

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Tempat dan waktu

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan, Rumah Kasa Fakultas Pertanian, Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau Kampus Bina Widya Km 12,5 Simpang Baru Panam Pekanbaru, penelitian ini berlangsung selama 4 bulan yaitu bulan Oktober 2011 sampai Januari 2012.

3.2. Bahan dan alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: buah mengkudu setengah matang yang diperoleh dari areal Fakultas Pertanian Universitas Riau, benih cabai turunan TM-999, metanol teknis, aquades steril, alkohol 70%, NaOCl₂ 10 %, medium PDA, tanah lapisan atas, kertas aluminium foil, plastik transparan, kertas saring, kertas tissue dan kapas.

Alat yang digunakan antara lain: cawan petri berdiameter 9 cm, bak persemaian plastik berukuran 30 x 30 x 10 cm, jarum ose, jarum pentul, *automatic shacker*, *micro pipet*, kuas, pinset, pipet tetes, tabung reaksi, *cork borer*, *vaccum rotary evaporator*, gelas ukur (100 dan 1000 ml), *erlenmeyer* (250 dan 500 ml), *handsprayer* 250 ml, *laminar air flow cabinet*, *autoclave*, inkubator, kompor gas, lampu bunsen, gelas objek, mikroskop, pisau steril, timbangan analitik, blender, ember plastik, kotak plastik, botol kedap dan alat-alat tulis.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian akan dilakukan secara eksperimen menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 5 ulangan sehingga diperoleh 20 unit percobaan. Penelitian terdiri dari dua jenis pengujian, yaitu :

1. Uji *in-vitro* penghambatan ekstrak buah mengkudu terhadap pertumbuhan jamur patogen yang diisolasi dari benih cabai (menggunakan 5 cawan petri tiap unit percobaan).
2. Uji pengaruh aplikasi beberapa konsentrasi ekstrak buah mengkudu pada benih cabai merah, terdiri dari pengujian persentase serangan jamur patogen terbawa benih cabai merah dan pengujian daya kecambah benih pada medium tanah (menggunakan 50 benih cabai merah tiap unit percobaan sehingga dibutuhkan 1000 butir benih cabai merah) dan kertas stensil (menggunakan 100 benih cabai merah tiap unit percobaan sehingga dibutuhkan 2000 butir benih cabai merah).

Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah beberapa konsentrasi ekstrak buah mengkudu (M), sebagai berikut :

M_0 = 0 % (tanpa ekstrak buah mengkudu)

M_1 = 10 % (10 ml ekstrak buah mengkudu / 90 ml air)

M_2 = 20 % (20 ml ekstrak buah mengkudu / 90 ml air)

M_3 = 30 % (30 ml ekstrak buah mengkudu / 90 ml air)

Analisi data yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Data jenis-jenis jamur patogen tular benih cabai, dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.

- b. Data persentase serangan jamur patogen tular benih cabai, diameter koloni jamur patogen tular benih cabai, persentase penghambatan ekstrak buah mengkudu terhadap jamur patogen tular benih cabai serta persentase daya kecambah benih cabai dianalisis secara statistik dengan menggunakan sidik ragam atau analysis of variance (ANOVA) dan diuji lanjut dengan uji *Duncan's New Multiple Range Test* (DNMRT) dengan model linear sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan:

- Y_{ij} = Hasil pengamatan pada satu unit percobaan pada perlakuan beberapa konsentrasi ekstrak buah mengkudu ke-i ulangan ke-j.
 μ = Nilai tengah umum.
 α_i = Pengaruh perlakuan beberapa konsentrasi ekstrak buah mengkudu.
 ε_{ij} = Galat percobaan pada perlakuan konsentrasi ekstrak buah mengkudu ke-i dan ulangan ke-j

3.4. Pelaksanaan Penelitian

3.4.1. Penyiapan Benih Cabai Merah

Benih cabai merah yang akan digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari petani kebun percobaan UPT (Unit Percobaan Tanaman) Fakultas Pertanian Universitas Riau. Sampel benih yang digunakan adalah benih cabai merah turunan TM-999 sebanyak 200 g. Pengambilan sampel benih untuk percobaan penelitian dilakukan dengan cara mengambil benih secara acak dari sampel yang ada pada petani di lapangan.

3.4.2. Ekstraksi Buah Mengkudu

Buah mengkudu setengah matang sebanyak 1 kg dicuci bersih dengan air mengalir kemudian dikering-anginkan, dipotong-potong dan diblender. Kemudian ekstrak buah hasil blender tersebut dimasukkan ke dalam ember plastik dan ditambahkan sedikit demi sedikit pelarut methanol, hingga seluruh ekstrak buah mengkudu terendam dengan perbandingan 1 : 3 (w/v) lalu diaduk hingga merata, kemudian direndam selama 3 x 24 jam. Setelah itu larutan ekstrak disaring dengan kertas saring. Hasil saringan tersebut disimpan dalam wadah yang tertutup rapat.

