada suhu $450^{\circ}C$ selama 4 hingga 6 jam. Setelah dingin abu ditetesi dengan 1 ml HCl pekat, selanjutnya setelah dingin diuapkan di atas penangas pada suhu $175^{\circ}C$. Setelah dingin dilarutkan dengan HCl 0,1 N sebanyak 10 ml, cairan disaring dengan kertas saring Whatman no. 42 dan filtrat ditampung dalam botol ukur 100 ml. Cawan dicuci dengan HCl 0,1 N dan disaring lagi,

filtrat dijadikan satu dengan penyaringan pertama. Kertas saring dicuci dengan air bebas ion, hingga volume tampungan mencapai 100 ml.

• **Peneraan kadar logam (AAS)**

Larutan yang diperoleh selanjutnya dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer serapan atom (AAS), dengan kondisi panjang gelombang 248,2 nm untuk Fe^{2+} , 213,4 nm untuk Zn^{2+} , pada 279,5 nm untuk Mn^{2+} , pada 324,7 nm untuk Cu^{2+} dan pada 396,2 nm untuk kation Al^{3+} . Kadar kation logam dalam contoh dapat ditentukan dengan cara kalibrasi pada kurva standar. Konsentrasi larutan standar yang digunakan dengan kadar 0,5-10 ppm untuk kation Al^{3+} , 0,5-5 ppm untuk Zn^{2+} dan Cu^{2+} , 5-50 ppm untuk Mn^{2+} dan 1-10 untuk Fe^{2+} .

❏ **Klasifikasi dan Tekstur Tanah (Sudjadi *et al.*, 1971)**

❏ **Fraksi pasir**

Fraksi pasir dipisahkan dengan cara pengayakan basah, suspensi tanah dituangkan kedalam ayakan 0,05 mm, diaduk dengan karet yang lemas sambil dialiri air suling. Fraksi lolos ayakan yang terdiri dari suspensi debu dan liat ditampung dalam silinder sedimentasi 1 liter. Proses pengayakan selesai setelah air saringan terlihat jernih.

Pasir dipindahkan kedalam pinggan aluminium yang telah diketahui bobotnya. Diuapkan di atas penangas air. Setelah kering dimasukkan ke dalam pengering listrik pada suhu 105°C selama 3 jam, didinginkan ke dalam desikator selama 45 menit dan ditimbang bobotnya sebagai fraksi pasir.

Fraksi pasir dipisahkan lagi dengan 1 set ayakan pemisah pasir yang digoyangkan dengan mesin, masing-masing bagian ditimbang dalam pinggan aluminium yang telah diketahui bobotnya.

▢ Fraksi debu dan liat

Suspensi debu dan liat diencerkan sampai tanda 1 liter dengan air suling, diaduk dengan pengaduk kayu yang digerakkan secara vertikal selama 1 menit dan segera dipipet sebanyak 40 ml suspensi dengan pipet 20 ml. Pemipetan dilakukan 2 kali yaitu pada kedalaman 9 cm dan 11 cm, dan masing-masing suspensi yang dipipet dimasukkan ke dalam piringan aluminium yang telah diketahui bobotnya. Diuapkan di atas penangas air sampai kering dan dilanjutkan selama 3 jam dengan oven pada suhu 105 ° C. Didinginkan dalam desikator selama 45 menit dan ditimbang sebagai fraksi 0,05-0 mm.

Selanjutnya suspensi liat dan debu dikocok lagi selama 1 menit dan pada waktu yang telah ditentukan seperti pada Lampiran 6, dipipet 20 ml pada kedalaman 10 cm, dimasukkan ke dalam piringan aluminium yang telah diketahui bobotnya. Diuap keringkan di atas penangas air dan selanjutnya dikeringkan pada oven dengan suhu 105 ° C. Setelah didinginkan di dalam desikator ditimbang bobotnya sebagai fraksi 0,02-0 mm.

Larutan suspensi dan koloid dikocok lagi selama 1 menit dan dipipet sebanyak 20 ml pada kedalaman 10 cm menurut waktu pemipetan menurut Tabel 3 (Sudjadi *et al.*, 1971). Suspensi yang dipipet dimasukkan ke dalam piringan aluminium yang telah diketahui bobotnya, dikeringkan pada oven suhu 105 ° C. Setelah kering dimasukkan ke dalam desikator dan ditimbang sebagai fraksi 0,005-0 mm.

