III. METODOLOGI

3.1. Tempat dan waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan dan Laboratorium Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian serta Laboratorium Pendidikan Kimia Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Riau Kampus Bina Widya Km 12,5 Simpang Baru Panam Pekanbaru, pada bulan Juni sampai September 2010.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: ekstrak rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc.) yang rimpangnya diperoleh dari petani jahe merah Jl. Agus Salim Bangkinang Kabupaten Kampar, benih kedelai varietas Willis dengan kadar air 12%, aquades steril, larutan $NaOCl_2$ 10%, pelarut etanol (alkohol 96%), medium PDA, kertas stensil, *aluminium foil*, tisu gulung, kapas, plastik transparan, dan kertas label.

Alat yang digunakan antara lain: cawan petri berdiameter 10 cm, baki perkecambahan berukuran 40 x 25 x 10 cm, jarum ose, pinset, tabung reaksi, *micro pipet*, *cork borer* (pemotong agar), gelas piala 100 ml, gelas piala 1000 ml, *erlenmeyer* 100 ml, *erlenmeyer* 500 ml, gelas ukur, batang pengaduk kaca, pipet tetes, *hand sprayer*, *laminar air flow cabinet*, germinator datar, autoklaf, oven, inkubator, *rotary evaporator*, blender, *magnetic stirrer*, kompor gas, botol kedap 1000 ml, lampu bunsen, gelas objek, gelas penutup, mikroskop stereo binokuler, kertas milimeter, timbangan analitik, ember plastik, dan gunting.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimen menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 4 ulangan sehingga diperoleh 20 unit percobaan. Penelitian terdiri dari 2 jenis pengujian, yaitu:

a) uji *in-vitro* penghambatan pertumbuhan jamur patogen terbawa benih kedelai, digunakan 1 cawan petri per unit percobaan.

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

b) uji *in-vivo* pengaruh aplikasi ekstrak rimpang jahe merah pada benih kedelai. Terdiri dari pengujian persentase serangan jamur patogen terbawa benih kedelai, digunakan 50 benih kedelai tiap unit percobaan sehingga dibutuhkan 1000 butir benih kedelai, dan pengujian daya kecambah benih, digunakan 100 benih kedelai tiap unit percobaan sehingga dibutuhkan 2000 butir benih kedelai.

Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah beberapa konsentrasi ekstrak rimpang jahe merah (J), sebagai berikut :

J_0 = 0 % (tanpa ekstrak rimpang jahe merah)

J_1 = 5 % (50 ml ekstrak rimpang jahe merah / l air)

J_2 = 10 % (100 ml ekstrak rimpang jahe merah / l air)

J_3 = 15 % (150 ml ekstrak rimpang jahe merah / l air)

J_4 = 20 % (200 ml ekstrak rimpang jahe merah / l air)

3.4. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan analisis ragam dan diuji lanjut dengan Uji *Duncan's New Multiple Range Test* (DNMRT) pada taraf 5%. Model matematis dari analisis statistik rancangan yang digunakan adalah:

$$Yij = \mu + \alpha i + \varepsilon ij$$

Keterangan:

Yij = Hasil pengamatan pada satu unit percobaan pada perlakuan
= konsentrasi ekstrak rimpang jahe merah ke-i ulangan ke-j.

μ = Nilai tengah umum.

αi = Pengaruh perlakuan konsentrasi ekstrak rimpang jahe merah

εij = Galat percobaan pada perlakuan konsentrasi ekstrak jahe merah ke-i dan ulangan ke-j

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

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Penyiapan Benih Kedelai

Sampel kerja yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah benih kedelai varietas Willis sebanyak 2 kg, berasal dari Balai Besar Pengembangan Mutu Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura, Depok. Pengambilan benih untuk pengujian dilakukan dengan cara mengambil benih secara acak dari sampel kerja.

