

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **G. Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2012, di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan dan Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam.

#### **H. Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan adalah beaker glass, erlenmeyer, gelas ukur, tabung reaksi, corong, mortar dan penggerusnya, pipet volume, pipet tetes, cawan petri, pisau, tisu, kertas label, plastik bening, polibag ukuran  $\frac{1}{4}$  kg, karet gelang, neraca analitik, spektrofotometer.

Bahan yang digunakan adalah buah jeruk nipis yang dipetik dari pohon dan tumbuh didaerah yang sama, aquades, aseton (80% v/v) , H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, fenol 2% w/v.

#### **I. Rancangan percobaan**

Penelitian dilaksanakan dalam percobaan faktorial 2x2. Faktor I adalah waktu pengukuran dengan 2 taraf yaitu 4 dan 8 hari setelah perlakuan. Faktor

II adalah perlakuan dengan 2 taraf yaitu kontrol dan perlakuan gelap. Setiap perlakuan diulang 8 kali. Kombinasi kedua faktor dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1.** Skema Perlakuan dengan 8kali ulangan

$a_1 = 4\text{HSP}$		$a_2 = 8\text{HSP}$	
$a_1b_1 = \text{kontrol}$	$a_1b_2 = \text{perlakuan}$	$a_2b_1 = \text{kontrol}$	$a_2b_2 = \text{perlakuan}$
$u_1$	$u_1$	$u_1$	$u_1$
$u_2$	$u_2$	$u_2$	$u_2$
$u_3$	$u_3$	$u_3$	$u_3$
$u_4$	$u_4$	$u_4$	$u_4$
$u_5$	$u_5$	$u_5$	$u_5$
$u_6$	$u_6$	$u_6$	$u_6$
$u_7$	$u_7$	$u_7$	$u_7$
$u_8$	$u_8$	$u_8$	$u_8$

## J. Parameter

Parameter dalam penelitian ini adalah kandungan klorofil a, b, dan klorofil total, serta kandungan karbohidrat terlarut total buah jeruk nipis 4 dan 8 hari setelah perlakuan.

## K. Pelaksanaan

### 1. Penyiapan cawan petri

Cawan petri sebanyak 32 buah dicuci bersih dengan sabun cuci dan dilap kering. Cawan petri dilabel dengan perlakuan, hari pengamatan, dan

ulangan. Cawan petri digunakan sebagai wadah buah jeruk nipis yang diberi perlakuan dan kontrol. Buah jeruk nipis yang digunakan adalah buah jeruk nipis yang masih mentah (masih hijau) dan tumbuh didaerah yang sama. Tata letak satuan percobaan dapat dilihat pada tabel berikut :

**Tabel 2.** Skema tata letak percobaan

KH4U1	PH8U1	PH4U8	PH8U5
PH4U5	KH8U2	KH4U8	PH4U4
KH8U3	PH4U3	KH4U6	KH8U6
PH8U4	KH4U3	PH8U2	PH8U6
KH8U4	KH4U2	KH8U1	KH4U7
PH4U2	PH4U1	KH8U5	PH8U7
KH4U4	PH4U7	KH8U7	KH8U8
KH4U5	PH4U6	PH8U3	PH8U8

K =Kontrol; H = Waktu pengukuran ; U = Ulangan ; P = Perlakuan

## 2. Perlakuan gelap (*dark reversion*)

Buah jeruk nipis sebanyak 16 buah dipilih yang relatif sama ukuran dan warnanya. Setiap buah jeruk nipis dimasukkan ke dalam kantong polibag masing-masing 1 buah 1 kantong. Kantong polibag diikat dengan karet gelang dengan tetap menjaga udara dalam kantong tersedia bagi respirasi

jeruk nipis. Kantong polibag ini ditaruh diatas cawan petri dan disimpan di tempat gelap. Buah jeruk nipis sebanyak 16 buah lagi dipilih yang sama ukuran dan warnanya. Masing-masing jeruk nipis ditaruh di atas cawan petri dan disimpan ditempat terang atau mendapat cahaya.

### 3. Penentuan kandungan klorofil

Penentuan kandungan klorofil berdasarkan Witham et al,1986. Setiap Satu gram kulit buah jeruk nipis digerus sampai halus dalam mortar dan kemudian ditambahkan 30 ml aseton. Cairan disaring ke dalam erlenmeyer sisa gerusan yang masih melekat di kertas saring digerus kembali. Kemudian disaring kembali ke dalam erlenmeyer, volume akhir disesuaikan menjadi 100ml dengan menambah aseton. Ekstrak siap ditentukan kandungan klorofil a, b dan totalnya. Ekstrak klorofil ini diukur absorbansinya masing-masing pada panjang gelombang 645 dan 663 nm. Kandungan klorofil dinyatakan dengan mg klorofil per gram jaringan. Kandungan klorofil dihitung berdasarkan persamaan berikut :

$$\text{mg klorofil a/g jaringan} = [12,7 (D663) - 2,69 (D645)] \times \frac{V}{1000 \times W}$$

$$\text{mg klorofil b/g jaringan} = [22,9 (D645) - 4,68 (D663)] \times \frac{V}{1000 \times W}$$

(Witham et al,1986)

Ket : D(663) = absorbansi larutan pada panjang gelombang 663nm

D(645) = absorbansi larutan pada panjang gelombang 645nm

V= Volume larutan

W= berat jaringan

#### **4. Penentuan Kandungan Karbohidrat**

Kandungan karbohidrat ditentukan berdasarkan metode dalam Witham et al, 1986. 1 gram buah jeruk nipis digerus sampai halus dalam mortar, lalu setelah halus diekstrak dengan menggunakan 100ml larutan aquades, disaring ke dalam erlenmeyer dengan menggunakan kertas saring. Ekstrak jeruk nipis kemudian diambil 2ml dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. ditambahkan 2 ml larutan  $H_2SO_4$  pekat dan 1ml larutan fenol pada ekstrak jeruk nipis tersebut. Biarkan beberapa saat, warna coklat kemerahan menunjukkan adanya karbohidrat terlarut. Selanjutnya ekstrak dispektrofotometri dengan panjang gelombang 600 nm. nilai absorbansi setiap ekstrak jeruk nipis dicatat. Kandungan karbohidrat ditentukan berdasarkan kurva standar glukosa dan dinyatakan dalam satuan mg/gram jaringan. (Witham et al, 1986).

#### **L. Analisis Data**

Untuk mengetahui pengaruh waktu pengukuran dan perlakuan serta interaksinya terhadap klorofil dan kandungan karbohidrat terlarut total buah jeruk nipis maka data yang diperoleh dianalisis ragam pada taraf nyata 5% dan diuji lanjut dengan uji F pada taraf nyata 5 %. Hubungan antara klorofil dengan kandungan karbohidrat terlarut total ditentukan berdasarkan regresi linier atau kuadratik yang ditentukan berdasarkan nilai koefisien regresi atau  $R^2$  yang lebih tinggi.