

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Percobaan dilaksanakan pada bulan April sampai Agustus 2022. Bertempat di Laboratorium dan *Green House* Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Kampus Mugarsari, Kecamatan Tamansari, Kota Tasikmalaya serta di Laboratorium Dasar Universitas Garut.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah : blender, *beaker glass*, kertas saring, oven, timbangan digital, polibag ukuran 30 cm x 30 cm, *sprayer*, baki perkecambahan, tabung ukur, penggaris, pisau, erlenmeyer, *thermo hygrometer*, *conductivity meter*, *rotary evaporator*, klorofil meter.

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : benih kedelai anjasmoro, kulit buah mangga, aquades, etanol 96%, tanah, NPK (16-16-16).

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan Rancangan Acak Kelompok (RAK) yang berpola faktorial. Faktor pertama yaitu cekaman kekeringan dengan tiga taraf, faktor kedua yaitu konsentrasi antioksidan dengan 3 taraf perlakuan. Masing-masing perlakuan diulang 3 kali. Faktor pertama adalah cekaman kekeringan (C) yang terdiri dari tiga taraf yaitu :

C_0 = kapasitas lapang (kontrol)

C_1 = 75% kapasitas lapang (cekaman ringan)

C_2 = 50% kapasitas lapang (cekaman sedang)

Faktor kedua adalah konsentrasi antioksidan (A) dari ekstrak kulit buah mangga sebagai bahan invigorasi yang terdiri dari tiga taraf, yaitu :

A_0 = 0% (kontrol)

A_1 = 1%

A_2 = 2%

Dengan demikian percobaan ini terdiri dari 9 kombinasi perlakuan antara cekaman kekeringan dengan antioksidan. Kombinasi perlakuan antara cekaman kekeringan dengan antioksidan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kombinasi cekaman kekeringan (C) dan antioksidan kulit buah mangga (A)

Cekaman Kekeringan (C)	Antioksidan Kulit Buah Mangga (A)		
	0% (A0)	1% (A1)	2% (A2)
KL (C0)	C ₀ A ₀	C ₀ A ₁	C ₀ A ₂
75% KL (C1)	C ₁ A ₀	C ₁ A ₁	C ₁ A ₂
50% KL (C2)	C ₂ A ₀	C ₂ A ₁	C ₂ A ₂

Setiap kombinasi perlakuan diulang sebanyak tiga kali, sehingga keseluruhan terdapat 27 plot percobaan. 1 plot terdiri dari 6 tanaman kedelai.

Berdasarkan rancangan yang digunakan maka dapat dikemukakan model linear dari percobaan faktorial untuk dua faktor yang masing-masing memiliki level a dan b dengan n ulangan sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \alpha_j + \beta_k + (\alpha\beta)_{jk} + \sum_{ijk}$$

Y_{ijk} = Hasil pengamatan pada ulangan ke-i, perlakuan faktor cekaman kekeringan taraf ke-j dan antioksi dan taraf ke-k.

μ = Rata-rata umum

τ_i = Pengaruh perlakuan ke-i

α_j = Pengaruh cekaman kekeringan pada taraf ke-j

β_k = Pengaruh antioksidan pada taraf ke-k

$(\alpha\beta)_{jk}$ = Pengaruh interaksi antara cekaman kekeringan pada taraf ke-j dengan antioksidan pada taraf ke-k

\sum_{ijk} = Komponen random dari galat yang berhubungan dengan perlakuan cekaman kekeringan pada taraf ke-j dan faktor antioksidan pada taraf ke-k dalam ulangan ke-i.

Data hasil pengamatan diolah dengan menggunakan analisis statistik, kemudian dimasukkan ke dalam daftar sidik ragam untuk mengetahui taraf nyata dari uji F yang tersaji pada Tabel 2.

