

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat percobaan

Percobaan dilakukan bertempat di Laboratorium Produksi Benih dan *Greenhouse* Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi serta Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Tasikmalaya pada bulan Januari 2026 sampai dengan Mei 2026. Ketinggian tempat percobaan adalah 333 mdpl dengan suhu sekitar 24 hingga 32°C, dimana tempat percobaan sesuai dengan syarat tumbuh tanaman kedelai.

3.2 Alat dan bahan percobaan

Alat yang digunakan dalam percobaan ini adalah *rotary evaporator, heating mantle, seed dryer, oven, erlenmeyer, beaker glass*, gelas ukur 1000 ml, 12 tabung reaksi, rak tabung reaksi, ember, spatula stainless, pipet tetes, kertas saring, chopper, corong buncher, saringan, ayakan mesh 40, toples kaca, kertas label, germinator, penggaris, gunting, amplop, *thermo hygrometer, moisture tester, waterbath*, nampan pengering, baki perkecambahan ukuran 32 cm x 24 cm, plastik klip, cup tertutup 300 ml, timbangan analitik, *hand sprayer, polybag* ukuran 40 cm x 40 cm, jangka sorong digital, alat tulis, kamera, lap/tissue, sarung tangan dan masker.

Bahan yang digunakan dalam percobaan ini adalah antioksidan alami dari buah andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC), benih kedelai varietas Grobogan, pelarut ethanol 96%, *arabic gum*, air suling atau aquades, alcohol 70%, pupuk N, P, dan K, tanah, pupuk kompos, aluminium foil, 1,1-diphenyl 1-2-picrylhydrazil, kloroform, ammonia pekat (28%), HCl 2N, pereaksi mayer, dragendroff, serbuk seng, HCl pekat, asam asetat anhidrat, H₂SO₄ pekat, aquadest, HCl encer, gelatin 1%, dan NaCl 1%.

3.3 Metode percobaan

Percobaan ini menggunakan metode eksperimen yang dirancang dengan rancangan petak terbagi (*split plot design*), dengan metode ekstraksi ditempatkan pada petak utama (*main plot*) dan taraf konsentrasi ditempatkan pada anak petak (*sub plot*). Petak utama terdiri dari 2 taraf dan anak petak terdiri dari 6 taraf.

Faktor ke 1 adalah metode ekstraksi (M) yang terdiri dari 2 taraf yaitu:

m₁ = Metode maserasi

m₂ = Metode sokletasi

Faktor ke 2 adalah konsentrasi (K) ekstrak buah andaliman sebagai bahan *seed coating* dengan berbagai taraf konsentrasi yaitu:

k₀ = Tanpa *seed coating*

k₁ = *Seed coating* 10%

k₂ = *Seed coating* 20%

k₃ = *Seed coating* 30%

k₄ = *Seed coating* 40%

k₅ = *Seed coating* 50%

Menurut Hanafiah dan Suhana (2009), penentuan banyaknya ulangan menggunakan rumus seperti berikut: $(t-1)(r-1) \geq 15$

Keterangan: t = Treatment/perlakuan

r = Replikasi/ulangan

Pada percobaan ini masing masing petak utama dan anak petak akan dikombinasikan sehingga didapatkan 12 kombinasi perlakuan. Masing masing kombinasi perlakuan akan diulang sebanyak 3 kali sehingga terdapat 36 satuan percobaan. Kombinasi perlakuan penelitian disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kombinasi perlakuan metode ekstraksi dengan konsentrasi ekstrak

Metode ekstraksi (M)	Konsentrasi ekstrak buah andaliman (K)					
	k ₀	k ₁	k ₂	k ₃	k ₄	k ₅
m ₁	kontrol	m ₁ k ₁	m ₁ k ₂	m ₁ k ₃	m ₁ k ₄	m ₁ k ₅
m ₂	kontrol	m ₂ k ₁	m ₂ k ₂	m ₂ k ₃	m ₂ k ₄	m ₂ k ₅

3.4 Analisis data

Model linear dari rancangan petak terbagi menurut (Gomez dan Gomez, 2015) sebagai berikut:

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

Dengan i = 1,2... a; j = 1,2..., b; k = 1,2..., r

Keterangan:

Y_{ijk} Hasil pengamatan pada satuan percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan taraf ke-I dan taraf ke-j dari faktor B

