

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu percobaan

Percobaan ini dilaksanakan di Laboratorium Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Tasikmalaya, Laboratorium STIKes Muhammadiyah Ciamis dan pada lahan Kebun Percobaan Fakultas Pertanian di Desa Mugarsari, Kecamatan Tamansari, Kota Tasikmalaya, dimulai pada bulan Oktober 2019 sampai bulan Mei 2020.

3.2 Bahan dan alat percobaan

Bahan yang digunakan dalam percobaan ini adalah benih kedelai, ekstrak daun manggis (daun manggis dan etanol 90%), aquadest, DPPH, alkohol 70%, larutan NaCl p.a, tanah, air, pupuk kimia NPK mutiara 16:16:16, pupuk kandang domba dan pestisida (insektisida fipronil 50g/l dan Moluskisida piklosamida 250g/l).

Alat-alat yang digunakan adalah blender, kertas filter, ayakan 40 mesh, cawan petri, spatula, tabung reaksi, gelas erlemeyer, gelas ukur, corong, tabung kaca, pipet, rotary evaporator, spektrofotometer, baki tanam ukuran 32 cm x 24 cm, polybag ukuran 35 cm x 30 cm, cangkul, ayakan bambu, sprayer, Ec meter, klorofilmeter, timbangan digital, mistar/meteran, sarung tangan, cangkul, papan label, alat tulis dan alat-alat yang diperlukan lainnya.

3.3 Metode penelitian

Metode yang digunakan dalam percobaan ini adalah metode eksperimental, dengan rancangan acak kelompok (RAK) pola faktorial dengan 3 kali ulangan dan setiap ulangan terdiri dari 9 kombinasi perlakuan.

Faktor pertama yaitu konsentrasi ekstrak daun manggis (M) yang terdiri dari 3 taraf :

$m_1 = 13$ ppm

$m_2 = 26$ ppm

$m_3 = 39$ ppm

Faktor kedua yaitu pemberian cekaman NaCl (C) yang terdiri dari 3 taraf konsentrasi:

$$c_1 = 0 \text{ ppm}$$

$$c_2 = 3000 \text{ ppm}$$

$$c_3 = 6000 \text{ ppm}$$

Dari 2 faktor tersebut diperoleh 9 kombinasi perlakuan seperti tersaji pada tabel berikut:

Tabel 2. Kombinasi Perlakuan ekstrak daun manggis dan Larutan NaCl

Ekstrak daun manggis (M)	Larutan NaCl (C)		
	c ₁	c ₂	c ₃
m₁	m ₁ c ₁	m ₁ c ₂	m ₁ c ₃
m₂	m ₂ c ₁	m ₂ c ₂	m ₂ c ₃
m₃	m ₃ c ₁	m ₃ c ₂	m ₃ c ₃

Berdasarkan rancangan yang digunakan, maka dapat dikemukakan model linier sebagai berikut : $X_{ijk} = \mu + p_i + M_j + C_k + (MC)_{jk} + \varepsilon_{ijk}$.

Keterangan :

X_{ijk} = Nilai hasil pengamatan pada kelompok ke-i faktor konsentrasi ekstrak manggis dan konsentrasi NaCl ke-k.

μ = Harga rata-rata umum

p_i = Pengaruh kelompok ke-i.

m_j = Pengaruh faktor konsentrasi ekstrak daun manggis taraf ke-j. ulangan ke-j.

c_k = Pengaruh faktor konsentrasi larutan NaCl taraf ke-k.

$(mc)_{jk}$ = Pengaruh interaksi faktor konsentrasi ekstrak kulit manggis taraf ke-j dengan faktor konsentrasi larutan NaCl taraf ke-k.

ε_{ijk} = komponen random dari galat yang berhubungan dengan faktor sistem konsentrasi ekstrak kulit manggis dan faktor konsentrasi larutan NaCl taraf ke-k.

