BAB III
METODELOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan lebih kurang selama empat bulan. Penelitian ini dilakukan di kebun Bokashi KOMPPOS dan laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Riau.

3.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah Spektronik Analog Milton Roy 20 D, Sentrifuga SED 5 (United Kingdom), HPLC *(High Perfomance Liquid Chromatography)*, pipet mikro dan peralatan lain yang sesuai dengan prosedur kerja.

Bahan yang digunakan adalah tanaman babadotan dan rumput pahitan, bibit kangkung cap panah merah, larutan gula merah, EM 4 Dorman yang diproduksi dari PT. Sogo Langit, sayuran kangkung yang ditanam secara konvensional dari Kebun Jl. Bakti, Arifin Ahmad. Bahan kimia yang digunakan, yaitu reagen Folin Cioucalteau, asam galat, asam linoleat, TPTZ (2,4,6-tripyridyl1-S-triazin Sigma-Aldrich, Switzerland No.07329/970), metanol p.a., $FeCl_3$, $FeSO_4.7H_2O$, HCl, etanol absolut, $FeCl_2$, KSCN, CH3COONa.3H2O, Na_2CO_3, dan bahan-bahan kimia lain yang diperlukan.

3.3. Rancangan Penelitian

Kangkung ditanam dengan metode Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 3 perlakuan penyiraman dan 3 pengulangan. Penanaman terdiri dari 3 kelompok yang tiap kelompok mewakili satu pengulangan. Masing-masing kelompok berisi 3 plot dengan perlakuan berbeda (ETT rumput pahitan, ETT babadotan dan kontrol). Penelitian ini terdiri dari 3 tahap, tahap I adalah persiapan ETT rumput pahitan dan babadotan. Tanaman ini difermentasi dengan EM4, larutan gula merah dan air selama dua minggu. Tahap II adalah perlakuan terhadap kangkung yang ditanam dengan 3 perlakuan penyiraman, yaitu dua Ekstrak Tanaman Terfermentasi (ETT) dan 1 kontrol (tanpa ETT). Perlakuan penyiraman dilakukan satu kali dalam tiga hari. Unit percobaan terdiri dari 9 plot (3 perlakuan x 3 pengulangan). Pada masing - masing plot terdapat 50 lobang tanam dengan jarak antar lobang 15 cm. Pada waktu panen, setiap plot diambil 20 tanaman secara acak

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

sebagai sampel untuk dianalisis komposisi fenolik, total fenol dan aktivitas antioksidan.

3.4. Prosedur Kerja

3.4.1. Pembuatan Ekstrak Tanaman Terfermentasi (ETT)

Untuk pembuatan 1 liter ETT dibutuhkan sebanyak 250 gram tanaman yang akan dijadikan ETT yaitu babadotan dan rumput Pahitan. Masing-masing tanaman dihaluskan, dimasukkan ke dalam botol plastik ukuran 1500 mL kemudian ditambah 1000 ml air, 50 ml larutan gula merah dan 50 ml EM4 lalu dikocok. Botol plastik ditutup rapat dan disimpan ditempat yang tidak terkena cahaya matahari. Selama fermentasi gas yang terbentuk dikeluarkan secara berkala (2 hari sekali ata sesuai keadaan gas) selama ± 2 minggu (gas sudah tidak ada lagi) dan setelah itu dapat langsung digunakan.

3.4.2. Persiapan Lahan

Lahan penelitian dibersihkan dari segala vegetasi yang ada. Tanah diolah dengan menggunakan cangkul agar lahan menjadi gembur. Pengolahan tanah dilanjutkan dengan pembuatan plot sebanyak 9 buah dengan ukuran (1m x 2m) untuk 3 perlakuan penanaman dengan 3 pengulangan. Jarak antara plot kira-kira 30 cm sehingga penyiraman disatu plot tidak mengenai plot lainnya. Plot yang telah jadi dibuat lubang dan dimasukkan rumput yang telah mati dan masih hijau untuk menambah unsur organik berupa karbon dan nitrogen dan diberi 1kg bokashi lalu disiram dengan EM-4 aktif untuk mempercepat penguraian rumput tersebut. Lalu dilakukan pemberian pupuk bokashi sebanyak 1kg tiap plotnya. Lalu ditutup dengan tanah dan dirapikan plot tersebut. Pada masing-masing plot dibuat lubang tanam dengan jarak 15 cm.

3.4.3. Penanaman

Biji kangkung direndam dengan EM4-aktif selama 15 menit untuk mempercepat proses perkecambahan. Biji kangkung disaring, dan siap ditanam ke lahan. Setiap lubang tanam pada plot diisi 3 biji kangkung dan lubang ditutup dengan tanah. Kemudian disiram.

3.4.4. Penyiraman

Penyiraman dengan perlakuan ETT terhadap kangkung mulai dilakukan 7 hari setelah penanaman. Penyiraman dengan ETT dilakukan memakai gembor setiap

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

1 kali dalam tiga hari dengan perbandingan ETT dan air (1:500) sedangkan pada hari lainnya penyiraman dilakukan dengan air. Penyiraman dengan perlakuan ETT dilakukan pada sore hari. Pada kontrol dilakukan penyiraman dengan air setiap hari sebanyak 2 kali.