- μ Nilai rata-rata yang sesungguhnya (rata-rata populasi)
 α_i Pengaruh petak utama (faktor A) taraf ke- i
 β_j Pengaruh anak petak (faktor B) taraf ke- j
 $\alpha\beta_{ij}$ Pengaruh aditif dari taraf ke- i dari faktor A dan taraf ke- j dari faktor B
 γ_{ik} Pengaruh acak dari petak utama, yang muncul pada taraf ke- i dari faktor A dalam ulangan ke- k
 ϵ_{ijk} Pengaruh acak satuan percobaan ke- k yang memperoleh kombinasi pelakuan ij.
i 2 petak utama
j 6 anak petak
k 3 kali ulangan

Berdasarkan model linear di atas, maka disusun daftar sidik ragam sebagai berikut:

Tabel 2. Daftar sidik ragam

Sumber ragam	Db	JK	KT	Fhit	F 0,05
Ulangan	2	$\frac{\sum R^2}{mk} - FK$	$\frac{JKU}{db U}$		19,00
Metode ekstraksi (M)	1	$\frac{\sum A^2}{rk} - FK$	$\frac{JKM}{db M}$	$\frac{KT M}{KTg (a)}$	18,51
Galat (a)	2	$\frac{\sum rm^2}{k} - FK - JKU - JKM$	$\frac{JKg a}{dbg a}$		
Konsentrasi (K)	5	$\frac{\sum K^2}{rm} - FK$	$\frac{JKK}{db K}$	$\frac{KT K}{KTg (b)}$	2,71
Interaksi MxK	5	$\frac{\sum (MK)^2}{r} - FK - JKM - JKK$	$\frac{JK MxK}{db MxK}$	$\frac{KT MxK}{KTg (b)}$	2,71
Galat (b)	20	$JKT - JKU - JK M - JK$ $Galat (a) - JK K - JK MK$	$\frac{JKg b}{dbg b}$		
Total	35	$\sum X_{ij}^2 - FK$			

Kaidah pengambilan keputusan berdasarkan pada nilai F hitung dibandingkan dengan nilai F tabel (uji F) maka didapatkan sebagai berikut.

Tabel 3. Kaidah pengambilan keputusan

Hasil Analisis	Analisis	JK
$F_{\text{hit}} \leq F_{0,05}$	tidak berbeda nyata	tidak ada perbedaan pengaruh antara perlakuan
$F_{\text{hit}} > F_{0,05}$	berbeda nyata	terdapat perbedaan pengaruh antara perlakuan

Apabila data yang diperoleh terdapat perbedaan yang signifikan, maka analisis dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5% untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Rumus yang dilanjutkan adalah sebagai berikut:

$$LSR_{5\%} = SSR (\alpha_{5\%} \text{ dbg}) S_x$$

Keterangan:

LSR *Least Significant Range*

SSR *Studentized Significant Range*

α Taraf nyata 5%

dbg Derajat bebas galat

S_x Galat baku rata-rata

Perhitungan Galat Baku (S_x):

1. Untuk membedakan pengaruh faktor M (Metode ekstraksi) pada setiap taraf faktor K (Konsentrasi) dalam anak petak yang sama, rumusnya:

$$S_x = \sqrt{\frac{KT \text{ galat (b)}}{r}}$$

2. Untuk membedakan pengaruh faktor K (Konsentrasi) pada setiap taraf faktor M (Metode ekstraksi), rumusnya:

$$S_x = \sqrt{\frac{db \text{ B} \times KT \text{ g (b)} + KT \text{ g (a)}}{rb}}$$

Apabila tidak terdapat interaksi:

1. Untuk membedakan pengaruh faktor M (Metode ekstraksi) pada setiap taraf faktor K (Konsentrasi) dalam anak petak yang sama, rumusnya:

$$S_x = \sqrt{\frac{KT \text{ galat (a)}}{rb}}$$

2. Untuk membedakan pengaruh faktor K (Konsentrasi) pada setiap taraf faktor M (Metode ekstraksi), rumusnya:

$$S_x = \sqrt{\frac{KT \text{ galat (b)}}{ra}}$$

3.5 Pelaksanaan percobaan

3.5.1 Persiapan benih kedelai

Benih kedelai yang digunakan adalah benih kedelai varietas Grobogan yang merupakan salah satu varietas unggul kedelai dan banyak dibudidayakan di Indonesia. Benih kedelai berasal dari Balai Penyuluh Pertanian (BPP) Tawangsari, Kab. Sukoharjo, Jawa Tengah. Benih yang didapatkan kemudian dilakukan pelapisan benih menggunakan metode ekstraksi dan konsentrasi ekstrak buah andaliman dan disimpan dalam wadah cup tertutup berukuran 300 mL pada box penyimpanan selama 4 bulan hingga benih siap digunakan untuk penelitian.