Setelah dikocok lagi selama 1 menit, pada waktu yang telah ditetapkan pada Tabel 3 (Sudjadi *et al.*, 1971), dipipet 20 ml pada kedalaman 5,2 cm dan dimasukkan ke dalam piringan aluminium yang telah diketahui bobotnya.

Stelah diuapkan pada penangas air dan dikeringkan pada oven suhu 105°C , didinginkan pada desikator, ditimbang bobotnya sebagai fraksi 0,002-0 mm.

Suspensi di dalam silinder sedimentasi dikocok lagi selama 1 menit dan dipipet 20 ml pada kedalaman 2 cm atau 4,2 cm pada waktu yang telah ditetapkan sesuai Tabel 3 (Sudjadi *et al.*, 1971). Suspensi dalam pipet dimasukkan ke dalam piringan yang telah diketahui bobotnya, diuapkan pada penangas air dan dikeringkan pada oven suhu 105°C . Setelah didinginkan pada desikator ditimbang bobotnya sebagai fraksi 0,0005-0 mm.

Blangko dibuat dengan cara mengambil 20 ml cairan dan dimasukkan ke dalam piringan yang telah diketahui bobotnya. Diuapkan pada penangas air dan dikeringkan pada oven 105°C . Selanjutnya didinginkan pada desikator, ditimbang bobotnya sebagai peptisator. Bobot peptisator digunakan sebagai koreksi.

▢ Tekstur tanah

Cara kerja untuk penetapan tekstur tanah dalam 3 fraksi pasir dengan ukuran 2 mm hingga 0,05 mm dengan pengayakan basah, pemipetan fraksi debu dan liat ukuran 0,05-0 mm (pemipetan I) dan pemipetan fraksi liat dengan ukuran partikel 0,002-0 mm (pemipetan IV).

Fraksi pasir merupakan fraksi tanah yang mempunyai ukuran antara 2 mm hingga 0,05 mm. Fraksi debu didefinisikan sebagai fraksi tanah yang mempunyai ukuran partikel antara 0,05 mm hingga 0,002 mm, sedangkan fraksi liat mempunyai ukuran partikel 0,002 hingga 0 mm). Setelah diketahui nilai masing-masing fraksi tanah, tekstur tanah dapat dilihat pada segitiga klasifikasi tekstur tanah.

▢ Kadar karbon organik tanah (Allison, 1971)

Contoh tanah halus sebanyak 250 mg dengan ukuran partikel <0,5 mm dalam labu ukur berukuran 150x25 mm yang telah berisi 500 mg $K_2Cr_2O_7$ halus. Bila kadar C-organik lebih dari 10 persen, maka diambil 100 mg tanah dan 600 mg $K_2Cr_2O_7$. Dengan sebuah gelas ukur dimasukkan 10 ml H_2SO_4 pekat sedemikian hingga bahan yang melekat didinding tabung tercuci. Dipanaskan di atas nyala rendah (2-3 cm), diaduk dengan termometer $350^\circ C$ hingga suhu dalam tabung mencapai $175^\circ C$ (waktu 90 detik). Bila suhu turun sampai $100^\circ C$, isi tabung dibilas ke dalam labu erlenmeyer 300 ml. Isi kurang lebih 150 ml.

Setelah ditambah 5 ml H_3PO_4 85 persen dan 3 tetes difenilamin, dititrasikan dengan Amoniumferosulfat 0,2 N hingga warna berubah dari biru menjadi hijau. Larutan blanko dibuat dari 200 mg $K_2Cr_2O_7$.

$$\begin{aligned} \text{C-organik} &= (\text{ml contoh} - \text{ml blanko}) \times N \text{ KMnO}_4 \times 3 \\ \text{Bahan organik (\%)} &= 1,724 \times \% \text{ C-organik} \end{aligned}$$

▢ Nitrogen total (makro Kjeldahl)

Sebanyak 1 g bahan tanah halus <0,5 mm dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl 100 ml, kemudian ditambah dengan 1 g garam campuran selenium dan 3 ml asam sulfat pekat. Selanjutnya dipanaskan dengan alat destruksi, mula-mula dengan nyala kecil selama 15 menit, kemudian api dibesarkan hingga larutan berwarna jernih.

