

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan April hingga Juli 2021 di Laboratorium Politeknik Kesehatan Bandung, Laboratorium dan Rumah Kaca Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Kampus 2 Mugarsari.

3.2 Alat dan bahan

Alat yang digunakan adalah oven, baki perkecambahan (42 cm x 32 cm x 4 cm), saringan, pipet ukur, pengaduk kaca, tabung reaksi, rak tabung reaksi, label, kertas merang, cup plastik, *blender*, *beaker glass*, *sprayer*, *conductivity meter*, digital *thermometer hygrometer*, evaporator, spektrofotometer, timbangan digital, alat tulis, dan penggaris. Bahan yang digunakan adalah benih kedelai hitam varietas Detam 4 Prida, aquades, tanah, biji alpukat, metanol, etanol 96% (Dipa Prasada Husada, Indonesia), NaCl (Dipa Prasada Husada, Indonesia), dan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH).

3.3 Metode penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pola faktorial yang terdiri dari 2 faktor dengan 3 ulangan. Faktor pertama adalah konsentrasi antioksidan ekstrak biji alpukat terdiri dari 4 taraf yaitu :

A₀ = Aquades (kontrol).

A₁ = Antioksidan ekstrak biji alpukat 1%.

A₂ = Antioksidan ekstrak biji alpukat 3%.

A₃ = Antioksidan ekstrak biji alpukat 5%.

Faktor kedua adalah cekaman salinitas terdiri dari 3 taraf yaitu :

C₀ = NaCl 0% (DHL = 0,87 dS m⁻¹).

C₁ = NaCl 0,5% (DHL = 10,92 dS m⁻¹).

C₂ = NaCl 1,0% (DHL = 17,77 dS m⁻¹).

Dengan demikian, percobaan ini terdiri dari 12 kombinasi perlakuan. Kombinasi antara perlakuan antioksidan dengan cekaman salinitas disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Kombinasi antioksidan (A) dan cekaman salinitas (C)

Antioksidan (A)	Cekaman Salinitas (C)		
	C ₀	C ₁	C ₂
A ₀	a ₀ C ₀	a ₀ C ₁	a ₀ C ₂
A ₁	a ₁ C ₀	a ₁ C ₁	a ₁ C ₂
A ₂	a ₂ C ₀	a ₂ C ₁	a ₂ C ₂
A ₃	a ₃ C ₀	a ₃ C ₁	a ₃ C ₂

3.4 Analisis data

Berdasarkan rancangan yang digunakan, maka model linier secara umum adalah :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

dengan $i = 1, 2, \dots$; $j = 1, 2, \dots$; $k = 1, 2, \dots$

Y_{ijk} = Nilai pengamatan.

μ = Rataan umum.

α_i = Pengaruh utama antioksidan.

β_j = Pengaruh utama cekaman salinitas.

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Pengaruh interaksi faktor A dan faktor B.

ε_{ijk} = Galat percobaan.

Data hasil pengamatan diolah menggunakan analisis statistik dan dimasukkan ke dalam daftar sidik ragam untuk mengetahui taraf nyata dari uji F yang disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Analisis sidik ragam

Sumber Keragaman	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F _{hit}	F _{0,05}
Perlakuan	11	$JK_P = \frac{\sum x^2_{ij}}{r} - FK$	$KT_P = \frac{JK_P}{db_P}$	$KT_P : KT_g$	2,22
Faktor Antioksidan	3	$JK_A = \frac{\sum A^2_{ij}}{cr} - FK$	$KT_A = \frac{JK_A}{db_A}$	$KT_A : KT_g$	3,01
Faktor Cekaman Salinitas	2	$JK_C = \frac{\sum B^2_{ij}}{ar} - FK$	$KT_C = \frac{JK_C}{db_C}$	$KT_C : KT_g$	3,40
Interaksi AC	6	$JK_{int} = JK_P - JK_A - JK_B$	$KT_{int} = \frac{JK_{int}}{db_{int}}$	$KT_{int} : KT_g$	2,51
Galat	24	$JK_g = JK_T - JK_P$	$KT_g = \frac{JK_g}{db_g}$		
Total	35	$JK_T = \sum x^2_{ijk} - FK$			

Sumber : Gaspersz, 1991

Kaidah pengambilan keputusan berdasarkan nilai F_{hit} dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Kaidah pengambilan keputusan

Hasil Analisis	Kesimpulan Analisis	Keterangan
$F_{hit} \leq F_{0,05}$	Tidak berbeda nyata	Tidak ada perbedaan pengaruh antar perlakuan
$F_{hit} > F_{0,05}$	berbeda nyata	Terdapat perbedaan pengaruh antar perlakuan

Sumber : Gaspersz, 1991

Bila nilai F_{hit} menunjukkan perbedaan yang nyata pada interaksi, maka dilakukan uji lanjutan dengan uji jarak berganda Duncan pada taraf 5% dengan rumus berikut :

$$LSR_{(\alpha, dbg)} = SSR_{(\alpha, dbg)} \times S_x$$

LSR = *Least Significant Range*.