Hasil saringan ekstrak buah mengkudu (filtrat) yang diperoleh, kemudian diuapkan dengan menggunakan *vaccum rotary evaporator* pada suhu 65° C hingga metanol habis menguap. Hasil dari evaporasi tersebut yang digunakan untuk pengujian, hasil tersebut diencerkan dengan aquades steril untuk memperoleh konsentrasi masing-masing perlakuan (Skema Cara Pembuatan Ekstrak Buah Mengkudu dapat dilihat pada Lampiran 3). Dibutuhkan sekitar 240 ml ekstrak hasil evaporasi untuk uji, dimana dibutuhkan 60 ml untuk tiap unit percobaan.

3.4.3. Isolasi dan Identifikasi Jamur Patogen Tular Benih Cabai Merah

Isolasi jamur patogen terbawa benih cabai merah dilakukan dengan metode penanaman benih pada medium PDA steril yang dilakukan di dalam *Laminar air flow cabinet*. Benih cabai merah sebanyak 50 butir yang diambil secara acak, dicuci dengan air mengalir lalu direndam pada larutan NaOCl₂ 10% selama 3 menit. Kemudian benih dibilas dengan aquades steril. Benih yang telah dibilas lalu dikering anginkan di atas lapisan tisu. Setelah kering, sebanyak 10

benih cabai merah disusun dalam cawan petri yang berisi 10 ml medium PDA steril. Selanjutnya, benih diinkubasi pada suhu kamar selama 3-5 hari kemudian dilakukan pengamatan sekaligus identifikasi terhadap jamur yang tumbuh secara makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi mikroskopis menggunakan mikroskop dan hasilnya disesuaikan berdasarkan buku Barnett dan Hunter (2000) "*Illustrated Genera Of Imperfect Fungi*". Pada saat pengamatan, dihitung persentase serangan penyakit untuk setiap jamur patogen terbawa benih yang muncul. Jamur patogen terbawa benih yang dominan, yaitu yang lebih banyak ditemukan, akan diisolasi lebih lanjut untuk mendapatkan isolat murni.

3.4.4. Uji Penghambatan Ekstrak Buah Mengkudu Terhadap Pertumbuhan Jamur Patogen Tular Benih Cabai Merah

Dua jenis jamur patogen dengan infeksi tertinggi digunakan sebagai spesimen pengujian *in-vitro* penghambatan pertumbuhan jamur patogen tular benih. Pengujian dilakukan dengan menumbuhkan inokulum (miselium) dari isolat jamur yang telah diisolasi dari benih cabai merah pada medium PDA (*Potato Dextrose Agar*) yang telah dicampur dengan larutan ekstrak buah mengkudu sesuai dengan konsentrasi perlakuan. Kegiatan inokulasi patogen dilakukan di dalam *laminar airflow cabinet*.

Pencampuran ekstrak buah mengkudu ke dalam medium dilakukan dengan memasukkan 10 ml PDA cair dengan suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ ke dalam cawan petri. Kemudian 1 ml larutan ekstrak buah mengkudu (sesuai konsentrasi perlakuan) dicampurkan ke dalam cawan petri. Selanjutnya cawan petri tertutup digoyang secara memutar agar tercampur merata dengan larutan ekstrak buah mengkudu dan didiamkan hingga suhu kamar.

Isolat murni jamur diambil dengan *cork borer* berdiameter 5 mm, dikulturkan pada media PDA yang telah diberi perlakuan. Selanjutnya cawan petri diinkubasi dalam inkubator pada suhu kamar. Pertumbuhan koloni jamur diamati setiap hari hingga koloni pada cawan petri kontrol (M_0) telah memenuhi cawan petri.

3.4.5. Uji Pengaruh Aplikasi Ekstrak Buah Mengkudu Pada Benih Cabai Merah

Pada uji pengaruh aplikasi ekstrak buah mengkudu pada benih cabai merah digunakan benih cabai merah sebanyak 4000 benih, lalu dibagi menjadi 3 bagian yaitu 1000 benih untuk pengujian pengamatan persentase infeksi jamur patogen terbawa benih cabai merah pada medium PDA (*Agar-Plate Test*), tiap ulangan terdiri dari 50 benih cabai merah dan 1000 benih untuk pengujian daya kecambah dengan menggunakan medium tanah (*Growing on Test*), tiap ulangan terdiri dari 50 benih cabai merah. 2000 benih untuk pengujian daya kecambah dengan menggunakan medium kertas stensil (*growing on test*), tiap ulangan terdiri dari 100 benih cabai.