3.5.2 Preparasi buah andaliman

Pembuatan serbuk simplisia buah andaliman yang diambil dari daerah Sumatera Utara dilakukan di Laboratorium Teknologi Produksi Benih, Fakultas Pertanian, Universitas Siliwangi. Penelitian yang telah dilakukan oleh Rienoviar, Heliawati, dan Khoiriyah, (2019) dalam pembuatan simplisia buah andaliman segar dibersihkan dari ranting dan daun, dicuci pada air mengalir lalu ditiriskan. Buah andaliman kemudian dikeringkan menggunakan seed dryer pada suhu 50°C selama 2 x 24 jam sehingga menghasilkan kadar air sekitar 7,50%. Buah andaliman kemudian dihaluskan menggunakan chopper dan diayak dengan ayakan mesh 40 hingga menghasilkan serbuk simplisia halus buah andaliman.

3.5.3 Ekstraksi buah andaliman

Ekstraksi dilakukan sesuai dengan perlakuan, pertama adalah metode ekstraksi dengan cara maserasi. Metode ekstraksi buah andaliman dengan metode

maserasi menggunakan pelarut ethanol 96%. Metode maserasi buah andaliman dengan pelarut ethanol 96% telah dilakukan oleh Rienoviar, Heliawati, dan Khoiriyah, (2019) dengan cara sebanyak 100 g serbuk kering buah andaliman ditimbang dan diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan 1 Liter pelarut ethanol 96% hasil destilasi. Proses maserasi berlangsung selama 3 x 24 jam dengan pengadukan setiap satu jam untuk meningkatkan efektivitas perendaman. Setelah proses tersebut, campuran disaring menggunakan corong kaca berlapis kertas saring hingga diperoleh filtrat yang kemudian diuapkan dengan rotary evaporator pada suhu 55°C sampai menghasilkan ekstrak kental. Ekstrak yang diperoleh kemudian diencerkan sesuai konsentrasi perlakuan yang telah ditentukan. Metode ekstraksi ini sejalan dengan prosedur yang dilakukan oleh Zumani dan Hakim (2024) tentang pembuatan ekstrak kulit manggis dengan metode maserasi. Ekstrak buah andaliman yang diperoleh dari metode maserasi, selanjutnya diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH (1,1 Diphenyl-2-Picryl Hydrazil). Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan yang terkandung dalam ekstrak buah andaliman berdasarkan kemampuan ekstrak dalam meredam radikal bebas dengan metode DPPH.

Kedua adalah metode ekstraksi dengan cara sokletasi. Metode ekstraksi buah andaliman dengan metode sokletasi menggunakan pelarut ethanol 96%. Metode sokletasi buah andaliman dengan pelarut ethanol 96% telah dilakukan oleh Rienoviar, Heliawati, dan Khoiriyah, (2019) dengan cara serbuk kering buah andaliman ditimbang sebanyak 100 g dan disokletasi dengan 1 Liter ethanol 96% hasil destilasi. Pelarut kemudian dipanaskan hingga mendidih sampai akhirnya uap pelarut mengalir ke kondensor, mengalami kondensasi, dan mengalir kembali ke dalam wadah ekstraksi. Hasil sokletasi tersebut selanjutnya diuapkan dengan rotary evaporator pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak yang diperoleh kemudian diencerkan sesuai konsentrasi perlakuan yang telah ditentukan. Metode ekstraksi ini sesuai dengan prosedur yang dilakukan oleh Zumani dan Hakim (2024) tentang pembuatan ekstrak kulit manggis dengan metode sokletasi. Ekstrak buah andaliman yang diperoleh dari metode sokletasi, selanjutnya diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH (1,1 Diphenyl-2-Picryl Hydrazil).

Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan yang terkandung dalam ekstrak buah andaliman berdasarkan kemampuan ekstrak dalam meredam radikal bebas dengan metode DPPH.