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

Tabel 3. Daftar Sidik Ragam

Sumber ragam	DB	JK	KT	Fh	F0,05
Ulangan (r)	2	$\sum(x_{i..})^2 / t - (x_{..})^2 / rt$	JK1/DB1	KT1/KT6	3.63
Perlakuan (t)	8	$\sum(x_{.jk})^2 / r - (x_{..})^2 / rt$	JK2/DB2	KT2/KT6	2.59
Ekstrak daun manggis (M)	2	$\sum(x_{.ij})^2 / r c - (x_{..})^2 / rt$	JK3/DB3	KT3/KT6	3.63
NaCl (C)	2	$\sum(x_{.ik})^2 / r m - (x_{..})^2 / rt$	JK4/DB4	KT4/KT6	4.63
Interaksi (MC)	4	Jk(p)- jk(m)- jk(c)	JK5/DB5	KT5/KT6	3.01
Galat	15	Jk(t)- jk(u)- jk(p)			
Total	23	$\sum(x_{ijk})^2 - \sum x_{..}^2 / rt$			

Sumber : Warsa dan Achyar (1982).

Kaidah keputusan didasarkan pada nilai F hitung yang tercantum pada tabel 3.

Tabel 4. Kaidah Pengambilan Keputusan.

Hasil analisa	Kesimpulan analisa	Keterangan
$F_h \leq F_{0,5}$	Tidak berbeda nyata	Tidak ada perbedaan pengaruh antara perlakuan.
$F_h > F_{0,5}$	Berbeda nyata	Ada perbedaan pengaruh antara perlakuan

Apabila hasil uji F menunjukkan perbedaan yang nyata, maka dilakukan uji lanjut dengan uji jarak berganda Duncan pada 5 persen dengan rumus :

$$LSR = SSR \times S_x$$

Nilai S_x dapat dicari dengan rumus sebagai berikut :

1. Bila terjadi interaksi menggunakan rumus :

$$S_{xMN} = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r}}$$

2. Bila tidak terjadi interaksi menggunakan rumus :

- Factor ekstrak daun manggis (M)

$$S_{xN} = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r.c}}$$

- Factor NaCl (C)

$$S_x C = \sqrt{\frac{KT Galat}{r.m}}$$

Keterangan :

LSR	=	Least Significant Ranges
S_x	=	Simpangan baku rata- rata
SSR	=	Significant Studentzed Ranges
KT	=	Kuadrat Tengah
R	=	Ulangan
MC	=	konsentrasi ekstrak daun manggis + konsentrasi NaCl.

3.4 Pelaksanaan percobaan

3.4.1 Ekstraksi daun manggis dan aplikasi ekstraknya

Proses ekstraksi daun manggis menggunakan metode maserasi dengan etanol sebagai bahan pelarutnya. Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan, cara ini sesuai, baik untuk skala kecil maupun skala industry (Agoes, 2007 dalam Mukhriani, 2014). Ekstrak daun manggis dibuat dengan cara 3 kg daun manggis dicuci dengan air untuk membersihkan dari material lain, selanjutnya diangin-anginkan dan dikeringkan dibawah matahari dan ditutupi dengan kain hitam agar tidak terkena sinar matahari langsung. Pengeringan dilakukan hingga kadar air kurang dari 10% atau sampai daun manggis mudah untuk dihancurkan ketika diremas. Daun yang telah kering dibuat serbuk melalui proses penggilingan dan pengayakan. Serbuk kering ditimbang 500 gram kemudian dimaserasi. Maserasi dilakukan dengan cara merendam simplisia dalam etanol 70% dengan perbandinga 1:10 (Diniatik, *et al* 2016). Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan menggunakan rotary evaporator. Berdasarkan hasil penelitian (Wijayanti, *et al.*, 2016) waktu maserasi kulit buah manggis yang optimum adalah dengan perendaman selama 24 jam dengan kadar alfa mangostin pada spot adalah sebesar 3031,34 ng.

