

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat

Percobaan dilakukan dari bulan Juni sampai Agustus 2024, di laboratorium produksi tanaman Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi dan lahan terbuka di Astanagede, Dayeuhluhur, Kecamatan Dayeuhluhur, Kabupaten Cilacap, Jawa Tengah.

3.2 Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan dalam percobaan ini terdiri dari *rotary evaporator*, hygrometer, oven, *hand sprayer*, toples kaca, kertas saring, kertas merang, *petridish*, *polibag*, *germinator*, corong, pengaduk, penggaris, gelas ukur, pipet tetes, tabung reaksi, timbangan analitik, *blender*, label, pisau, dan alat tulis.

Bahan yang digunakan dalam percobaan ini terdiri dari daun kirinyuh, biji gulma grintangan, etanol 96%, aquades, kloroform, amonia 28 %, asam klorida, larutan kalium merkuri-iodida, larutan Iodobismutat, FeCl_3 , air, gelatin, NaCl, etanol 80%, serbuk magnesium, HCl pekat, amil alkohol, asam setat anhidrat, asam sulfat pekat, dan herbisida bahan aktif glifosat.

3.3 Metode penelitian

Metode penelitian ini adalah metode eksperimen menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) untuk pra tumbuh, yang terdiri dari lima perlakuan dan empat kali ulangan dan Rancangan Acak Kelompok (RAK) untuk pasca tumbuh, yang terdiri dari lima perlakuan dan lima kali ulangan. Adapun perlakuan konsentrasi ekstrak daun kirinyuh yang diuji untuk pra tumbuh maupun pasca tumbuh adalah sebagai berikut :

- A : Herbisida sintetik bahan aktif isopropilamina glifosat (kontrol positif)
- B : Ekstrak daun kirinyuh konsentrasi 10%
- C : Ekstrak daun kirinyuh konsentrasi 20%
- D : Ekstrak daun kirinyuh konsentrasi 30%
- E : Ekstrak daun kirinyuh konsentrasi 40%

Berdasarkan rancangan percobaan yang digunakan maka model linier dari RAL adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan :

i = Perlakuan

j = Ulangan

Y_{ij} = Pengamatan pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ = Rataan umum

τ_i = Pengaruh perlakuan ke-i

ε_{ij} = Pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Bentuk model linier dari Rancangan Acak Kelompok (RAK) adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan:

Y_{ij} = Pengamatan pada perlakuan ke-i dan kelompok ke-j

μ = Rataan umum

τ_i = Pengaruh perlakuan ke-i

β_j = Pengaruh kelompok ke-j

ε_{ij} = Pengaruh acak pada perlakuan ke-i dan kelompok ke-j

Berdasarkan model linier tersebut kemudian dimasukan kedalam Tabel daftar sidik ragam sebagai berikut :

Tabel 2 Sidik Ragam RAL

Sumber ragam	Db	JK	KT	Fhit	Ftab 5%
Perlakuan	4	$\frac{\sum T_i^2}{r} - FK$	$\frac{JKP}{dbP}$	$\frac{KTP}{KTG}$	3,06
Galat	15	JKU-JKP	$\frac{JKG}{dbG}$		
Total	19	$\sum X_i^2 - FK$			

(Susilawati, 2015)

Tabel 3. Daftar Sidik Ragam RAK

Sumber ragam	Db	JK	KT	Fhit	Ftab 5%
Ulangan	4	$\frac{\sum Tr^2}{p} - FK$	$\frac{JKK}{dbR}$	$\frac{KTR}{KTG}$	3,01
Perlakuan	4	$\frac{\sum Ti^2}{r} - FK$	$\frac{JKP}{dbP}$	$\frac{KTP}{KTG}$	3,01
Galat	16	JKU-JKP	$\frac{JKG}{dbG}$		
Total	24	$\sum Xi^2 - FK$			

(Susilawati, 2015)