3.5.4 Persiapan bahan *coating*

Bahan *coating* yang digunakan pada penelitian ini yaitu ekstrak buah andaliman + aquadest + *arabic gum*. Konsentrasi *arabic gum* yang digunakan yaitu 10% atau 1 g *arabic gum* (Agustiansyah, Timotiwu, dan Rosalia, 2016). Ekstrak buah andaliman yang telah didapatkan dari hasil metode maserasi dan metode sokletasi kemudian diencerkan sesuai dengan taraf perlakuan konsentrasi. Pada konsentrasi 10% masing-masing metode ekstraksi diencerkan dengan mencampurkan 1 mL ekstrak + 9 mL aquadest + 1 g *arabic gum* kemudian larutan diaduk hingga homogen. Pada konsentrasi 20% masing-masing metode ekstraksi diencerkan dengan mencampurkan 2 mL ekstrak + 8 mL aquadest + 1 g *arabic gum* kemudian larutan diaduk hingga homogen. Pada konsentrasi 30% masing-masing metode ekstraksi diencerkan dengan mencampurkan 3 mL ekstrak + 7 mL aquadest + 1 g *arabic gum* kemudian larutan diaduk hingga homogen. Pada konsentrasi 40% masing-masing metode ekstraksi diencerkan dengan mencampurkan 4 mL ekstrak + 6 mL aquadest + 1 g *arabic gum* kemudian larutan diaduk hingga homogen. Pada konsentrasi 50% masing-masing metode ekstraksi diencerkan dengan mencampurkan 5 mL ekstrak + 5 mL aquadest + 1 g *arabic gum* kemudian larutan diaduk hingga homogen.

3.5.5 Teknik pelapisan benih

Benih kedelai ditimbang masing-masing sebanyak 100 g untuk setiap satuan perlakuan sehingga diperoleh 12 kombinasi perlakuan. Larutan *seed coating* disiapkan sesuai taraf konsentrasi dengan mencampurkan ekstrak buah andaliman hasil metode maserasi atau metode sokletasi + aquadest + 1 g *arabic gum* sebagai bahan perekat. Larutan *seed coating* yang telah disiapkan kemudian diaplikasikan pada benih kedelai, kemudian benih diaduk secara merata hingga seluruh permukaannya terlapisi bahan *seed coating*. Benih yang telah dilapisi selanjutnya dikeringanginkan dengan cara diratakan diatas baki pada suhu ruang hingga lapisan *seed coating* mengering.

3.5.6 Penyimpanan benih

Benih kedelai yang sudah diberi perlakuan *seed coating* kemudian disimpan dalam wadah cup tertutup ukuran 300 mL, diberi label sesuai perlakuan, dan disimpan didalam box penyimpanan benih pada suhu ruang selama 4 bulan. Pengamatan dilakukan setiap hari dengan mengamati temperatur dan kelembapan udara pada kondisi penyimpanan benih kedelai.

3.5.7 Penanaman benih di germinator

Uji viabilitas dan uji vigor benih dilakukan di dalam germinator dengan tata letak benih terlampir pada Lampiran 3. Pada uji vigor benih dilakukan menggunakan metode uji bata merah dalam baki perkecambahan ukuran 32 cm x 24 cm pada tanggal 4 sampai 11 Mei 2026. Setiap baki berisi 50 benih kedelai dan disimpan dalam germinator dengan satu germinator berisi 12 baki atau satu ulangan percobaan. Pada uji viabilitas benih dilakukan menggunakan media tanam tanah dalam baki perkecambahan ukuran 32 cm x 24 cm pada tanggal 18 sampai 25 Mei 2026. Setiap baki berisi 50 benih kedelai dan disimpan dalam germinator dengan satu germinator berisi 12 baki atau satu ulangan percobaan sehingga terdapat tiga germinator yang digunakan selama percobaan.

3.5.8 Penanaman benih di *green house*

Uji pertumbuhan awal dilaksanakan di *green house* dengan tata letak percobaan terlampir pada Lampiran 4 selama 28 hari dimulai dari tanggal 1 hingga 28 Mei 2026. Penanaman benih dilakukan menggunakan polybag berukuran 40 cm x 40 cm dengan setiap polybag berisi satu perlakuan. Kombinasi 2 petak utama dan 6 anak petak dengan 3 kali ulangan dilakukan dalam satu tahap sehingga terdapat 36 polybag unit percobaan. Luasan *green house* yang digunakan pada percobaan ini berukuran 3 m x 3 m dengan jarak antar polybag 10 cm dan jarak antar ulangan 20 cm.