Untuk membuat perlakuan ekstrak daun manggis, dicari terlebih dahulu IC_{50} dari ekstrak tersebut dengan menggunakan uji DPPH, dimana IC_{50} berada pada 12.803 ppm dibulatkan menjadi 13 ppm. Untuk membuat larutan 13 ppm, 26 ppm

dan 39 ppm, dibuat larutan induk 1000 ppm dimana 1 gram ekstrak kering daun manggis dilarutkan dengan 2 ml alkohol 70% lalu ditambahkan aquadest 1000 ml. Dibuatkan larutan standar 13 ppm dalam 500 ml, 26 ppm dalam 500 ml dan 39 ppm dalam 500 ml sebagai perlakuan. Biji kedelai direndam dalam ekstrak daun manggis selama 24 jam sesuai perlakuan. Setelah proses perendaman biji kedelai dikeringanginkan dan ditanam pada media tanam.

3.4.2 Pengukuran aktivitas antioksidan dengan uji DPPH (*2,2-difenil-1-fikrilhidrazil*)

100 mikroliter dari seri konsentrasi perasan daun manggis 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 800 ppm kemudian di masukan dalam labu takar 10 ml ditambahkan 1,0 ml DPPH 0,002 % di tambahkan metanol hingga tanda, jadi masing-masing seri konsentrasi untuk perasan daun manggis yaitu 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm, dan 8 ppm. Setelah diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang, absorbansi dibaca pada λ max menggunakan blanko, penghambatan radikal bebas dari DPPH dalam persen (I%) dihitung menggunakan rumus: $I\% = (\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}) / \text{Absorbansi blanko} \times 100$, dimana absorbansi blanko adalah absorbansi dari reaksi control (mengandung semua reagen kecuali sampel), dan absorbansi sampel adalah absorbansi dari senyawa yang diuji. Konsentrasi perasan dan fraksi yang menunjukkan 50% hambatan (IC_{50}) dihitung dari kurva hubungan persentase hambatan dengan konsentrasi sampel. Senyawa antioksidan alami yang digunakan sebagai kontrol positif adalah vitamin C (Gulluce dkk, 2006 dalam Aldi, Oktavia dan Yenni, 2016).

3.4.3 Pembuatan larutan NaCl

Larutan NaCl yang digunakan sebagai cekman sanilitas dibuat dengan cara melarutkan NaCl p.a kedalam air hingga masing-masing mencapai konsentrasi 3000 ppm dan 6000 ppm. Larutan garam dibuat dengan menimbang padatan garam, 3 gram untuk konsentrasi 3000 ppm dan 6 gram untuk konsentrasi 6000 ppm. Masing-masing garam yang telah ditimbang kemudian dimasukkan kedalam gelas kimia volume 500 ml dan diencerkan dengan aquadest. Masing-masing larutan garam 500 ml kemudian dimasukkan kedalam labu ukur volum 1000 ml dan ditambahkan aquadest hingga batas (Amartani, 2019).

3.4.4 Perlakuan pada perkecambahan

Benih yang telah diberi perlakuan invigorasi lalu ditanam pada media tumbuh yang terdiri dari tanah *top soil* dan porasi dengan perbandingan 2:1: yang kemudian disusun dalam baki perkecambahan berukuran 32 cm x 24 cm, baki perkecambahan diberi label sesuai dengan perlakuan. Selanjutnya media tumbuh diberi perlakuan cekaman salinitas dengan disiram sesuai perlakuan. Penanaman benih dilakukan secara teratur dalam barisan dengan jarak yang sama yaitu 2 cm x 3 cm pada baki perkecambahan menggunakan stik bambu dengan kedalaman 2 cm. Jumlah biji yang ditanam 1 biji per lubang tanam. Perlakuan salinitas diberikan satu hari setelah tanam dan dilakukan setiap 2 hari sekali sebanyak 200 ml larutan NaCl (Sobir, Miftahudin dan Helmi, 2018) selama 8 hari. Selanjutnya dilakukan pemeliharaan dan pengamatan, hingga tahap perkecambahan selesai.