Benih cabai merah pada masing-masing pengujian direndam dalam larutan ekstrak buah mengkudu sesuai dengan konsentrasi perlakuan, lalu dimasukkan ke dalam gelas piala 250 ml dan direndam dalam 100 ml larutan ekstrak buah mengkudu sesuai konsentrasi perlakuan selama 10 menit. Kemudian larutan ekstrak dibuang dan benih cabai merah dimasukkan ke dalam wadah kotak plastik yang dialas dengan tissu untuk dikering anginkan.

3.4.5.1. Pengujian Pada Medium PDA (*Agar-Plate Test*)

Benih cabai merah yang sudah diperlakukan dengan konsentrasi ekstrak buah mengkudu diletakkan dalam cawan petri berisi medium PDA masing-masing sebanyak 10 butir per cawan petri dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu kamar selama 3 hari. Masing-masing ulangan terdiri dari 5 cawan petri (50 benih). Pada hari ketiga dilakukan pengamatan (identifikasi) dan penghitungan persentase pertumbuhan jamur patogen terbawa benih cabai merah.

3.4.5.2. Pengujian Pada Medium Tanah (*Soil Growing on Test*)

Tanah yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanah lapisan atas (*top soil*) yang diambil dari UPT Fakultas Pertanian Universitas Riau. Tanah yang telah diambil dibersihkan dari sisa-sisa kotoran, tumbuhan dan batuan. Tanah ini dimasukkan kedalam bak persemai (*seed bed*) sebanyak 10 kg dan disiram sampai lembab. Benih cabai merah yang sudah diberi perlakuan dengan ekstrak buah mengkudu sesuai konsentrasi perlakuan disusun ke dalam bak persemaian (*seed bed*) yang telah diisi tanah dan sudah disiram dengan air. Benih cabai merah sebanyak 50 benih ditanam pada tanah di bak persemaian secara teratur pada lubang tanam sedalam ± 1 cm. Untuk menjaga kelembaban bak persemaian dilakukan penyemprotan dengan menggunakan *hand sprayer* setiap pagi dan sore hari selama lebih kurang 2 minggu. Setelah benih berkecambah dilakukan pengamatan dengan menghitung persentase kecambah normal. Pengamatan dilakukan mulai 5 hari setelah benih ditanam dan setiap 2 hari sekali hingga tak ada lagi benih yang berkecambah.

3.4.5.3. Pengujian Pada Medium Kertas Stensil (*Soil Growing on Test*)

Pengujian dilakukan dengan menecambahkan benih cabai menggunakan kertas stensil pada baki perkecambahan. Sebanyak 3 lembar kertas stensil yang telah disterilkan dalam oven pada suhu 80 °C selama 2 jam, dibasahi dengan aquades steril sampai lembab dan dua diantaranya dibentangkan pada permukaan yang datar. Sebanyak 100 butir benih cabai yang telah diberi perlakuan ekstrak buah mengkudu disusun diatasnya, kemudian tutup dengan satu lembar kertas stensil lainnya lalu digulung dan diletakkan diatas baki perkecambahan. Kegiatan ini diulang sebanyak empat kali pada masing-masing perlakuan.

Kemudian baki perkecambahan tersebut dimasukkan kedalam germinator datar dan diinkubasi selama 10 hari. Untuk menjaga kelembaban dilakukan penyemprotan pada kertas stensil dengan aquades steril menggunakan *handsprayer* setiap satu hari sekali. Setelah benih berkecambah dilakukan pengamatan perkecambahan dan dihitung persentase daya kecambah benih. Pengamatan dilakukan setiap dua hari sekali.

3.5. Pengamatan

3.5.1. Jenis-jenis Jamur Patogen yang Diisolasi dari Benih Cabai Merah

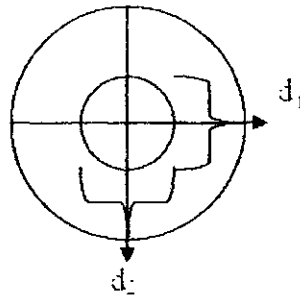
Identifikasi jenis-jenis jamur patogen yang diisolasi dari benih cabai merah dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan secara makroskopis dilakukan secara visual dengan mengamati: warna miselium, arah pertumbuhan miselium (ke atas atau ke samping), struktur miselium (kasar atau halus). Pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan menggunakan mikroskop

meliputi: warna hifa (hialin atau berwarna), memiliki sekat atau tidak, dan bentuk konidia patogen (bulat, lonjong, bulan sabit dan lain-lainnya). Untuk mempermudah identifikasi terhadap jamur patogen terbawa benih cabai merah dipergunakan buku identifikasi “*Illustrated Genera Of Imperfect Fungi*” (Barnett dan Hunter, 2000).