Tabel 2. Daftar Sidik Ragam

Sumber Ragam	DB	JK	KT	F _{hit}	F _{0,05}
Ulangan	2	$\frac{\sum X_i^2}{ca} - FK$	JKU/dbU	KTU/KTG	3.63
Perlakuan	8	$\frac{\sum P^2}{r} - FK$	JKP/dbP	KTP/KTG	2.59
Cekaman Kekeringan (c)	2	$\frac{\sum c^2}{r} - FK$	JKC/dbC	KTC/KTG	3.63
Antioksidan (a)	2	$\frac{\sum a^2}{r} - FK$	JKa/dbA	KTA/KTG	3.63
c x a	4	JKP-JKc-JKa	JKCA/dbCA	KTCA/KTG	3.01
Galat	16	JK (T) – JK (U) – JK (P)	JKG/dbG		
Total	34	$\sum X_{ij}^2 - FK$			

Kaidah pengambilan keputusan berdasarkan pada nilai F hitung, dapat dilihat pada Tabel 3 sebagai berikut :

Tabel 3. Kaidah Pengambilan Keputusan

Hasil Analisa	Kesimpulan Analisa	Keterangan
$F_{hit} \leq F_{0.05}$	Tidak Berbeda Nyata	Tidak Ada Perbedaan Pengaruh Antara Perlakuan
$F_{hit} > F_{0.05}$	Berbeda Nyata	Ada Perbedaan Pengaruh Antara Perlakuan

Jika berpengaruh nyata, maka dilakukan uji lanjut dengan uji jarak berganda Duncan pada taraf nyata 5% dengan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan :

SSR = *Significant Stuendrized Range*

α = Taraf Nyata

dbg = Derajat Bebas Galat

p = *Range* (Perlakuan)

LSR = *Least Significant Range*

Apabila terjadi interaksi, untuk membedakan faktor P pada tiap-tiap taraf faktor C atau untuk membedakan faktor C pada tiap-tiap taraf faktor P, S_x diperoleh dengan rumus sebagai berikut :

$$S_x = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r}}$$

Apabila tidak terjadi interaksi, diperoleh dengan rumus sebagai berikut :

- 1) Untuk membedakan pengaruh faktor C (cekaman kekeringan) pada seluruh taraf faktor P dengan rumus :

$$S_x = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{ra}}$$

- 2) Untuk membedakan pengaruh faktor A (ekstrak kulit mangga) pada seluruh taraf faktor C dengan rumus :

$$S_x = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{rc}}$$

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Mangga

Ekstrak kulit buah mangga dibuat dengan cara sebagai berikut (Toyibah dan Taswin, 2020) :

- a. Kulit buah mangga yang telah dikumpulkan dari limbah toko jus buah dicuci bersih dengan air mengalir kemudian dikeringkan dengan cara dijemur tanpa terkena sinar matahari langsung selama 7 hari. Berat total kulit buah mangga sebelum dikeringkan sekitar 6,7 kg.
- b. Kulit buah mangga yang sudah kering *diblender* sampai menjadi serbuk. Setelah itu kulit buah mangga ditimbang. Didapati serbuk kering kulit buah mangga sebanyak 296,35 g dan dimasukkan ke dalam toples kaca yang telah dilapisi koran agar toples terhindar dari cahaya.
- c. Kemudian larutan etanol 96% ditambahkan ke dalam toples maserasi dengan perbandingan sampel : pelarut sebesar 1 : 10 (Noviyanty *dkk.*, 2021).

- d. Toples ditutup dan dibiarkan selama 3 hari di tempat gelap sambil sering diaduk, pengadukan dilakukan sebanyak 3 kali dalam 1 hari.
- e. Setelah 3 hari sampel disaring menggunakan kertas saring kemudian dibiarkan selama beberapa jam dan dituangkan ke wadah lain.
- f. Ekstrak cair yang didapatkan kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapatkan ekstrak kental.
- g. Setelah itu ekstrak kental diencerkan dengan berbagai konsentrasi sesuai kebutuhan perlakuan.