SSR = *Student zed Significant Range*.

α = Taraf nyata.

db_g = Derajat bebas galat.

S_x = Simpangan baku rata-rata.

Nilai S_x didapatkan menggunakan rumus berikut :

$$S_x = \sqrt{\frac{KT_g}{r}}$$

Apabila pada interaksi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata, maka rumus S_x yang digunakan adalah sebagai berikut :

- 1) Untuk membedakan pengaruh faktor A (antioksidan) pada seluruh taraf faktor C (cekaman salinitas) menggunakan rumus :

$$S_x = \sqrt{\frac{KTg}{cr}}$$

- 2) Untuk membedakan pengaruh faktor C (cekaman salinitas) pada seluruh taraf faktor A (antioksidan) menggunakan rumus :

$$S_x = \sqrt{\frac{KTg}{ar}}$$

3.5 Pelaksanaan penelitian

3.5.1 Persiapan benih

Persiapan benih dilakukan dengan menyortir benih berdasarkan kesehatan dan ukuran benih. Benih yang digunakan merupakan benih yang sehat dan memiliki ukuran seragam.

3.5.2 Ekstraksi antioksidan biji alpukat

Biji alpukat diambil dari alpukat yang sudah matang, sebanyak 6 kg biji yang diambil dicuci hingga bersih menggunakan air dan dipotong-potong. Kemudian biji dikeringkan dengan oven selama 22 jam pada suhu 50°C untuk menghilangkan kadar air pada biji. Biji yang sudah kering, dihaluskan menggunakan *blender* dan didapatkan serbuk biji alpukat sebanyak 3 kg. Serbuk biji alpukat kemudian direndam dalam 15 L etanol 96% selama 24 jam. Setelah itu filtrat disaring, kemudian diuapkan menggunakan evaporator untuk menghilangkan pelarut sehingga diperoleh ekstrak kental sebanyak 296 ml (Malangngi, Sangi, dan Paedong, 2012).

3.5.3 Uji antioksidan (DPPH)

Dilakukan pembuatan larutan stok ekstrak biji alpukat dengan konsentrasi 1000 ppm, sebanyak 10 mg ekstrak biji alpukat ditambahkan metanol hingga volume menjadi 10 ml. Kemudian larutan stok diencerkan menjadi beberapa konsentrasi sebagai berikut :

5 ppm = 0,025 ml larutan stok + metanol hingga volume larutan mencapai 5 ml.

10 ppm = 0,050 ml larutan stok + metanol hingga volume larutan mencapai 5 ml.

15 ppm = 0,075 ml larutan stok + metanol hingga volume larutan mencapai 5 ml.

20 ppm = 0,100 ml larutan stok + metanol hingga volume larutan mencapai 5 ml.

25 ppm = 0,125 ml larutan stok + metanol hingga volume larutan mencapai 5 ml.

Uji antioksidan dilakukan menggunakan larutan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) dengan konsentrasi 50 ppm. Pengujian dilakukan pada tabung reaksi dengan menambahkan 2 ml metanol, 1 ml larutan DPPH, dan 1 ml larutan ekstrak yang telah diencerkan. Dibuat blanko sebagai pembanding, pada tabung reaksi ditambahkan 3 ml metanol dan 1 ml larutan DPPH. Absorbansi dibaca dengan spektrofotometer pada λ 517 nm setelah diinkubasi selama 30 menit.

3.5.4 Perendaman benih

Perendaman dilakukan sesuai dengan konsentrasi perlakuan. Pembuatan konsentrasi dilakukan dengan melarutkan 0,5 ml filtrat untuk konsentrasi 1%, 1,5 ml filtrat untuk konsentrasi 3%, dan 2,5 ml filtrat untuk konsentrasi 5% pada aquades hingga volume mencapai 50 ml. Setiap perlakuan direndam dengan volume 50 ml. Benih yang sudah disortir, diambil sebanyak 50 butir untuk setiap perlakuan dan dilakukan perendaman berdasarkan konsentrasi perlakuan selama 12 jam. Kemudian benih dicuci menggunakan air dan ditiriskan.

3.5.5 Persiapan media tanam

Media tanam yang digunakan yaitu tanah yang dimasukkan dalam baki kecambah dengan ukuran 40 cm x 30 cm x 4 cm. Sebelum ditanam, tanah disiram dengan perlakuan cekaman salinitas sebanyak 150 ml pada setiap baki kecambah sesuai konsentrasi perlakuan. Pembuatan konsentrasi NaCl dilakukan dengan melarutkan 5 g NaCl untuk konsentrasi 0,5% dan 10 g NaCl untuk konsentrasi 1% pada aquades hingga volume mencapai 1000 ml. Pemberian perlakuan salinitas dilakukan 1 hari sekali.