Pemanasan dilanjutkan selama 15 menit, selanjutnya didinginkan. Setelah dingin ditambah dengan 10 ml air suling dan dipindahkan ke dalam labu penyulingan. Diencerkan dengan air suling sampai volume mencapai 100

ml, ditambah setengah sendok batu didih dan 20 ml NaOH 30 persen. Selanjutnya dilakukan penyulingan, distilat ditampung dengan erlenmeyer yang mengandung 15 ml asam Borak 1 persen dan 3 tetes penunjuk campuran. Penyulingan dihentikan setelah 10 menit, dihitung sejak tetesan pertama. Distilat dititrasi dengan larutan asam sulfat 0,05 N sampai warna mulai menjadi merah.

$$N \text{ total (\%)} = (\text{ml contoh} - \text{ml blangko}) \times N \text{ H}_2\text{SO}_4 \times 1,4$$

☐ **Fosfor (Olsen, 1953)**

Tanah halus (< 2 mm) sebanyak 2,5 gram dimasukkan ke dalam botol kocok. Kemudian ditambahkan dengan 50 ml larutan 0,5 M NaHCO₃ pH 8,5, dikocok selama 2 jam. Disaring dengan kertas saring dan filtrat dtampung dalam erlenmeyer 100 ml.

Sebanyak 5 ml ekstrak NaHCO₃ 0,5 M pH 8,5 ke dalam erlenmeyer 50 ml. Untuk kurva standar dipipet masing-masing 5 ml larutan standar P₂O₅ ke dalam erlenmeyer 50 ml. Ke dalam erlenmeyer ditambahkan dengan 20 ml pereaksi campuran fosfat dan dibiarkan selama 30 menit. Kemudian diukur dengan kolorimeter dengan menggunakan larutan standar dan larutan contoh. Persen transmitansi (T) dibaca pada skala kolorimeter dengan panjang gelombang 693 nm.

☐ **Kation basa Na⁺, K⁺ dan Ca²⁺ (Sudjadi et al., 1971)**

Ekstrak tanah dalam pelarut amonium asetat dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml, diencerkan dengan air bebas ion sampai tanda batas. Larutan

tersebut dipergunakan untuk pengukuran Na^+ , K^+ dan Ca^{2+} . Konsentrasi ketiga basa tersebut diukur dengan *flame photometer* (fotometer nyala) dengan menggunakan gas pembakar asetilen. Kadar dalam filtrat diketahui dengan cara kalibrasi larutan standar yang telah dibuat dengan konsentrasi antara 0 sampai 0,25 mili equivalen. Kadar dalam tanah dikalikan faktor pengenceran dan kalibrasi bobor kering pada pengeringan suhu 105°C . Kadar larutan standar yang digunakan dengan konsentrasi antara 2,0 hingga 25 ppm untuk K^+ dan 5 hingga 50 ppm untuk kation Ca^{2+} .

▢ Kadar kation Mg^{2+} (Sudjadi et al., 1971)

Ekstrak tanah dalam pelarut HCl 25 persen, ditambahkan larutan LaCl_3 yang mengandung 2.000 ppm Lanthanum, selanjutnya dikocok. Diukur pada spektrofotometer serapan atom (AAS) pada panjang gelombang 285,2 nm, dan menggunakan larutan standar sebagai pembanding. Kadar larutan standar yang digunakan dengan konsentrasi antara 2,5 hingga 25 ppm Mg^{2+} .

▣ Kadar nutrisi mikro tersedia (Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} dan Zn^{2+}) pada tanah

• Ekstraksi (Marten, 1956)

Contoh tanah pada tabung sentrifus diekstrak dengan menggunakan HCl 0,1 N untuk tanah asam, untuk tanah basa ditambahkan DTPA-TEA. Tabung ditutup dengan plastik dan selanjutnya dilakukan pengocokan selama 5 menit, tutup tabung dibuka dan dilakukan pemusingan pada kecepatan 2000 rpm selama 5 menit. Cairan jernih disaring dan dimasukkan kedalam labu ukur, kemudian residu ditambah HCl 0,1 N dan diekstrak lagi sebanyak 2

kali. Tampungannya filtrat yang berjumlah 100 ml pada labu ukur selanjutnya dilakukan pengukuran kadar logam dengan spektrofotometer serapan atom