3.6 Variabel pengamatan

3.6.1 Pengamatan penunjang

1. Uji fitokimia

Analisis fitokimia yang akan dilakukan terdiri dari analisis *alkaloid, flavonoid, triterpenoid, steroid, tanin, dan saponin*.

a. Uji *alkaloid*

Identifikasi *alkaloid* dilakukan dengan metode yang dilakukan oleh Rienoviar, Heliawati, dan Khoiriyah (2019) dan Santi dkk., (2008). Ekstrak buah andaliman yang dihasilkan dari masing masing metode ekstraksi ditimbang 100 mg masukkan ke dalam tabung reaksi, dibasakan dengan ammonia 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.

Bahan: Kloroform, ammonia pekat (28%), HCl 2 N, pereaksi *mayer*, dan *dragendorff*.

b. Uji *flavonoid*

Identifikasi *flavonoid* dilakukan dengan metode yang dilakukan oleh Rienoviar, Heliawati, dan Khoiriyah (2019) dan Santi dkk., (2008). Ekstrak buah andaliman yang dihasilkan dari masing masing metode ekstraksi ditimbang 100 mg masukan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 mL etanol 80% kemudian diaduk dan disaring. Filtrat ditambahkan 3-4 sendok spatula serbuk seng dan 0,5 mL HCl pekat. Terbentuknya warna jingga sampai merah yang dapat ditarik dengan amil alcohol atau oktil alcohol, menunjukkan adanya *flavonoid*.

Bahan: Serbuk seng, HCl pekat.

c. Uji *triterpenoid* dan *steroid*

Identifikasi *triterpenoid* dan *steroid* dilakukan dengan metode yang dilakukan oleh Rienoviar, Heliawati, dan Khoiriyah (2019). Ekstrak buah andaliman yang dihasilkan dari masing masing metode ekstraksi ditimbang 100 mg masukan ke dalam tabung reaksi, ditambah kloroform, kemudian fase kloroform dipisahkan dan diuapkan. Pada residu ditambahkan 3 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat (H_2SO_4) pekat (Liebermann-Burchard). Terbentuknya warna magenta atau

violet menunjukkan bahwa dalam simplisia terkandung senyawa kelompok triterpenoid. Adanya warna biru kehijauan menunjukkan adanya steroid.

Bahan: kloroform, asam asetat anhidrat, H_2SO_4 pekat.

d. Uji *tanin*

Identifikasi *tanin* dilakukan dengan metode yang dilakukan oleh Rienoviar, Heliawati, dan Khoiriyah (2019) dan Edeoga, Okwu, dan Mbaebie (2005). Ekstrak buah andaliman dari masing masing metode ekstraksi ditimbang sebanyak 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 alagitanin, sedangkan warna hijau atau biru kehijauan menunjukkan adanya *tanin* terkondensasi. Tabung ke 2 ditambahkan gelatin 1% (dalam 10% NaCl) terbentuk endapan menunjukkan adanya *tanin*.

Bahan: Gelatin 1%, NaCl 1%.

e. Uji *saponin*

Identifikasi *saponin* dilakukan dengan metode yang dilakukan oleh Rienoviar, Heliawati, dan Khoiriyah (2019) dan Santi dkk. (2008). Ekstrak buah andaliman dari masing masing metode ekstraksi ditimbang sebanyak 100 mg masukkan ke dalam tabung reaksi tambahkan 10 mL air kemudian diaduk dan dikocok kuat secara vertikal selama 30 detik. Apabila terbentuk buih dengan tinggi lebih dari 3 cm yang persisten selama 30 menit maka sampel mengandung saponin.

Bahan: aquadest, HCl encer.

2. Uji Antioksidan dengan metode DPPH

Prinsip kerja metode DPPH

Prinsip kerja metode DPPH adalah adanya atom hydrogen dari senyawa antioksidan yang berikatan dengan electron bebas pada senyawa radikal sehingga menyebabkan perubahan dari radikal bebas (*diphenylpicrylhydrazyl*) menjadi senyawa non-radikal (*diphenylpicrylhydrazine*). Hal ini ditandai dengan perubahan warna dari ungu menjadi kuning (senyawa radikal bebas tereduksi oleh adanya antioksidan) yang dapat diukur penurunan absorbansinya DPPH pada panjang gelombang 517 nm (Damanis, Wewengkang, dan Antasionasti, 2020).