3.5.6 Penanaman benih

Benih ditanam pada media tanah pada baki perkecambahan yang telah diberi perlakuan cekaman salinitas dengan jarak tanam 3 cm x 3 cm. Benih dikecambahkan selama 12 hari.

3.6 Parameter pengamatan

3.6.1 Pengamatan penunjang

A. Daya kecambah dan kadar air benih

Nilai daya kecambah dan kadar air benih didapat dari label benih.

B. Aktivitas antioksidan

Aktivitas penangkap radikal bebas diamati dan dihitung sebagai persentase berkurangnya warna DPPH dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Aktivitas} = \frac{\text{absorbansi sampel} + \text{kontrol}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100 \%$$

Nilai IC₅₀ (50% Inhibitory Concentration) ditentukan dengan analisis probit dari data konsentrasi dengan persentase pengikatan radikal bebas (Sami *et al.*, 2015).

C. Temperatur dan kelembapan

Diukur menggunakan digital *thermometer hygrometer* setiap hari pada pagi dan sore selama penelitian berlangsung.

D. Daya hantar listrik tanah

Diukur menggunakan *Conductivity* meter pada tanah sebelum dan sesudah diberi perlakuan cekaman salinitas. Sebanyak 60 g sampel dari setiap tanah

dimasukan kedalam *beaker glass* dan ditambahkan aquades sebanyak 30 mL. Kemudian diaduk hingga homogen menggunakan pengaduk kaca. DHL suspensi setiap tanah diukur dengan menggunakan *conductivity* meter.

3.6.2 Pengamatan utama

A. Kecepatan tumbuh (K_{CT})

Kecepatan tumbuh dihitung berdasarkan jumlah pertambahan kecambah normal setiap hari. Pengamatan dihitung setiap hari mulai hari pertama sampai hari ke-12 setelah tanam dan dihitung dengan rumus :

$$K_{CT} = \frac{N_1}{D_1} + \frac{N_2}{D_2} + \frac{N_3}{D_3} + \dots + \frac{N_n}{D_n}$$

Keterangan :

N = Jumlah kecambah normal.

D = Jumlah hari setelah tanam.

n = Hari ke-n.

B. Daya kecambah (DK)

Dilakukan dengan mengamati kecambah normal pada hari ke-12. Kemudian dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$DK = \frac{KN}{JBK} \times 100\%$$

Keterangan :

KN = Jumlah kecambah normal.

JBK = Jumlah benih yang dikecambahkan.

C. Panjang hipokotil

Pengamatan dilakukan pada hari ke-12. Dari setiap perlakuan diambil 5 sampel kecambah secara acak dengan melemparkan gulungan kertas pada baki perlakuan. Kecambah yang terpilih diambil dan dibersihkan dari tanah yang menempel, kemudian diukur panjang hipokotilnya menggunakan penggaris.

D. Panjang epikotil

Pengamatan dilakukan pada hari ke-12. Dari setiap perlakuan diambil 5 sampel kecambah secara acak dengan melemparkan gulungan kertas pada baki perlakuan. Kecambah yang terpilih diambil dan dibersihkan dari tanah yang menempel, kemudian diukur panjang epikotilnya menggunakan penggaris.

E. Panjang akar

Pengamatan dilakukan pada hari ke-12. Dari setiap perlakuan diambil 5 sampel kecambah secara acak dengan melemparkan gulungan kertas pada baki perlakuan. Kecambah yang terpilih diambil dan dibersihkan dari tanah yang menempel, kemudian diukur panjang akarnya menggunakan penggaris.

F. Daya hantar listrik kecambah

Pengamatan dilakukan pada hari ke-12. Dari setiap perlakuan diambil 5 sampel kecambah secara acak dengan melemparkan gulungan kertas pada baki perlakuan. Kecambah yang terpilih diambil dan dibersihkan dari tanah yang menempel. Sampel kecambah dari masing-masing perlakuan direndam pada aquades 50 ml selama 24 jam dan diukur daya hantar listriknya menggunakan *conductivity* meter. Sebagai blanko, digunakan air bebas ion yang telah disimpan juga selama 24 jam.

G. Bobot kering kecambah

Pengamatan dilakukan pada hari ke-12. Dari setiap perlakuan diambil 5 sampel kecambah secara acak dengan melemparkan gulungan kertas pada baki perlakuan. Kecambah yang terpilih diambil dan dibersihkan dari tanah yang menempel, kemudian kecambah dioven dengan suhu 50° selama 20 jam dan ditimbang bobot keringnya menggunakan timbangan digital.