3.5.2. Diameter Koloni Jamur Patogen yang Diisolasi dari Benih Cabai Merah pada Medium PDA dalam Cawan Petri (mm)

Pengukuran diameter koloni jamur tular benih dilakukan pada saat koloni jamur pada medium tanpa perlakuan (M_0) telah memenuhi cawan petri. Alat yang digunakan dalam pengukuran adalah kertas milimeter. Penghitungan diameter koloni dilakukan dengan cara membuat garis vertikal dan horizontal berpotongan tepat pada titik tengah koloni jamur di dalam cawan petri. Garis dibuat pada bagian bawah cawan petri dengan tujuan untuk mempermudah perhitungan diameter koloni. Cara pengukuran pada cawan petri berdasarkan rumus dan gambar berikut:

$$D = \frac{d_1 + d_2}{2}$$



Gambar 1. Cara pengukuran diameter koloni pada cawan petri

Keterangan : D = diameter koloni jamur

d_1 = diameter vertikal koloni jamur yang diamati

d_2 = diameter horizontal koloni jamur yang diamat

3.5.3. Persentase Penghambatan Ekstrak Buah Mengkudu Terhadap Jamur Patogen yang Diisolasi dari Benih Cabai Merah Pada Cawan Petri (%)

Persentase penghambatan ekstrak buah mengkudu terhadap pertumbuhan jamur tular benih dihitung berdasarkan hasil pengukuran diameter koloni jamur tular benih. Persentase penghambatan dihitung dengan rumus berikut :

$$\text{Persentase Penghambatan} = \frac{D_i}{D} \times 100\%$$

Keterangan :

D_i = diameter koloni jamur pada cawan dengan perlakuan ekstrak buah mengkudu

D = diameter koloni jamur pada cawan tanpa perlakuan ekstrak buah mengkudu

3.5.4. Persentase Infeksi Jamur Patogen pada Benih Cabai Merah (%)

Pengamatan dilakukan setelah benih diinkubasi selama 3-5 hari.

Persentase infeksi dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Persentase Pertumbuhan} = \frac{a}{b} \times 100\%$$

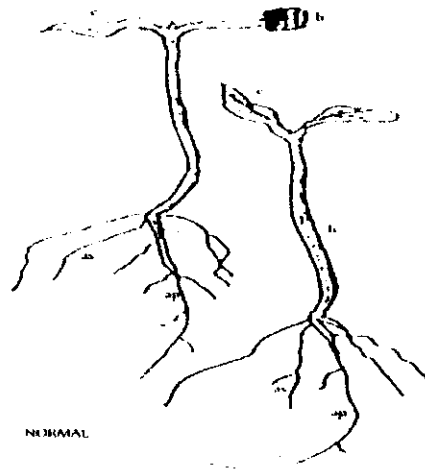
Keterangan:

a = jumlah benih yang terinfeksi

b = jumlah benih yang ditanam

3.5.5. Persentase Kecambah Normal pada Medium Tanah (%)

Persentase kecambah normal (%) dihitung untuk mengetahui kemampuan benih menghasilkan kecambah normal setelah diberi perlakuan dengan ekstrak buah mengkudu.



Gambar 1. Kecambah Cabai Normal (Kamil, 1982).

Keterangan:

- a. b, c (kotiledon): kotiledon paling kurang ada satu yang masih melekat pada bibit.
- b. h (hipokotil): hipokotil panjang tanpa patah-patahan atau luka-luka memanjang sampai ke jaringan pengangkut.
- c. ap (akar primer): akar primer tumbuh baik, biasanya dengan akar serabut.
- d. as (akar sekunder): tak ada akar primer atau akar membatang (*stubby*), tetapi akar sekunder tumbuh kuat dan hipokotil normal.

Pengamatan terhadap kecambah normal dilakukan mulai pada hari ke-5 setelah benih dikecambahkan sampai tidak ada lagi benih yang berkecambah dengan interval pengamatan 2 hari sekali. Pengamatan dilakukan dengan menjumlahkan benih yang telah berkecambah normal, kemudian ditentukan persentasenya dengan rumus:

$$\text{Daya kecambah normal} = \frac{n}{N} \times 100\%$$

Keterangan:

- n = jumlah benih berkecambah normal
- N = jumlah benih yang dikecambahkan