3.4.5 Pemberian perlakuan dan penanaman benih pada polibag

Tanah yang diambil dari lapisan *topsoil* dengan kedalaman 0-20 cm, ditambah pupuk kandang domba dengan perbandingan 4:1 kemudian diayak dan dikeringkan selama 3 hari. Masing-masing polibag diisi 5 kg. Kemudian benih yang telah diberi perlakuan invigorasi ditanam pada polibag tersebut. Perlakuan salinitas diberikan satu hari setelah tanam dan dilakukan setiap 4 hari sekali sebanyak 300 ml larutan NaCl (Sobir dkk., 2018), selama 30 hari. Selanjutnya dilakukan pemeliharaan dan pengamatan, hingga tahap pertumbuhan vegetatif selesai.

3.4.6 Pemeliharaan

Pemeliharaan tanaman kedelai meliputi :

1). Penyiraman

Penyiraman dilakukan setiap hari pagi dan sore hari dan sesuai kebutuhan tanaman dan keadaan media pada polybag (300 ml).

2). Penyiangan

Penyiangan dilakukan dengan mencabut gulma yang tumbuh pada polibag.

3.5 Pengamatan

3.5.1 Pengamatan penunjang

Pengamatan penunjang adalah pengamatan yang datanya tidak dianalisis secara statistik, pengamatan ini meliputi analisis tanah, analisis daya hantar listrik NaCl dan analisis ekstrak daun manggis.

3.5.2 Pengamatan utama

Pengamatan utama adalah pengamatan yang datanya dianalisis secara statistik, pengamatan utama dilakukan pada semua sampel setiap perlakuan.

Pengamatan utama meliputi :

1). Daya berkecambah (DB)

Daya kecambah ditentukan dengan jumlah benih yang sudah berkecambah normal yang dicirikan dengan munculnya dua daun. Menurut Sadjad, (1999) dalam Sutia, E dan Sofwan, B (2014). Daya kecambah menjabarkan parameter viabilitas potensial dan rumus daya berkecambah (DB) adalah :

$$PT = \frac{\sum KN}{\sum N} \times 100\%$$

KN : Jumlah benih yang menjadi kecambah normal

N : Jumlah benih yang ditanam

2). Kecepatan tumbuh (KcT)

Nilai kecepatan tumbuh dihitung berdasarkan jumlah pertumbuhan kecambah normal setiap hari sampai hari terakhir (hari ke-7) yang dinyatakan dalam persen per hari. Perumusan dengan menggunakan persamaan berikut :

$$KcT = \frac{N1}{W1} + \frac{N2}{W2} + \dots + \frac{Nn}{Wn}$$

Keterangan :

N1-Nn = Pengamatan (n= 1,2,3 dan seterusnya)

W1-Wn = Waktu Pengamatan (n= 1,2,3 dan seterusnya).

3). Panjang epikotil

Panjang epikotil diukur dari kecambah normal dengan penggaris dimulai dari leher akar sampai dengan pangkal kotiledon pada 10 sampel benih setiap satuan percobaan dengan pemilihan sampel secara acak.

4). Panjang hipokotil

Panjang hipokotil diukur dari kecambah normal dengan penggaris mulai dari pangkal kotiledon sampai dengan pangkal tangkai daun pertama pada 10 sampel benih setiap satuan percobaan dengan pemilihan sampel secara acak.

5). Bobot kering kecambah

Untuk mengetahui bobot kering kecambah dilakukan dengan cara mengambil semua kecambah sesuai perlakuan pada baki perlakuan, kemudian kecambah dibersihkan dari kotoran, kecambah dijemur sampai kering matahari kemudian dioven pada suhu 85°C sampai berat tetap, setelah 24 jam. Ditimbang dengan timbangan analitik dengan ketelitian 2 angka dibelakang koma dalam gram.