• Peneraan kadar (AAS)

Filtrat yang diperoleh selanjutnya dilakukan pengukuran dengan menggunakan AAS, dengan kondisi panjang gelombang 248,2 nm untuk Fe^{2+} , 213,4 nm untuk Zn^{2+} , pada 279,5 nm untuk Mn^{2+} , pada 324,7 nm untuk Cu^{2+} dan pada 396,2 nm untuk kation Al^{3+} . Kadar kation logam dalam contoh dapat ditentukan dengan cara kalibrasi pada kurva standar. Konsentrasi larutan standar yang digunakan dengan kadar 0,5-10 ppm untuk kation Al^{3+} , 0,5-5 ppm untuk Zn^{2+} dan Cu^{2+} , 5-50 ppm untuk Mn^{2+} dan 1-10 untuk Fe^{2+} . Larutan standar yang digunakan seperti pada pengukuran kadar kation logam pada daun.

▢ Kapasitas tukar kation (Sudjadi *et al.*, 1971)

Contoh tanah dalam tabung diaduk dengan etanol 80 persen, selanjutnya disentrifusi dan didekantasi. Kertas saring yang mengandung sedikit tanah dimasukkan kedalam labu labu destilasi, dengan penambahan air suling. Ditambahkan 3 g serbuk MgO dan segera disambung dengan kondensor untuk dilakukan destilasi. Destilat ditampung dengan asam sulfat 0,1 N dan ditetesi dengan indikator campuran. Setelah destilat mencapai 200 ml, dititrasi dengan NaOH 0,1 N sampai terjadi perubahan warna. Selain perlakuan contoh juga dibuat blangko dengan perlakuan yang sama tetapi tanpa contoh tanah.

$$\text{KTK} = (\text{ml. Blangko} - \text{ml contoh}) \times \text{N NaOH} \times 20$$

dalam satuan miliequivalen/100 g

▣ **Kejenuhan basa (Sudjadi *et al.*, 1971)**

Kejenuhan basa merupakan persentase jumlah antara kation Na^+ , K^+ , Ca^{2+} dan Mg^{2+} dibandingkan dengan kapasitas tukar kation (KTK) dikalikan dengan seratus persen.

$$\text{Kejenuhan basa} = \frac{\text{Total Na}^+, \text{K}^+, \text{Ca}^{++} \text{ dan Mg}^{++}}{\text{KTK}} \times 100 \%$$

▣ **Kadar air (Sudarmadji *et al.*, 1985)**

Menimbang bahan sebanyak 1 hingga 5 gram bahan kedalam botol timbang yang telah diketahui bobotnya. Selanjutnya bahan dikeringkan pada oven suhu $100-105^\circ \text{C}$ selama 5 jam, didinginkan dalam desikator dan ditimbang bobotnya. Bahan dikeringkan lagi selama 30 menit, didinginkan dan ditimbang lagi. Perlakuan ini diulang sampai tercapai bobot konstan dengan ketelitian 0,2 mg. Selisih antara bobot contoh basah dan kering merupakan bobot air pada bahan.

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{Berat awal} - \text{berat akhir}}{\text{Berat awal}} \times 100 \%$$

▣ **pH tanah (Sudjadi, *et al.*, 1971)**

Contoh tanah hasil preparasi sebanyak 0,9-1 g dimasukkan dalam botol kocok, masing-masing contoh disediakan 2 botol. Masing-masing diperlakukan dengan air suling dan larutan KCl 1 N. Botol dikocok dengan