Tabel 4 Kaidah Pengambilan Keputusan

Hasil analisa	Kesimpulan analisa	Keterangan
$F_{hit} \leq F_{0,05}$	Berbeda tidak nyata	Tidak ada perbedaan pengaruh antar perlakuan
$F_{hit} > F_{0,05}$	Berbeda nyata	Ada perbedaan pengaruh antar perlakuan

Jika analisis ragam menunjukkan perbedaan yang nyata, maka analisis data dilanjutkan dengan menggunakan Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf 5% dengan rumus sebagai berikut:

$$LSR = SSR (\alpha, dbg, p) \cdot S_x$$

Keterangan :

LSR = Least Significant Range

SSR = Stundrized Significant Range.

 α = Taraf nyata

dbg = Derajat bebas galat

p = Range (perlakuan)

 S_x = Simpangan baku rata-rata perlakuan

S_X dihitung dengan cara : $S_X = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r}}$

3.4 Pelaksanaan Percobaan

3.4.1 Pembuatan ekstrak daun kirinyuh

Pembuatan ekstrak daun kirinyuh menggunakan metode ekstrak secara maserasi dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Daun yang digunakan yaitu daun tua, berwarna hijau tua, bebas hama dan penyakit (Gultom, Sakinah, dan Hasanah, 2020). Daun kirinyuh sebanyak 3 kg dicuci menggunakan air mengalir sampai bersih. Setelah itu, daun kirinyuh dikeringkan di bawah sinar matahari selama kurang lebih 3 hari. Tujuan pengeringan adalah untuk mengurangi kadar air, agar tidak tumbuh jamur.
2. Daun kirinyuh yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender sampai menjadi serbuk halus. Sebanyak 1,5 kg serbuk halus dan 6 liter larutan etanol 96% dimasukkan ke dalam toples kaca dan diaduk setiap 2 jam sekali. Maserasi dilakukan selama 3x24 jam. Selanjutnya, larutan disaring menggunakan kertas saring. Semua maserat dari hasil penyaringan dikumpulkan menjadi satu dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50° C kecepatan 60 rpm sampai semua etanol menguap sehingga diperoleh ekstrak kental daun kirinyuh (Frastika, Sitopang, dan Suastika, 2017).
3. Ekstrak hasil evaporator diencerkan menggunakan aquades sesuai dengan perlakuan yaitu konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%. Menurut Da Lopez (2023) pengenceran ekstrak dapat menggunakan rumus sebagai berikut:

$$V_1M_1 = V_2M_2$$

$$V_1M_1 = (V_1+X)M_2$$

Keterangan:

V_1 = Volume larutan awal yang akan diencerkan

V_2 = Volume larutan yang akan dibuat

M_1 = Konsentrasi larutan awal

M_2 = Konsentrasi larutan yang akan dibuat

X = Banyaknya pelarut yang ditambahkan

4. Selanjutnya larutan ekstrak yang sudah sesuai dengan perlakuan konsentrasi siap digunakan pada percobaan.

3.4.2 Aplikasi herbisida sintetik

Herbisida sintetik yang digunakan sebagai kontrol positif yaitu herbisida yang mempunyai bahan aktif isopropilamina glifosat 486 g/l. Konsentrasi formulasi herbisida glifosat yaitu 10 ml/ 1 liter air, dengan volume semprot herbisida sintetik yaitu 5 ml/ *petridish* pada uji pra tumbuh, dan 10 ml/ tanaman pada uji pasca tumbuh.