3.5.2. Isolasi Jamur Patogen Terbawa Benih

Sebanyak 50 butir benih kedelai dicuci dengan air mengalir lalu direndam dalam larutan $NaOCl_2$ 10% selama 3 menit untuk mengendalikan jamur saprofit pada permukaan benih. Kemudian larutan $NaOCl_2$ 10% dibuang lalu benih dikeringanginkan di atas 2 lapis tisu. Setelah kering benih dimasukkan ke dalam aquades steril sebanyak 2 kali dengan lama perendaman masing-masing 3 menit. Sebanyak 10 butir benih disusun dalam cawan petri yang berisi medium PDA sebanyak 20 ml yang telah disterilkan. Selanjutnya benih diinkubasi dalam inkubator pada suhu kamar selama 5 hari. Pada hari ke-6 benih diamati lalu dilakukan deteksi dan identifikasi jamur patogen yang tumbuh secara makroskopis dan mikroskopis.

Gambar 1. Benih Kedelai pada Medium PDA

Identifikasi mikroskopis jamur dilakukan dengan mengacu pada literatur dari "*Illustrated Genera Of Imperfect Fungi*" (Barnett dan Hunter, 1972). Pengamatan dilakukan dengan mikroskop. Pada pengamatan tersebut dihitung persentase infeksi setiap jamur patogen terbawa benih. Dua jenis jamur patogen terbawa benih dengan persentase infeksi tertinggi diisolasi lanjut pada medium

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

PDA untuk mendapatkan isolat murni dan digunakan untuk spesimen pengujian *in-vitro* penghambatan pertumbuhan jamur patogen terbawa benih kedelai.

3.5.3. Ekstraksi Rimpang Jahe Merah

Rimpang jahe merah sebanyak 4 kg (*Zingiber officinale* Rosc.) dicuci bersih dengan air mengalir, dikupas kulitnya dan dipotong-potong dengan ukuran ± 1 cm kemudian dikeringanginkan. Setelah itu potongan rimpang jahe merah tersebut diblender hingga halus dengan menambahkan 500 ml pelarut etanol/kg rimpang jahe merah. Kemudian rimpang jahe merah halus direndam dalam 4 liter pelarut etanol (alkohol 96%) selama 3x24 jam di dalam botol kedap yang ditutup rapat. Setelah itu ekstrak diaduk dengan menggunakan batang pengaduk kaca lalu disaring. Pelarut diuapkan dengan menggunakan penguap putar (*Rotary evaporator*) pada temperatur 80 ^{0}C. Setelah pelarut diuapkan, ekstraknya digunakan untuk pengujian sebagai larutan stok. Ekstrak rimpang jahe merah ini selanjutnya diencerkan dengan aquades steril untuk memperoleh konsentrasi masing-masing perlakuan. (Skema cara pembuatan ekstrak dan rumus pengenceran dapat dilihat pada Lampiran 3 dan 4).

3.5.4. Uji *in-vitro* Penghambatan Pertumbuhan Jamur Patogen Terbawa Benih Kedelai

Pengujian dilakukan dengan menumbuhkan inokulum (miselium) jamur patogen terbawa benih kedelai pada medium PDA yang telah dicampur dengan larutan ekstrak rimpang jahe merah sesuai konsentrasi perlakuan. Inokulasi patogen pada medium PDA dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet*.

PDA cair dengan suhu ± 40°C dituangkan sebanyak 40 ml ke dalam *erlenmeyer* 100 ml. Kemudian dimasukkan 4 ml larutan ekstrak rimpang jahe merah (sesuai dengan masing-masing konsentrasi perlakuan) lalu diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 20 detik sehingga PDA tercampur homogen dengan larutan ekstrak rimpang jahe merah. Setelah itu campuran PDA dan larutan ekstrak dimasukkan ke dalam cawan petri dan didiamkan hingga padat.

Isolat murni jamur patogen terbawa benih diambil miseliumnya dengan cara memotong medium PDA yang ditumbuhi biakan murni jamur dengan

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

pemotong medium PDA (*cork borer*) seukuran diameter 5 mm. Hal ini bertujuan agar pertumbuhan miselium pada medium PDA untuk tiap perlakuan relatif sama. Miselium jamur diinokulasikan pada medium PDA yang telah dicampur dengan larutan ekstrak rimpang jahe merah tepat di bagian tengah cawan petri, kemudian diinkubasikan dengan memasukkan cawan petri ke dalam inkubator pada suhu kamar (28-30 ^{0}C). Diameter koloni jamur yang tumbuh pada medium PDA diamati setiap harinya hingga koloni jamur pada medium PDA tanpa perlakuan ekstrak jahe merah (J_0) telah memenuhi cawan petri. (Bagan percobaan dapat dilihat pada Lampiran 1).