Pembuatan larutan stok DPPH

- Sebanyak $15 \pm 0,02$ mg DPPH ditimbang menggunakan kaca arloji.
- DPPH yang telah ditimbang dipindahkan ke dalam labu ukur berukuran 10 mL.
- Metanol ditambahkan hingga mencapai tanda batas, kemudian larutan dihomogenkan. Selanjutnya, labu ukur ditutup menggunakan aluminium foil untuk melindungi larutan dari paparan cahaya sehingga diperoleh larutan DPPH dengan konsentrasi 1500 mg/L. Larutan kemudian dipindahkan ke dalam botol vial berwarna cokelat.
- Larutan DPPH 1500 mg/L diencerkan sebanyak 10 kali hingga diperoleh larutan DPPH dengan konsentrasi 150 mg/L.
- Larutan DPPH yang telah diencerkan dipindahkan ke dalam botol vial coklat.
- Larutan DPPH dibuat dalam keadaan segar sebelum dilakukan pengujian.

Pembuatan larutan induk sampel

- Sebanyak 10-100 mg ekstrak kental ditimbang menggunakan kaca arloji, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur berukuran 10 mL.
- Metanol ditambahkan hingga mencapai tanda batas, kemudian larutan dihomogenkan.
- Sebanyak 1 mL larutan induk diambil dan dipindahkan ke dalam labu ukur berukuran 10 mL, kemudian metanol ditambahkan hingga mencapai tanda batas.

Prosedur pengujian

- Larutan induk sampel diencerkan menjadi 5 variasi konsentrasi bertingkat (termasuk pelarut metanol sebagai blanko), lakukan duplo.
- Sebanyak 1,0 mL larutan DPPH 150 mg/L ditambahkan ke dalam setiap larutan sampel hingga volume akhir larutan mencapai 5,0 mL.
- Larutan blanko disiapkan dengan mencampurkan 4,0 mL metanol dan 1,0 mL larutan DPPH 150 mg/L.
- Seluruh larutan dihomogenkan.
- Larutan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit.
- Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm.

- g. Persentase inhibisi (% inhibisi) setiap konsentrasi sampel dihitung berdasarkan hasil pengukuran absorbansi.
- h. Nilai slope dan intercept diperoleh dari kurva regresi linier.
- i. Nilai antioksidan IC₅₀ dihitung untuk setiap ulangan.
- j. Nilai aktivitas antioksidan dinyatakan sebagai rata-rata nilai IC₅₀ dari seluruh ulangan.

Perhitungan dan pengolahan data

- a. Persentase inhibisi dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A \text{ kontrol} - A \text{ sampel}}{A \text{ kontrol}} \times 100\%$$

- b. Hasil perhitungan dimasukkan dalam persamaan regresi linier dengan konsentrasi ekstrak (mg/L) sebagai absis (sumbu x) dan nilai % aktivitas inhibisi sebagai koordinatnya (sumbu y) nilai IC₅₀ dihitung dengan persamaan $y = ax + b$.

3. Temperatur udara dan kelembapan udara

Salah satu pengamatan penunjang dalam percobaan ini adalah temperatur dan kelembapan udara. Pengamatan temperatur dan kelembapan udara selama percobaan dilakukan selama masa penyimpanan, uji viabilitas, uji vigor, dan uji pertumbuhan awal benih kedelai. Temperatur dan kelembapan udara merupakan salah satu faktor eksternal yang menentukan laju kemunduran fisiologis benih selama masa simpan dan pertumbuhan tanaman. Menurut Iskandar (2016), temperatur dan kelembapan salah satu faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap pertumbuhan untuk biji agar dapat berkecambah dengan normal.

4. Organisme pengganggu tanaman (OPT)

Pengamatan penunjang lainnya dalam percobaan ini adalah keberadaan organisme pengganggu tanaman (OPT) yang merupakan hewan atau tumbuhan baik berukuran mikro ataupun makro yang mengganggu, menghambat, bahkan mematikan tanaman yang dibudidayakan seperti hama, penyakit, dan gulma. Pengamatan penunjang ini bertujuan untuk mengetahui jenis-jenis hama, penyakit, dan gulma yang menyerang tanaman kedelai selama pertumbuhan vegetatif tanaman.