3.4.2 Aplikasi Perlakuan

Benih kedelai varietas Anjasmoro diperoleh dari Badan Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi (Balitkabi). Sebelum ditanam, benih diberi perlakuan invigorasi dengan direndam dalam air (kontrol) dan larutan antioksidan ekstrak kulit buah mangga dengan konsentrasi 1% dan 2%. Masing-masing perlakuan direndam selama 12 jam dengan volume perendaman 400 mL. Setelah mencapai waktu 12 jam benih kemudian dibersihkan menggunakan air dan dikering anginkan.

Setelah ditanam, ekstrak kulit buah mangga diaplikasikan dengan cara disemprotkan 30 mL cairan ekstrak kulit mangga pada setiap tanaman sesuai dengan konsentrasi perlakuan. Ekstrak kulit buah mangga diberikan pada hari ke – 10 setelah tanam dan hari ke – 20 setelah tanam.

Pengaturan volume penyiraman air sebagai perlakuan cekaman kekeringan dilakukan dengan penimbangan polibag. Volume penyiraman air disesuaikan dengan masing-masing taraf perlakuan dengan memperhatikan berat hasil penimbangan setiap polibag. Penyiraman dan penimbangan dilakukan sampai umur 30 HST.

1.4.3 Pengukuran Kapasitas Lapang

Kadar air kapasitas lapang didefinisikan sebagai kadar air tanah di lapang pada saat air drainase sudah berhenti atau hampir berhenti mengalir karena adanya gaya gravitasi setelah sebelumnya tanah tersebut mengalami jenuh sempurna (Haridjaja dkk., 2013). Pengukuran kapasitas lapang bertujuan untuk menentukan volume penyiraman sebagai perlakuan cekaman kekeringan. Kapasitas lapang ditentukan

dengan cara tanah 4 kg dimasukkan ke dalam polibag berdiameter 30 cm. Kemudian disiram air sampai jenuh dan didiamkan sampai tidak ada air yang menetes lagi. Berat basah ditimbang dan diperoleh berat 4600 g dan berat kering tanah sebesar 4000 g.

1.4.4 Persiapan Media Tanam

Tanah yang digunakan sebagai media tanam diperoleh dari area sekitar Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi kampus Mugarsari. Penanaman benih dilakukan pada polibag ukuran 30 cm x 30 cm sampai umur 30 HST. Setiap plot terdiri dari 6 polibag dengan 1 tanaman kedelai per polibag dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 ulangan untuk setiap perlakuan. Total polibag yang dibutuhkan sebanyak 162 polibag. Setiap polibag diisi dengan tanah sebanyak 4 kg.

1.4.5 Pemeliharaan

a. Pemupukan

Pemupukan dengan pupuk NPK (16:16:16) pada dosis rekomendasi 300 kg/ha, maka setiap polibag diberi pupuk NPK sebanyak 0,6 g (lampiran 4), pemupukan dilakukan pada hari ke-7 setelah tanam dengan cara disebar pada tepi polibag secara melingkar.

b. Penyiraman dan penimbangan polibag

Penyiraman dilakukan satu hari sekali pada pagi hari. Volume air yang diberikan sesuai dengan kapasitas berat polibag tiap perlakuan cekaman kekeringan yang telah diperhitungkan sebelumnya (lampiran 4).

c. Penjarangan

Penjarangan dilakukan 7 hari setelah tanam dengan mencabut tanaman yang tumbuh lebih dari satu dalam satu polibag.

d. Penyulaman

Penyulaman bertujuan untuk mengganti tanaman yang tidak tumbuh. Penyulaman dilakukan 7 hari setelah penanaman pertama.

e. Penyiangan

Penyiangan dilakukan secara manual untuk pada gulma yang tumbuh di sekitar tanaman kedelai. Penyiangan dimulai dari penanaman kedelai sampai berumur 30 HST.