3.4.3 Uji pra tumbuh

Uji pra tumbuh dilakukan di laboratorium dalam *petridish*. Uji pra tumbuh dilakukan dengan cara menguji daya perkecambahan dan kecepatan berkecambah. Uji pra tumbuh menggunakan 20 *petridish*. Kertas merang sebanyak 3 lembar diletakkan pada *petridish*. Biji rumput grinting ditanam di atas lembar kertas merang dengan pinset sebanyak 10 biji per *petridish*. Biji rumput grinting yang telah ditanam di *petridish* kemudian diberi ekstrak daun kirinyuh sesuai dengan perlakuan konsentrasi, dengan volume 5 ml. Selanjutnya, *petridish* yang sudah disemprot ekstrak daun kirinyuh disimpan dalam *germinator*. Kelembaban media tumbuh dijaga selama penelitian berlangsung dengan pemberian aquades sesuai dengan perlakuan. Pemberian perlakuan hanya dilakukan satu kali yaitu sesaat setelah biji rumput grinting diletakkan dalam *petridish*. Percobaan diakhiri pada hari ke-10 (Frastika, Sitopang, dan Suastika, 2017). Tata letak percobaan di laboratorium dapat dilihat pada, Lampiran 1.

3.4.4 Uji pasca tumbuh

Uji pasca tumbuh rumput grinting dilakukan di lapangan. Setiap plot percobaan terdiri dari 2 polibag yang ditanami 5 biji rumput grinting per polibag dengan letak tanam biji masing masing berada pada sisi dan tengah polibag. Media tanam yang digunakan berupa tanah, kemudian tanah dimasukkan ke dalam polibag ukuran 20 x 20 cm, setiap polibag diisi dengan tanah sebanyak 4,8 kg. Setelah 10 hari, dipilih 1 gulma yang memiliki ukuran yang sama pada masing-masing polibag. Penyemprotan ekstrak kirinyuh diberikan pada hari ke-10 dan ke-20 setelah tanam dengan volume semprot 10 ml/tanaman dengan cara diaplikasikan secara merata

pada seluruh bagian tanaman (Septiani dan Mukarlina, 2017). Percobaan diakhiri pada hari ke-30 setelah tanam. Tata letak percobaan dilapangan dapat dilihat pada, Lampiran 2.

3.4.5. Uji kandungan fitokimia

a. Senyawa Alkaloid

Ekstrak ditimbang 100 mg masukan ke dalam tabung reaksi, dibasakan dengan amonia 28 % dan kemudian ditambahkan 10 mL kloroform. Fase kloroform dipisahkan dan diasamkan dengan asam klorida 2 N. Lapisan asam dipisahkan dan digunakan untuk pengujian alkaloid : 1) dengan pereaksi *Mayer* (Larutan kalium merkuri-iodida) penambahan beberapa tetes pereaksi Mayer menimbulkan endapan putih mengindikasikan adanya alkaloid. 2) *Dragendorff* (Larutan Iodobismutat) penambahan pereaksi ini menimbulkan endapan berwarna merah kecoklatan mengindikasikan adanya alkaloid.

b. Senyawa Polifenol

Ekstrak ditimbang 100 mg masukan ke dalam tabung reaksi, ekstrak diencerkan dengan air kemudian ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 1% adanya endapan biru, warna biru kehitaman, hijau dan biru kehijauan menunjukkan adanya senyawa polifenol.

c. Tanin

Ekstrak ditimbang 100 mg masukan ke dalam tabung reaksi, diencerkan dengan 2 mL air kemudian dibagi 2 tabung. Tabung ke-1 ditambahkan 2-3 tetes FeCl_3 1% adanya endapan biru atau warna biru kehitaman menunjukkan adanya galotanin dan elagitanin, sedangkan warna hijau atau biru kehijauan menunjukkan adanya tanin terkondensasi. Tabung ke-2 ditambahkan gelatin 1% (dalam 10% NaCl) terbentuk endapan menunjukkan adanya tanin.

d. Flavonoid

Ekstrak ditimbang 100 mg masukan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 mL etanol 80% kemudian diaduk dan saring. Filtrat ditambahkan 3-4 sendok spatula serbuk magnesium dan 0,5 mL HCl pekat. Terbentuknya warna jingga sampai merah yang dapat ditarik dengan amil alkohol atau oktil alkohol, menunjukkan adanya flavonoid.