3.6.2 Pengamatan utama

Benih yang diuji adalah benih yang telah diberikan perlakuan pelapisan benih (*seed coating*) dengan metode ekstraksi dan konsentrasi ekstrak buah andaliman. Variabel pengamatan utama terdiri dari uji viabilitas, uji vigor, dan uji pertumbuhan awal setelah benih disimpan selama 4 bulan. Pengamatan utama merupakan pengamatan yang datanya dianalisis secara statistik. Pengamatan ini dilakukan hingga 28 HST dengan parameter yang diamati adalah:

1. Uji viabilitas benih kedelai

Uji viabilitas benih kedelai dilakukan selama 7 hari setelah tanam pada baki perkecambahan berukuran 32 cm x 24 cm di dalam germinator dengan parameter pengamatan yaitu daya berkecambah benih, kecepatan berkecambah, panjang hipokotil, panjang radikula, dan bobot kering kecambah.

a. Daya berkecambah benih (%)

Pengujian daya berkecambah benih merupakan persentase jumlah benih yang mampu berkecambah normal menjadi tanaman pada kondisi lingkungan yang sesuai selama periode pengujian tertentu (Sutopo, 2017). Daya berkecambah diamati pada benih-benih yang berkecambah normal dan dilakukan pada hari ke-7 HST.

Menurut Megawati (2022) rumus perhitungan daya kecambah (DB) adalah sebagai berikut:

$$DB = \frac{\text{Jumlah benih yang berkecambah}}{\text{Jumlah benih yang dikecambahkan}} \times 100\%$$

b. Kecepatan berkecambah (%/etmal)

Kecepatan berkecambah dihitung berdasarkan biji yang berkecambah normal setiap hari sampai hari ke-7 setelah tanam. Penghitungan kecambah normal pada setiap pengamatan dibagi dengan etmal (1 etmal = 24 jam). Menurut Widajati, Sari, dan Utami (2014) rumus kecepatan berkecambah sebagai berikut:

$$Kct = \sum_{i=1}^n \frac{(KN)i}{Wi}$$

Keterangan: Kct = Kecepatan berkecambah

i = hari pengamatan

KN_i = Kecambah normal pada hari ke- i (%)

W_i = waktu (etmal) pada hari ke- i

c. Panjang hipokotil (cm)

Hipokotil merupakan struktur yang memanjang selama proses perkecambahan dan berfungsi mengangkat kotiledon ke permukaan. Pengamatan panjang hipokotil merupakan pengukuran terhadap bagian kecambah yang terletak antara radikula (calon akar) dan kotiledon. Panjang hipokotil diukur menggunakan alat ukur dengan ketelitian 0,01mm (Zumani dan Hakim 2024). Pengukuran panjang hipokotil diambil dari 10 sampel tanaman yang ditentukan secara acak dari setiap perlakuan dan ulangan. Pengamatan panjang hipokotil dilakukan pada saat akhir pengamatan atau pada hari ke-7 setelah tanam.

d. Panjang radikula (cm)

Radikula adalah bagian dari embrio tumbuhan yang tumbuh selama proses perkecambahan dan akan berkembang menjadi akar utama. Panjang radikula diukur menggunakan alat ukur dengan ketelitian 0,01 mm (Zumani dan Hakim 2024). Pengamatan panjang radikula dilakukan pada tanaman sampel dengan cara membongkar kecambah dan membersihkannya dengan air mengalir hingga sisa media menjadi bersih, setelah itu dikeringkan. Pengamatan panjang radikula diambil dari 10 sampel tanaman yang ditentukan secara acak dari setiap perlakuan dan ulangan. Pengamatan panjang radikula dilakukan pada saat akhir pengamatan atau pada hari ke-7 setelah tanam.

e. Bobot kering kecambah normal (g)

Bobot kering kecambah normal (BKKN) merupakan bobot dari semua kecambah normal yang telah dbuang kotiledonnya (Zumani dan Suryaman, 2020). Penimbangan bobot kering kecambah normal dilakukan dengan mencabut 10 sampel kecambah yang telah ditentukan secara acak dan membersihkan akar dari sisa media yang masih menempel. Kecambah dimasukkan kedalam amplop dan kemudian dikeringkan pada oven dengan suhu 60°C selama 2 x 24 jam. Penimbangan bobot kering kecambah ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik. Pengujian ini dilakukan pada saat akhir pengamatan atau pada hari ke-7 setelah tanam.

2. Uji vigor benih kedelai

Uji vigor benih kedelai dilakukan selama 7 hari setelah tanam pada baki perkecambahan berukuran 32 cm x 24 cm di dalam germinator dengan parameter pengamatan yaitu benih vigor, non vigor, dan benih mati.

a. Benih vigor (%)

Pengamatan terhadap benih vigor diamati pada akhir pengamatan yaitu pada hari ke-7 setelah tanam.