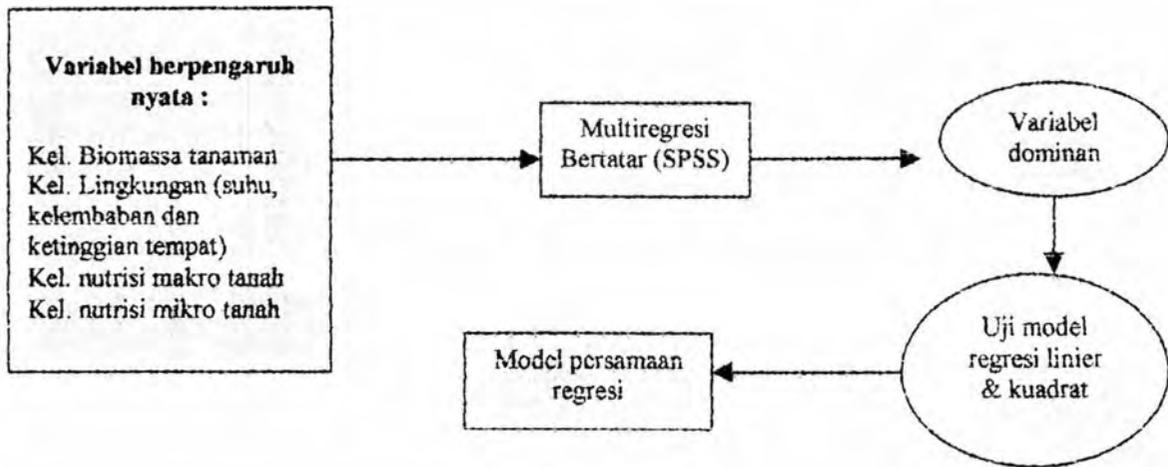
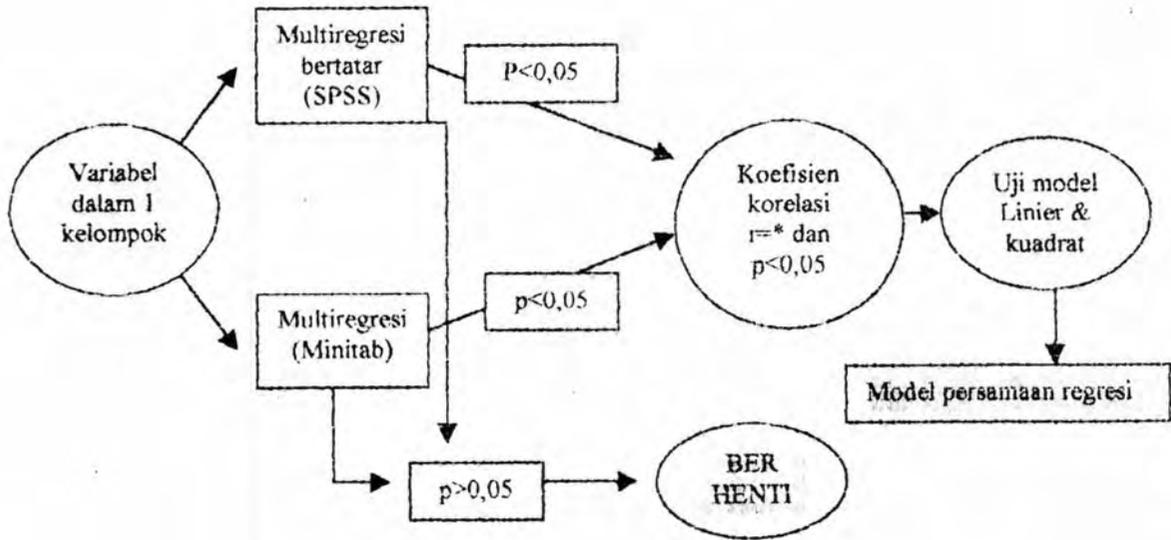
mesin pengocok selama 2 jam dan setelah pengocokan dibiarkan semalam, keesokan harinya dikocok lagi dan diukur pH-nya dengan ,menggunakan pH meter.