3.5.5. Uji *in-vivo* Aplikasi Ekstrak Rimpang Jahe Merah Pada Benih Kedelai

Pada uji *in-vivo* pengaruh aplikasi ekstrak rimpang jahe merah pada benih kedelai digunakan 3000 butir benih kedelai, lalu dibagi menjadi 2 bagian yaitu 1000 benih untuk pengujian pengamatan persentase infeksi jamur patogen terbawa benih kedelai pada medium PDA (*Agar-Plate Test*), tiap ulangan terdiri dari 50 benih kedelai, dan 2000 benih untuk pengujian daya kecambah dengan menggunakan medium kertas stensil (*Growing on Test)*, tiap ulangan terdiri dari 100 benih kedelai.

Benih kedelai untuk pengujian pada medium PDA (*Agar-Plate Test*) dan kertas stensil (*Growing on Test)* masing-masing direndam dalam 50 dan 100 ml larutan ekstrak rimpang jahe merah sesuai dengan masing-masing konsentrasi perlakuan selama 10 menit di dalam gelas piala 100 ml, lalu larutan ekstrak dibuang dan benih kedelai dimasukkan ke dalam wadah kotak plastik yang dilapisi 2 helai tisu untuk dikeringanginkan.

A. Pengujian pada Medium PDA (*Agar-Plate Test)*

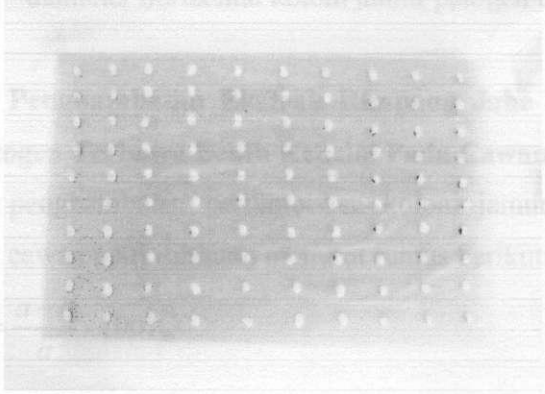
Benih kedelai yang sudah diperlakukan dengan beberapa konsentrasi ekstrak rimpang jahe merah diletakkan dalam cawan petri berisi medium PDA masing-masing sebanyak 10 butir per cawan petri, dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu kamar selama 5 hari. Masing-masing ulangan terdiri dari 5 cawan petri (50 benih). Pada hari keenam dilakukan pengamatan (identifikasi) dan

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

penghitungan persentase infeksi jamur patogen terbawa benih kedelai. (Bagan percobaan dapat dilihat pada Lampiran 2).

B. Pengujian pada Medium Kertas Stensil (*Growing on Test*)

Sebanyak 3 helai kertas stensil yang telah disterilkan dalam oven pada suhu 80 ^{0}C selama 2 jam, dibasahi dengan aquades steril sampai lembab (± 60%). Kemudian 2 helai kertas stensil dibentangkan pada tempat yang datar lalu 100 benih kedelai yang sudah diperlakukan dengan beberapa konsentrasi ekstrak rimpang jahe merah disusun di atasnya. Setelah itu ditutup dengan 1 helai kertas stensil lainnya lalu digulung dan diletakkan di atas baki perkecambahan. Kemudian baki perkecambahan tersebut dimasukkan ke dalam germinator datar selama 10 hari. Untuk menjaga kelembaban dilakukan penyemprotan pada kertas stensil dengan aquades steril menggunakan *hand sprayer* setiap 1 hari sekali. Setelah benih berkecambah dilakukan pengamatan perkecambahan dan dihitung persentase daya kecambah benih. Pengamatan dilakukan setiap 2 hari sekali.