Ciri kecambah normal (vigor) adalah sebagai berikut:

1. Kecambah yang memiliki perkembangan sistem perakaran yang baik terutama akar primer dan untuk tanaman yang secara normal menghasilkan akar seminal lebih dari dua.
2. Perkembangan hipokotil yang baik dan sempurna tanpa ada kerusakan pada jaringan-jaringannya.
3. Plumula tumbuh dari koleoptil atau epikotil yang sempurna dengan kuncup yang normal (Sutopo, 2017)

Benih vigor pada kecambah benih kedelai dihitung berdasarkan persentase benih yang tumbuh secara normal pada plot percobaan yang dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Benih vigor} = \frac{\text{Jumlah kecambah normal}}{\text{Jumlah benih yang dikecambahkan}} \times 100\%$$

b. Benih non vigor (%)

Kecambah non vigor merupakan kecambah yang tidak memperlihatkan potensi untuk berkembang menjadi kecambah normal (vigor). Pengamatan terhadap benih non vigor diamati pada akhir pengamatan yaitu pada hari ke-7 setelah tanam.

Ciri dari kecambah benih non vigor menurut Merbau dan mindi (2009) adalah:

1. Hipokotil pendek, kecil, hingga tidak ada.
2. Akar primer kecil, sangat pendek, atau bercabang tidak normal
3. Tidak terbentuk plumula/kotiledon secara lengkap

Benih non vigor pada kecambah benih kedelai dihitung berdasarkan persentase benih yang tumbuh secara non vigor pada plot percobaan yang dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Benih non vigor} = \frac{\text{Jumlah kecambah abnormal}}{\text{Jumlah benih yang dikecambahkan}} \times 100\%$$

c. Benih mati (%)

Benih tidak tumbuh (mati) dapat dilihat pada benih-benih yang belum tumbuh hingga batas waktu pengujian yang telah ditentukan dan dilaksanakan pada akhir pengamatan (Sutopo, 2017). Pengamatan terhadap benih mati diamati pada akhir pengamatan yaitu pada hari ke-7 setelah tanam.

Rumus yang digunakan untuk menghitung benih yang mati adalah sebagai berikut:

$$\text{Benih mati} = \frac{\text{Jumlah kecambah mati}}{\text{Jumlah benih yang dikecambahkan}} \times 100\%$$

3. Uji pertumbuhan awal

Uji pertumbuhan awal dilakukan selama fase vegetative tanaman kedelai atau selama 28 hari setelah tanam dengan parameter yaitu tinggi tanaman, luas daun tanaman, dan jumlah cabang tanaman. Pengamatan uji pertumbuhan awal dilakukan pada umur 14 HST, 21 HST, dan 28 HST. Pertumbuhan awal benih kedelai dilakukan didalam *greenhouse* berukuran 3 m x 3 m dengan menggunakan polybag berukuran 40 cm x 40 cm.

a. Tinggi per tanaman (cm)

Tinggi tanaman diperoleh dengan mengukur tanaman menggunakan alat ukur panjang dengan ketelitian 0,1 mm, pengukuran dilakukan dari pangkal batang hingga titik tumbuh tertinggi pada 14, 21, dan 28 hari setelah tanam. Pengamatan tinggi tanaman diambil dari 1 tanaman pada setiap perlakuan dan ulangnya.

b. Luas daun per tanaman (cm²)

Pengukuran luas daun per tanaman dilakukan selama fase vegetative atau 14, 21, dan 28 hari setelah tanam saat tanaman memiliki 2 atau 3 daun trifoliate sejati yang sudah membuka sempurna. Pengukuran laus daun per tanaman dilakukan dengan mengambil foto daun per tanaman kemudian diukur menggunakan aplikasi *ImageJ*. Pengamatan luas daun per tanaman diambil dari 1 tanaman pada setiap perlakuan dan ulangnya.

c. Jumlah cabang per tanaman

Pengamatan jumlah cabang per tanaman dilakukan selama fase vegetative atau 14, 21, dan 28 hari setelah tanam. Pengamatan jumlah cabang per tanaman dilakukan dengan menghitung jumlah cabang per tanaman. Pengamatan jumlah cabang per tanaman diambil dari 1 tanaman pada setiap perlakuan dan ulangnya.