4.1.8. Analisis data

Data yang diperoleh baik variabel bebas maupun variabel terikat, selanjutnya dilakukan analisis multiregresi dengan metoda Regresi Bertatar (*Stepwise Regression*) menggunakan program SPSS, serta analisis multiregresi dengan program Minitab. Dalam analisis regresi tersebut digunakan dua tahapan, tahap pertama bertujuan untuk mengetahui variabel yang berpengaruh terhadap kandungan diosgenin pada masing-masing kelompok variabel bebas. Variabel bebas dibagi menjadi 4 kelompok yaitu lingkungan (suhu, kelembaban dan ketinggian tempat); kelompok biomassa tanaman (luas daun, bobot kering daun, bk batang, bk rimpang, bk akar dan total biomassa); kelompok nutrisi makro (C, N, P, nisbah C/N, serta kation basa K^+ , Ca^{2+} dan Mg^{2+}); kelompok nutrisi mikro (kation Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} dan Zn^{2+}) serta nilai KTK, kejenuhan basa dan jumlah basa). Variabel-variabel yang berpengaruh nyata ($p < 0,05$) dan sangat nyata ($p < 0,01$) pada uji Regresi Bertatar (SPSS *release 7.5 for Windows*) dan uji regresi (Minitab *release 8.0 for Windows*), di lakukan pengujian koefisien korelasi, jika mempunyai korelasi nyata atau sangat nyata dilanjutkan dengan uji model regresi linier dan kuadrat.

Tahap kedua bertujuan untuk mengetahui variabel yang dominan pengaruhnya terhadap kandungan diosgenin dari semua variabel bebas. Variabel-variabel pada masing-masing kelompok variabel yang mempunyai

pengaruh nyata dan sangat nyata dengan diosgenin dan total diosgenin, dilakukan analisis Regresi Bertatar dengan program SPSS. Setelah ditemukan variabel yang paling dominan pengaruhnya, dilanjutkan dengan analisis model persamaan regresi linier dan kuadrat Model yang diambil adalah yang mempunyai nilai $p < 0,05$ dan nilai R^2 tertinggi. Diagram alir pengolahan data secara statistik seperti pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4. Kerangka operasional analisis statistik pada penelitian tahap I

4.2. Penelitian Tahap 2 : Pengaruh Kadar Nutrisi Cu^{2+} Yang Ditambahkan Dalam Media Tanah Terhadap Kandungan Diosgenin Rimpang *Costus speciosus*.

4.2.1. Rancangan percobaan

Percobaan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan diulang 10 kali. Perlakuan terdiri dari 7 taraf kadar Cu^{2+} (dalam bentuk $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) yang digunakan sebagai elisitor dalam media tanah dalam pot :

$$a_1 = 0 \text{ ppm (tanpa penambahan } \text{Cu}^{2+}\text{)}$$

$$a_2 = 4 \text{ ppm}$$

$$a_3 = 28 \text{ ppm}$$

$$a_4 = 65 \text{ ppm}$$

$$a_5 = 115 \text{ ppm}$$

$$a_6 = 170 \text{ ppm}$$

$$a_7 = 230 \text{ ppm}$$

Konsentrasi 4 ppm menggunakan dasar kadar Cu^{2+} terendah pada tanah dan 28 ppm merupakan kadar Cu^{2+} tertinggi tanah, sedangkan kadar 65 hingga 230 ppm digunakan sebagai level untuk mengetahui batas penambahan maksimal yang dapat ditolerir oleh tanaman *Costus speciosus* (tanaman tidak mengalami kematian).

4.2.2. Besarnya contoh

Jumlah contoh merupakan banyaknya ulangan yang digunakan untuk tiap perlakuan yaitu sebanyak 10 tanaman. Masing-masing ulangan tanaman

Costus speciosus ditanam dalam pot, yang berisi media tanah sebanyak 3 kg. Total tanaman yang ditanam dalam pot sebanyak 70.

4.2.3. Variabel penelitian

Variabel bebas yang diamati adalah kadar tembaga yang ditambahkan dalam media tanah, variabel terkendali meliputi luas daun, luas daun spesifik, biomassa tanaman (bobot kering daun, bobot batang, bobot kering rimpang, bobot kering akar dan total biomassa), kadar diosgenin pada rimpang dan total diosgenin yang menunjukkan produktivitas tanaman *Costus speciosus*.

4.2.4. Bahan penelitian

Bahan percobaan berupa rimpang *Costus speciosus* dengan diameter antara 1,5-2 cm diperoleh dari Desa Sepanjang, Kec. Turen, Kab. Malang, gambaran ukuran rimpang yang digunakan seperti pada Gambar 4.5.

4.2.5. Alat dan instrumen penelitian

Peralatan penelitian dan peralatan analisis yang digunakan pada penelitian 2 seperti yang digunakan pada penelitian tahap 1.