3.4.5. Pengambilan dan Persiapan Sampel

Kangkung dipanen pada umur 21 hari setelah ditanam. Pada waktu panen, 20 sampel kangkung dari setiap plot diambil secara acak menggunakan undian, kemudian kangkung dibersihkan dari tanah, lalu siap diekstrak untuk dianalisis.

3.4.6. Ekstraksi Senyawa Fenolik

Sampel kangkung yang telah bersih dibuang bagian akarnya lalu dipotong-potong. 10 gram kangkung yang telah dipotong digerus hingga halus kemudian ditambahkan 50 ml aquades. Campuran disentrifuse selama 10 menit pada 3000 rpm. Supernatan dari campuran diambil dan siap dianalisis komposisi fenolik menggunakan HPLC, aktivitas antioksidan, dan total fenol.

3.4.7. *Penentuan Komposisi Fenolik Menggunakan HPLC*

Analisis HPLC menggunakan sistem UFLC Szimatzu *Intelligent* (Szimatzu, Tokyo, Japan). Dua puluh mikroliter ekstrak fenolik diinjeksikan ke *reverse-phase column* (4.6 × 100 mm, I.D.). Pelarut 0,1% asam format dalam air dan 0,1% asam format dalam asetonitril digunakan untuk analisis flavan-3-ol, flavonol, dihidrocalkon dan asam fenolat sedangkan untuk analisis senyawa *anthocyanin* digunakan 5% asam format dalam air dan 5% asam format dalam metanol dengan kecepatan alir 1 mL/menit (Huber dkk., 2009). Detektor *Jasco UV-970 Intelligent UV/VIS* diatur untuk pengukuran absorbansi pada 350 nm. Analisis komposisi fenolik menggunakan HPLC ini akan dilakukan di Universitas Kebangsaan Malaysia (UKM).

3.4.8. Penentuan Aktivitas Antioksidan

3.4.8.1. Metode Oksidasi Asam Linoleat

Pengukuran aktivitas antioksidan dari ekstrak sampel sesuai dengan metode Lindsey (2002) dengan beberapa modifikasi. Sebanyak 3 mL Etanol dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan asam linoleat (30 µL) dan ekstrak sampel (30 µL) lalu divortex. Diukur absorban sampel (S) pada panjang gelombang 500 nm dan diinkubasi selama 24 jam pada tempat gelap pada temperatur 25°C.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

Setelah 24 jam $FeCl_2$ 0,014 M (30µL) dan KSCN 30% (w/v) (30µL) ditambahkan pada masing-masing tabung. Setelah itu diukur absorban sampel (S) pada panjang gelombang 500 nm. Absorban blanko diukur pada waktu 0 sampai 24 jam. Untuk menghindari adannya gangguan pigmen pada reaksi warna, blanko tanaman dengan $FeCl_2$ dan KSCN juga dilakukan.

3.4.8.2. Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Pengukuran aktivitas antioksidan diukur menggunakan uji FRAP sesuai dengan metoda Vichitphan (2007) dengan $FeSO_4.7H_2O$ sebagai standar. Pada pembuatan reagen FRAP disiapkan larutan induk buffer asetat 0,1 M (2,72 g $C_2H_3NaO_2.3H_2O$ dan 1,55 mL $C_2H_4O_2$ dilarutkan dengan 100mL aquadest, dari larutan tersebut diambil 3,7 mL $C_2H_3NaO_2.3H_2O$ dan 46,3 mL $C_2H_4O_2$ lalu dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL dan ditambahkan aquadest sampai tanda batas) pH 3,6. Kemudian disiapkan larutan induk TPTZ (2, 4, 6-*tripydyl-s-triazine*) 10mM dalam HCl 40 mM dan larutan induk $FeCl_3.6H_2O$ 20 mM. Ketiga larutan induk tersebut (buffer asetat. TPTZ, dan $FeCl_3.6H_2O$) dicampur dengan perbandingan (10:1:1) untuk membuat reagen FRAP. Reagen FRAP (3mL) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 100 µL ekstrak dan 300 µL aquadest. Campuran dibiarkan bereaksi selama 8 menit pada temperatur ruang ditempat gelap. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 593 nm menggunakan spektophotometer dan hasilnya dihitung dalam Fe^{+2} ekivalen (Fe^{+2} mM) menggunakan kurva standar $FeSO_4.7H_2O$ (0, 2, 4, 6, 8 dan 10mM).

3.4.9. Analisis Kadar Total Fenolik

Total fenol diukur dengan metode Folin-Ciocalteu dari Hanan dkk. (2008), Mustafa dkk. (2010) dan Xu dan Chang dkk. (2007) yang dimodifikasi. 0,1ml ekstrak kangkung dan 0,1ml standar asam galat (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, dan 400ppm) dicampurkan dengan 0,9ml aquades dan 0,5ml reagen Folin-Ciocalteu 0,25N. Campuran divortex dan didiamkan di dalam ruang gelap selama 5 menit. Setelah itu, ditambahkan 2,5ml Na_2CO_3 7%, divortex, dan didiamkan di ruang gelap selama 20 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 725nm menggunakan Spektronik Analog Milton Roy 20D.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

3.4.10. Analisis Data

Data yang diperolah dari penelitian dianalisis secara statistik dengan menggunakan analisis ANOVA, jika hasil signifikan maka dilanjutkan dengan uji DMRT pada taraf 5%.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/