6). Kebocoran membran

Untuk mengetahui kebocoran membran kecambah 6 buah kecambah normal diambil dari petak percobaan, kemudian direndam dalam air aquades selama 24 jam kemudian air rendaman tersebut diukur menggunakan Ec meter.

7). Tinggi tanaman

Tinggi tanaman adalah rata-rata tinggi tanaman yang diukur dari pangkal tanaman yang berada diatas permukaan tanah hingga ujung tanaman, yang diukur pada 2 minggu, 3 minggu dan 4 minggu setelah tanam.

8). Jumlah klorofil daun

Pengukuran kadar klorofil daun pada penelitian ini menggunakan klorofil meter DUALEX. Daun yang akan diukur klorofilnya dijepit pada bagian sensor alat. Sensor alat ditempatkan dibagian pangkal, tengah dan ujung daun secara acak pada bagian jaringan mesofil daun dan menghindari tulang daun. Pengukuran Klorofil daun pada penelitian ini, berdasarkan arah cahaya matahari yaitu arah timur pada saat pengukuran pagi hari dan arah barat pada saat pengukuran sore hari. Pengukuran dilakukan antara jam 8.00 – 10.00 sedangkan pada sore hari antara jam 16.00 – 18.00 sore (Zakiyah, Manurung, dan Wulandari. 2018).

9). Luas daun

Perhitungan luas daun dilakukan pada seluruh daun tanaman sampel saat akhir masa vegetatif tanaman (30 HST) dengan menggunakan alat pengukur daun (Leaf Area Meter).

10). Kadar air relatif daun (KARD)

Pengukuran kadar air relatif daun dilakukan dengan mengambil 3 bagian daun dari setiap perlakuan kemudian ditimbang (Bobot segar atau bobot basah). Sampel daun selanjutnya direndam dalam aquades 20 jam dan bobot dalam keadaan turgid kemudian ditimbang (Bobot turgid atau bobot jenuh). sampel daun kemudian dikeringkan dalam oven selama 24 jam pada suhu 85⁰C hingga bobotnya konstant lalu ditimbang (Bobot kering). Kadar air relatif daun dihitung dengan rumus sebagai berikut :

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

11). Panjang akar

Panjang akar adalah rata-rata panjang akar yang diukur menggunakan meteran dari pangkal tanaman yang berada dibawah tanah hingga ujung akar.

12). Bobot kering batang

Untuk mengetahui bobot kering batang dilakukan dengan cara mengambil tanaman sampel pada setiap ulangan, kemudian tanaman dibersihkan dari kotoran, batang dipisahkan dari cabang kemudian dijemur sampai kering matahari kemudian dioven pada suhu 105⁰C sampai berat tetap, setelah 24 jam. Ditimbang dengan timbangan analitik dengan ketelitian 2 angka dibelakang koma dalam gram.

13). Bobot kering cabang

Untuk mengetahui bobot kering cabang dilakukan dengan cara mengambil cabang yang telah dipisahkan dari batang tanaman sampel pada setiap ulangan, kemudian cabang dijemur sampai kering matahari kemudian dioven pada suhu 105⁰C sampai berat tetap, setelah 24 jam. Ditimbang dengan timbangan analitik dengan ketelitian 2 angka dibelakang koma dalam gram.

14). Bobot kering daun

Bobot kering daun adalah rata-rata bobot kering daun yang telah dikeringkan, dijemur sampai kering matahari kemudian dioven pada suhu 105°C sampai berat tetap, setelah 24 jam. Ditimbang dengan timbangan analitik dengan ketelitian 2 angka dibelakang koma dalam gram

15). Bobot kering akar

Bobot kering akar adalah rata-rata bobot akar yang telah dikeringkan dijemur sampai kering matahari kemudian dioven pada suhu 105°C sampai berat tetap, setelah 24 jam. Ditimbang dengan timbangan analitik dengan ketelitian 2 angka dibelakang koma dalam gram.