4.2.6. Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian eksperimental di rumah kaca dilakukan di Balai Latihan Instruktur Pertanian (BLIP) Wonojati, Singosari, Malang, sedangkan laboratorium yang digunakan untuk keperluan analisis seperti pada penelitian 1. Waktu penelitian dimulai pada bulan Juli 1996 sampai dengan bulan Mei 1997, kerangka operasional penelitian seperti pada Gambar 4.6.

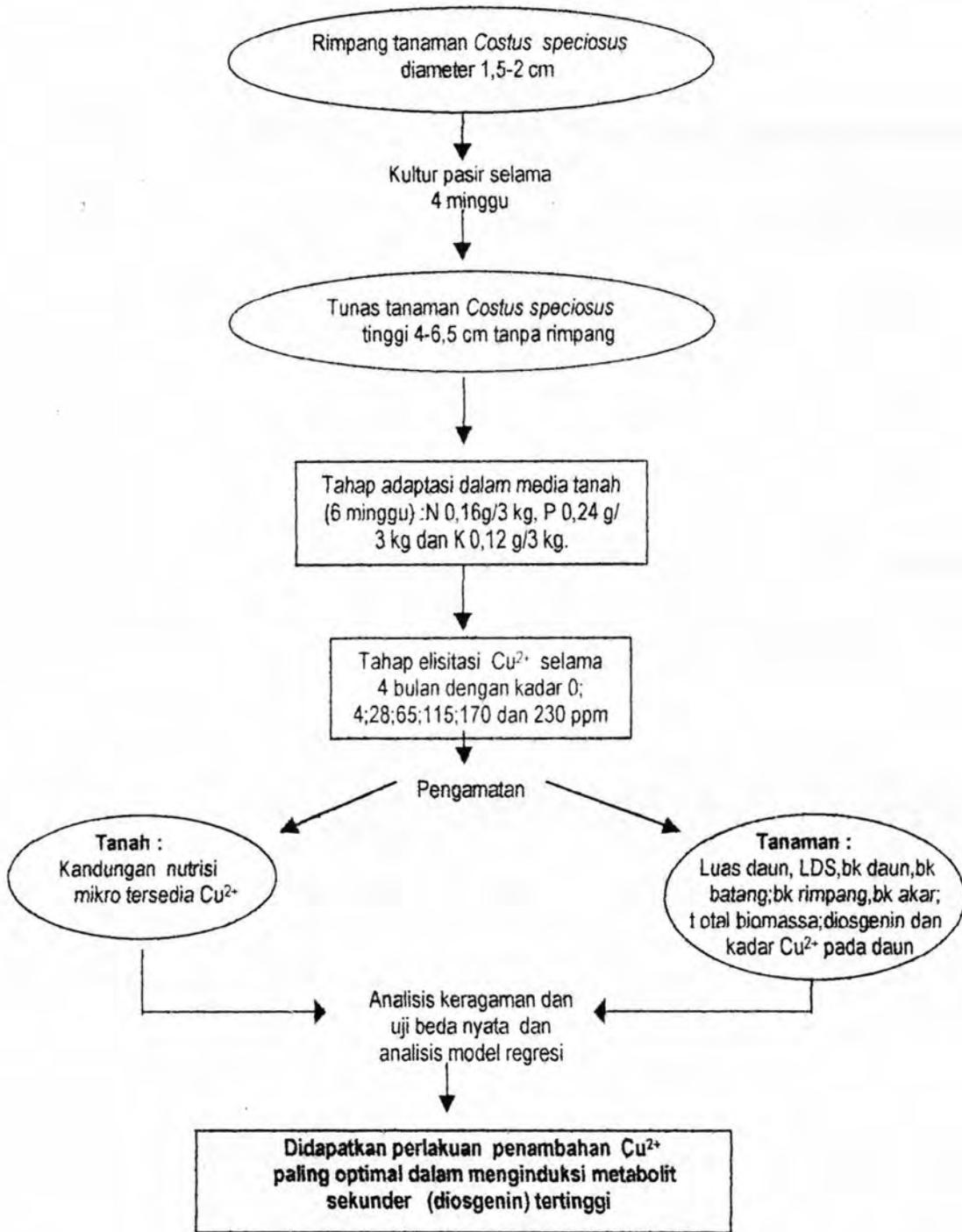


Gambar 4.5. Rimpang tanaman *Costus speciosus* yang digunakan sebagai bibit dalam percobaan elisitasi Cu^{2+}