Gambar 2. Benih Kedelai pada Medium Kertas Stensil

3.6. Pengamatan

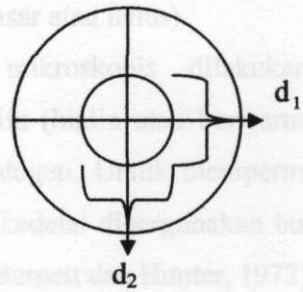
3.6.1. Diameter Koloni Jamur Patogen Terbawa Benih Kedelai pada Cawan Petri (mm)

Pengamatan dilakukan setiap hari terhadap koloni jamur yang tumbuh pada cawan petri untuk tiap unit percobaan. Pengukuran diameter koloni jamur dilakukan pada saat koloni pada medium tanpa perlakuan (J_0) telah memenuhi cawan petri. Alat yang digunakan dalam pengukuran adalah kertas milimeter.

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

Cara penghitungan diameter koloni dilakukan dengan membuat garis vertikal dan horizontal yang berpotongan tepat pada titik tengah koloni jamur pada cawan petri. Garis dibuat di bagian bawah cawan petri yang berfungsi untuk mempermudah perhitungan diameter koloni. Cara pengukuran pada cawan petri berdasarkan rumus berikut:

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



Gambar 3. Cara pengukuran diameter koloni pada cawan petri.

Keterangan : D = diameter jamur patogen terbawa benih

d_1 = diameter vertikal koloni jamur patogen terbawa benih

d_2 = diameter horizontal koloni jamur patogen terbawa benih

3.6.2. Persentase Penghambatan Ekstrak Rimpang Jahe Merah Terhadap Jamur Patogen Terbawa Benih Kedelai Pada Cawan Petri (%)

Persentase penghambatan pertumbuhan koloni jamur patogen terbawa benih kedelai pada cawan petri dihitung menurut rumus berikut:

$$P = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

Keterangan:

P = persentase penghambatan

a = diameter koloni jamur patogen tanpa perlakuan

b = diameter koloni jamur patogen pada perlakuan

Persentase penghambatan dihitung pada saat koloni jamur pada perlakuan tanpa ekstrak rimpang jahe merah (J_0) telah memenuhi cawan petri.

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

3.6.3. Jenis-Jenis Jamur Patogen Terbawa Benih Kedelai

Pengamatan untuk identifikasi jenis-jenis jamur patogen terbawa benih kedelai dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan secara makroskopis dilakukan secara visual pada hari ke-6 setelah inkubasi yaitu dengan mengamati: warna miselium, arah pertumbuhan miselium (ke atas atau ke samping), bentuk miselium (kasar atau halus).

Pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan menggunakan mikroskop meliputi: warna hifa (hialin atau berwarna dan memiliki sekat atau tidak), dan bentuk konidia patogen. Untuk mempermudah identifikasi terhadap jamur patogen terbawa benih kedelai dipergunakan buku identifikasi "*Illustrated Genera Of Imperfect Fungi*" (Barnett dan Hunter, 1972).

3.6.4. Persentase Infeksi Jamur Patogen Terbawa Benih Kedelai (%)

Pengamatan dilakukan pada hari ke-6 setelah benih diinkubasi dengan menggunakan rumus:

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

Keterangan:

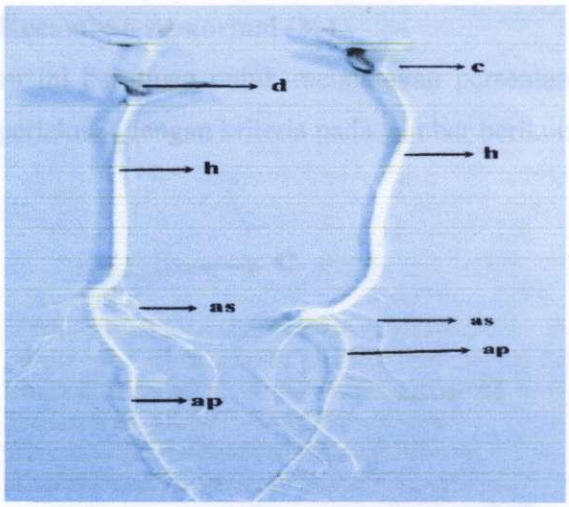
a = jumlah benih yang terinfeksi

b = jumlah benih yang ditanam

3.6.5. Persentase Kecambah Normal (%)

Pengamatan ini dilakukan untuk menentukan persentase daya kecambah (viabilitas) benih normal setelah perlakuan dengan kriteria pada gambar berikut:

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



Gambar 4. Kecambah Kedelai Normal (Kamil, 1982)

Keterangan :

a). ap (akar primer), as (akar sekunder) : Akar primer atau satu set akar-akar sekunder cukup kuat untuk menambatkan bibit (kecambah) bila ia ditumbuhkan pada tanah atau pasir.

b). d (daun pertama) : Epikotil Paling kurang ada satu daun primer dan satu tunas ujung yang sempurna (infact terminal bud).

c). c (cotyledons) : Satu atau keduanya hilang, sedangkan bagian lainnya baik dan vigorous.

d). h (hypocotyl) : Panjang atau pendek, tetapi tumbuh baik tanpa ada pecahan dalam yang mungkin disebabkan jaringan pengangkut.

Pengamatan dilakukan mulai pada hari ke-4 setelah benih dikecambahkan sampai tidak ada lagi benih yang berkecambah dengan interval pengamatan 2 hari sekali. Cara pengamatan yaitu dengan menjumlahkan benih yang telah berkecambah normal, kemudian ditentukan persentasenya dengan rumus:

$$\text{Daya kecambah normal} = \frac{n}{N} x100\%$$

Keterangan:

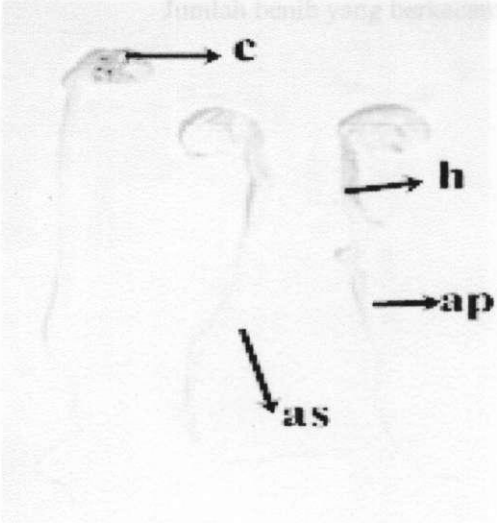
n = jumlah benih berkecambah normal

N = jumlah benih yang dikecambahkan

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

3.6.6 Persentase Kecambah Abnormal (%)

Pengamatan ini bertujuan untuk menentukan persentase daya kecambah abnormal setelah perlakuan dengan kriteria pada gambar berikut:



Gambar 5. Kecambah Kedelai Abnormal (Kamil, 1982)

Keterangan :

a). ap (akar primer), as (akar sekunder) : Tak ada akar primer atau akar-akar sekunder yang tumbuh baik

b). h (hypocotyl) : 1). Pecah dalam yang terbuka memanjang masuk ke dalam jaringan pengangkut. 2). Cacat, berkeriput dan membengkak atau memendek.

c). c (cotyledons) : Kedua-duanya hilang dan bibit (kecambah) lemah sehingga tidak vigorous.

d).d (daun pertama) Epikotil : 1). Tak ada daun primer atau tunas ujung (terminal bud).
2). Ada satu atau dua daun primer, tetapi tak ada tunas ujung.
3).Epikotil membusuk, menyebabkan pembusukaan menyebar dari kotiledon yang busuk, dan bibit juga lemah.

Pengamatan dilakukan mulai pada hari ke-4 setelah benih dikecambahkan sampai tidak ada lagi benih yang berkecambah dengan interval pengamatan 2 hari

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

sekali. Cara pengamatan yaitu dengan menjumlahkan benih yang berkecambah abnormal, kemudian ditentukan persentasenya dengan rumus :

$$\text{Daya kecambah abnormal} = \frac{\text{Jumlah benih yang berkecambah abnormal}}{\text{Jumlah benih yang berkecambah}} \times 100\%$$

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