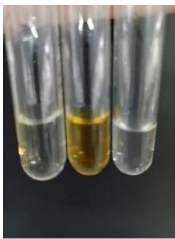

f. Pengendalian Organisme Pengganggu Tanaman





Pengendalian dilakukan pada tanaman yang terserang OPT. Pengendalian dilakukan secara manual dan dengan penggunaan insektisida sesuai petunjuk lapangan pengendalian OPT pada tanaman kedelai (Badan Penyuluhan Dan Pengembangan SDM Pertanian, 2015).

g. Pengujian Fitokimia Ekstrak Kulit Buah Mangga

Uji fitokimia terhadap ekstrak kulit buah mangga dilakukan untuk membuktikan ada tidaknya senyawa kimia tertentu secara kualitatif dalam ekstrak untuk dapat dikaitkan dengan aktivitas biologinya. Seluruh uji fitokimia yang dilakukan didasarkan pada buku Analisis Fitokimia (Hanani, 2016) dan *Phytochemical Screening* (Harvey, 1966). Prosedur pengujian ekstrak tersebut terlampir pada tabel 4.

Tabel 4. Prosedur pengujian fitokimia ekstrak kulit buah mangga

No.	Golongan Senyawa	Gambar	Pengujian dan Interpretasi Hasil
1	Alkaloid		Larutan uji sebanyak 0,5 g ditambahkan dengan 5 mL amonia 25% dan digerus dalam mortar, ditambahkan 20 mL kloroform. Campuran disaring. Lapisan air yang didapat dari penyaringan ditambahkan 2 tetes pereaksi <i>Dragendorff</i> dan <i>Mayer</i> . Hasilnya tidak didapati kekeruhan (kiri dan tengah) sehingga menunjukkan negatif alkaloid.
2	Tanin		Larutan uji sebanyak 1 mL direaksikan dengan penambahan gelatin 1% dan NaCl 10% menunjukkan tidak adanya endapan (kanan), hasil menunjukkan negatif.

3	Flavonoid		Sebanyak 1 mL larutan uji diuapkan hingga kering, sisanya dibasahkan dengan aseton P. Kemudian ditambahkan serbuk halus asam borat P dan asam oksalat P sedikit demi sedikit, dipanaskan di atas penangas air dengan menghindari pemanasan berlebih. Sisa yang diperoleh dicampur dengan 10 mL eter P. Diamati dengan sinar UV 366 nm. Hasilnya terbentuk warna kuning pada lapisan amil alkohol (lapisan atas) yang menunjukkan sampel positif flavonoid.
4	Saponin		Ekstrak etil asetat kulit buah mangga sebanyak 1 g ditambahkan air hangat di dalam tabung reaksi, dikocok kuat-kuat secara vertikal selama 10 detik. Busa terbentuk kurang dari 1 cm dan hilang dalam waktu 1 menit menunjukkan hasil negatif saponin.
5	Steroida		Dengan penambahan pereaksi Liebermann-Burchard terbentuk warna biru kehijauan menunjukkan positif steroida dan merah kecoklatan pada bagian tengah menunjukkan positif triterpenoida.
6	Triterpeno ida		
7	Polifenol		Dengan Penambahan larutan FeCl_3 1% terbentuk warna kehitaman (kiri) menunjukkan positif polifenol.

3.5 Parameter Pengamatan

3.5.1 Pengamatan Penunjang

Pengamatan penunjang bertujuan untuk mengetahui faktor-faktor lain yang tidak dianalisis secara statistik tetapi mungkin berpengaruh selama penelitian berlangsung. Pengamatan penunjang ini terdiri dari :

- Temperatur dan kelembaban udara
Suhu dan kelembaban udara diukur setiap hari dimulai setelah penanaman.
- Serangan Organisme pengganggu tanaman (OPT).