e. Steroid dan Triterpenoid

Ekstrak ditimbang 100 mg masukan ke dalam tabung reaksi, ditambah kloroform, kemudian fase kloroform dipisahkan dan diuapkan. Pada residu ditambahkan tiga tetes asam asetat anhidrat dan satu tetes asam sulfat pekat (Liebermann-Burchard). Terbentuknya warna magenta atau violet menunjukkan bahwa dalam simplisia terkandung senyawa kelompok triterpenoid. Adanya warna biru kehijauan menunjukkan adanya steroid.

f. Senyawa Saponin

Ekstrak ditimbang 100 mg masukan ke dalam tabung reaksi tambahkan 10 mL air kemudian diaduk dan dikocok kuat secara vertikal selama 30 detik jika terbentuk buih dengan tinggi lebih dari 3 cm yang persisten selama 30 menit maka sampel mengandung saponin.

3.5 Pengamatan

3.5.1 Pengamatan penunjang

Pengamatan penunjang adalah pengamatan yang dilakukan terhadap variabel yang datanya tidak diuji secara statistik, dilakukan terhadap suhu udara, kelembaban udara dan uji kandungan fitokimia ekstrak kirinyuh.

3.5.2 Pengamatan utama

Pengamatan utama adalah pengamatan yang dilakukan terhadap variabel yang datanya diuji secara statistik, yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap variabel yang diamati.

a. Pengamatan pra tumbuh

1. Persentase perkecambahan (%)

Persentase perkecambahan dilakukan dengan cara menghitung banyaknya biji yang berkecambah. Biji yang dihitung adalah kecambah yang sudah muncul radikulanya. Pengambilan data dilakukan pada hari ke-10 setelah tanam. Persentase perkecambahan dihitung menggunakan rumus (Fatikhasari, dkk., 2022):

$$\% \text{perkecambahan} = \frac{\text{jumlah biji yang berkecambah}}{\text{jumlah biji yang dikecambahkan}}$$

2. Kecepatan berkecambah

Kecepatan berkecambah dihitung berdasarkan jumlah kecambah normal setiap hari. Pengamatan dihitung setiap hari mulai dari hari pertama sampai hari ke-10 setelah tanam. Kecepatan berkecambah dihitung dengan rumus (Fatikhasari, dkk., 2022):

$$\text{Kecepatan berkecambah} : \frac{N1}{D1} + \frac{N2}{D2} + \dots + \frac{Nn}{Dn}$$

Keterangan :

$N1 \dots Nn$ = Jumlah kecambah normal hari ke 1,2,3,...,10 setelah tanam

$D1 \dots Dn$ = Jumlah hari setelah tanam

b. Pengamatan pasca tumbuh

1. Tinggi gulma grintingan (cm)

Tinggi gulma grintingan diukur dari pangkal batang sampai ujung daun ujung daun yang tertinggi (diurut keatas) menggunakan penggaris (Yulina, Ezward, dan Haitami, 2021) pada hari ke-20, dan 30.

2. Panjang akar (cm)

Panjang akar grintingan diukur dari pangkal akar atas sampai pangkal akar bawah menggunakan penggaris pada hari terakhir pengamatan (Anonim, 2017) yaitu pada hari ke-30.

3. Bobot basah brangkasan

Bobot basah gulma grintingan dalam keadaan segar ditimbang menggunakan timbangan analitik (Ulfa, 2017), yang dilakukan pada hari terakhir pengamatan yaitu hari ke-30.

4. Bobot kering brangkasan

Bobot kering ditimbang setelah gulma grintingan dioven terlebih dahulu pada temperatur 40°C selama 6 jam (Ulfa, 2017). Pengukuran dilakukan pada hari terakhir pengamatan yaitu pada hari ke-30.

5. Kadar klorofil

Kadar klorofil diukur menggunakan spektrofotometri. Pengukuran dilakukan pada hari terakhir pengamatan yaitu pada hari ke-30.

6. Jumlah daun

Jumlah daun dihitung dengan cara menghitung jumlah daun yang terdapat pada tanaman sampel pada masing-masing unit percobaan. Pengamatan dilakukan setiap minggu (Anonim, 2017).