4.2.7. Prosedur pengambilan data

a. Pengadaan contoh

Rimpang tanaman *Costus speciosus* yang mempunyai mata tunas dipotong sepanjang 2 cm, selanjutnya ditanam dalam kultur pasir dengan ketebalan 5 cm. Disiram setiap hari dengan air sumur (tanpa pemupukan) selama 4 minggu, tunas yang tumbuh diambil secara hati-hati agar akar serabut tidak rusak. Bagian rimpang dibuang dengan cara memotong sehingga yang melekat pada tunas hanya kulit rimpang tempat melekat akar serabut.



Gambar 4.6. Kerangka operasional studi pengaruh kadar Cu^{2+} yang ditambahkan dalam media tanah terhadap kandungan Diosgenin rimpang tanaman *Costus speciosus*

Tunas ditanam pada pot *polybag* yang berisi tanah kebun BLIP Wonojati dan pupuk kandang dengan perbandingan 4:1 b/b, selanjutnya dilakukan penyiraman. Penyiraman pertama dilakukan dengan air hingga jenuh sampai tanah memadat, penyiraman selanjutnya dilakukan dengan volume kapasitas lapang. Kondisi tersebut dipertahankan sampai 6 minggu, dengan interval penyiraman 3 hari sekali. Setiap 2 minggu diberi pupuk dasar NPK dalam bentuk Urea, TSP dan KCl dengan takaran 150 kg/ha N, 200 kg/ha P dan 100 kg/ha K. Untuk pot yang digunakan dengan ukuran 3 kg tanah kering diperlukan masing-masing 0,16 g N, 0,24 P dan 0,12 K. Pembesaran tanaman dilakukan dalam pot hingga tanaman bertunas atau selama 6 minggu.

b. Elisitasi Nutrisi Cu^{2+}

Membuat larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dengan konsentrasi Cu^{2+} sesuai perlakuan yaitu 4, 28, 65, 115, 170 dan 230 ppm dari bobot tanah kering dalam pot (masing-masing pot 3 kg dan ulangan 10 sehingga total tanah tiap perlakuan 30 kg). Senyawa kuprisulfat anhidrat dilarutkan dengan air bebas mineral sebanyak 10 liter, selanjutnya digunakan untuk penyiraman sesuai dengan perlakuan. Penyiraman dilakukan 4 hari sekali dengan volume larutan untuk penyiraman sebatas pada kapasitas lapang.

Untuk menjaga agar semua larutan kuprisulfat yang disiramkan tidak mengalami kehilangan (merembes atau menetes ke bawah pot), di bawah pot diberi wadah penampung tetesan. Setelah larutan kuprisulfat habis, penyiraman selanjutnya sampai 4 bulan menggunakan air sumur. Untuk membersihkan tetesan kuprisulfat pada tampungan bawah pot, wadah dibersihkan dengan air sumur dan selanjutnya disiramkan lagi pada pot yang

bersangkutan. Setelah dilakukan elisitasi selama 16 minggu, tanaman dipanen. Gambaran tanaman yang telah dipanen seperti pada Gambar 4.7.

4.2.8. Analisis data

Data yang diperoleh selanjutnya dilakukan analisis keragaman dengan menggunakan program Minitab, jika terdapat perbedaan nyata dilanjutkan dengan uji beda BNT dan model persamaan regresi linier dan kuadrat. Pemilihan model persamaan regresi hanya dilakukan pada tingkat penambahan Cu^{2+} 0-115 ppm, hal tersebut dengan pertimbangan penambahan Cu^{2+} mulai 115 ppm telah menyebabkan tanaman mengalami gangguan fisiologis, sehingga elisitasi Cu^{2+} di atas 115 ppm lebih dari 4 bulan akan menyebabkan tanaman mengalami kematian. Model yang dipilih adalah yang mempunyai nilai $p < 0,05$ dan nilai R^2 tertinggi.



Gambar 4.7. Tanaman *Costus speciosus* yang telah mengalami elisitasi dengan nutrisi mikro Cu^{2+} selama 4 bulan