Pengamatan serangan OPT dilakukan setiap hari pada setiap tanaman untuk diidentifikasi dan diberikan perlakuan yang sesuai dengan hasil identifikasi. Pengamatan dimulai setelah penanaman.

c. Analisis fitokimia ekstrak kulit buah mangga

Analisis fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi ada atau tidaknya kandungan senyawa yang bersifat antioksidan pada ekstrak kulit buah mangga.

3.5.2 Pengamatan Utama

a. Volume akar (cm^3)

Volume akar diukur dengan cara memotong bagian akar tanaman kedelai yaitu dari pangkal akar hingga akar terpanjang tanaman kedelai. Kemudian akar tersebut dimasukkan ke dalam gelas ukur yang telah diisi air dengan volume awal 200 mL. Setelah akar dimasukkan, volume akar diambil dari kenaikan volume air tersebut. Pengukuran dilakukan pada umur ke-30 HST.

b. Tinggi tanaman (cm)

Tinggi tanaman diukur menggunakan meteran dari permukaan tanah atau pangkal batang sampai titik tumbuh tanaman kedelai pada saat tanaman berumur 30 HST.

c. Jumlah daun

Jumlah daun dihitung dari seluruh populasi tanaman kedelai pada saat tanaman berumur 30 HST.

d. Luas Daun Tanaman (cm^2)

Luas daun tanaman yang dimaksud adalah luas daun tanaman yang diukur dari tanaman sampel (Lampiran 3). Pengamatan dilakukan pada saat tanaman berumur 30 HST menggunakan aplikasi *image J*.

e. Kebocoran Membran Sel Daun (%)

Kebocoran membran sel daun dianalisis melalui perhitungan daya hantar listrik (DHL) menggunakan alat *conductivity* meter. Daun dari tanaman sampel dicuci menggunakan air (deionisasi). Daun tersebut diambil dari 3 daun teratas tanaman sampel. Kemudian dimasukkan ke dalam tube dan diberi air lalu ditutup,

selanjutnya disimpan pada suhu ruangan selama 24 jam. Lalu dilakukan pengukuran DHL (DHL-1) (Mariani, 2018).

Sampel tersebut lalu dipanaskan dengan suhu 95° C selama 20 menit, lalu disimpan pada suhu kamar. Kemudian diukur kembali DHL (DHL-2).

Setelah itu ukur kebocoran membran dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kebocoran membran sel daun} = \frac{\text{DHL 2} - \text{DHL 1}}{\text{DHL 1}} \times 100\%$$

Pengamatan ini dilakukan pada saat tanaman berumur 30 HST, yakni setelah sampel diberi perlakuan cekaman kekeringan (Hastilestari, 2015).

f. Kadar Air Relatif Daun (%)

Pengukuran kadar air relatif daun dilakukan dengan mengambil 4 helai daun dari tanaman sampel berumur 30 HST (Lampiran 3) kemudian ditimbang (bobot segar). Sampel daun selanjutnya direndam dengan aquades selama 5 jam kemudian bobot dalam keadaan turgid ditimbang (bobot jenuh). Sampel daun kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 60 °C - 80°C hingga bobotnya konstan lalu ditimbang (bobot kering) (Fitri dan Salam, 2017). Kadar air relatif daun dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{KAR} = \frac{\text{Bobot segar (g)} - \text{Bobot kering (g)}}{\text{Bobot jenuh (g)} - \text{Bobot kering (g)}} \times 100\%$$

g. Kadar Klorofil (mg/cm²)

Kadar klorofil diukur dari daun tanaman sampel yang diambil secara acak. Pengamatan dilakukan pada saat umur 30 HST menggunakan klorofil meter.

h. Bobot Kering Tanaman (g)

Bobot kering tanaman diukur dari tanaman sampel pada umur 30 HST. Penimbangan bobot kering dilakukan dengan cara membersihkan tanaman dari kotoran, lalu dikeringkan pada oven dengan suhu 60°C sampai bobotnya konstan kemudian ditimbang.