

III. METODOLOGI

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Rumah Kaca Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Penyakit Tumbuhan, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya. Penelitian ini dimulai pada bulan Februari sampai dengan Mei 2013.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah cangkul, penumbuk, mortar, kasa steril, fial film, kuas, sangkar dengan penutup kain kasa, kaca pembesar, label, kamera, cawan petri, tabung reaksi, gelas ukur, tisu, tali rafia, serta pasak.

Bahan-bahan yang digunakan antara lain gulma yang didapatkan dari hasil survei pendahuluan pada lahan tomat di Desa Tegalweru, Kecamatan Dau, Kabupaten Malang yaitu *Commelina benghalensis*, *Ageratum conyzoides*, *Synedrella nodiflora*, *Commelina diffusa*, *Emilia sonchifolia*, dan *Portulaca oleracea*. Pada uji pendahuluan terhadap keenam jenis gulma tersebut menunjukkan bahwa hanya empat jenis gulma yang dapat menunjukkan gejala ketika diinfeksi dengan CMV. Keempat jenis gulma tersebut adalah *Commelina benghalensis*, *Ageratum conyzoides*, *Emilia sonchifolia*, dan *Portulaca oleracea*.

Bahan lainnya yang digunakan untuk penelitian ini adalah benih *Lycopersicon esculentum* Mill. varietas lentana, tanaman cabai sebagai sumber inokulum CMV yang diperoleh dari lahan pertanaman Desa Tawing, Kecamatan Gondang, Kabupaten Tulungagung (Gambar 1), *Myzus persicae*, *Gomphrena globosa* dan *Chenopodium quinoa* sebagai tanaman indikator, media tanam, pot, karborundum 600 mesh, buffer phospat 0,01 M pH 7, aquades, pupuk NPK, serta formalin 4%.



Gambar 1. Cabai rawit (*Capsicum frutescens*) sebagai sumber inokulum CMV

3.3. Rancangan Penelitian

3.3.1. Percobaan Pengaruh jenis Gulma Berdaun Lebar sebagai Sumber Inokulum terhadap Penularan CMV Melalui Vektor *Myzus persicae* pada Tanaman Tomat

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 perlakuan dan diulang 3 kali. Perlakuan tersebut adalah:

- A: Gulma *Commelina benghalensis* sebagai sumber inokulum CMV untuk tanaman tomat
- B: Gulma *Ageratum conyzoides* sebagai sumber inokulum CMV untuk tanaman tomat
- C: Gulma *Emilia sonchifolia* sebagai sumber inokulum CMV untuk tanaman tomat
- D: Gulma *Portulaca oleracea* sebagai sumber inokulum CMV untuk tanaman tomat

3.3.2. Percobaan Pengujian Indeks Infektivitas Virus

Pengujian indeks infektivitas dilakukan dengan menggunakan perlakuan tingkat pengenceran sap dari 4 jenis gulma yang terinfeksi CMV yang berbeda (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). Pada setiap perlakuan terdapat 3 tanaman tomat yang diuji. Gulma berdaun lebar yang digunakan untuk pengujian indeks infektivitas merupakan gulma yang menunjukkan gejala virus setelah diinokulasi oleh CMV serta menunjukkan gejala yang sama setelah dilakukan pengujian balik.

3.4. Persiapan Penelitian

3.4.1. Persiapan Media Tanam

Media tanam yang digunakan adalah tanah yang diambil dari Balitkabi Kec. Kendalpayak, Kabupaten Malang dan telah dicampur dengan pupuk kandang dengan perbandingan 3:1. Sebelum digunakan, media tanah disterilisasi dengan cara tanah disemprot formalin 4% menggunakan sprayer. Tanah tersebut diaduk dan ditutup rapat dengan plastik selama 7 hari. Setelah itu tutup dibuka dan didiamkan dulu selama 4 hari sebelum digunakan (Cahyono, 2008). Kemudian media tanam yang sudah steril tersebut dimasukkan ke dalam pot.

3.4.2. Perbanyak Serangga Vektor

Perbanyak serangga dilakukan dengan menggunakan sangkar dengan penutup kasa. Serangga vektor yang digunakan penelitian ini adalah nimfa atau imago tidak bersayap *Myzus persicae* generasi kedua atau ketiga. Untuk mendapatkan nimfa atau imago tidak bersayap *M. persicae* generasi kedua atau ketiga dilakukan dengan perbanyakan dalam sangkar kasa (Gambar 2) pada tanaman cabai sehat. Untuk memastikan bahwa vektor *M. persicae* steril tanpa terinfeksi virus dilakukan pemindahan vektor ke tanaman tomat dan tembakau dan dilakukan pengamatan. Setelah vektor *M. persicae* benar-benar steril dilihat dari tetap sehatnya tanaman tomat dan tembakau serta tidak muncul gejala terserang virus, selanjutnya dipindah ke tanaman cabai sehat lainnya untuk dilakukan perbanyakan. Hasil dari perbanyakan *M. persicae* dalam tanaman cabai ini dipelihara dan digunakan sebagai vektor CMV pada percobaan selanjutnya.



Gambar 2. Sangkar perbanyakan serangga vektor *Myzus persicae*

3.4.3. Persiapan Inokulum

Inokulum CMV pada cabai yang telah diperoleh dari lahan pertanian Desa Tawing, Kecamatan Gondang, Kabupaten Tulungagung diuji dengan tanaman indikator untuk memastikan bahwa gejala tersebut benar-benar CMV. Tanaman indikator yang digunakan dalam uji ini adalah *Chenopodium quinoa* dan *Gomphrena globosa*. Penularan terhadap tanaman indikator ini dilakukan secara mekanis. Setelah keberadaan CMV dapat dipastikan kemudian dilakukan perbanyakan inokulum. Perbanyakan inokulum dilakukan secara mekanis pada tanaman cabai yang telah dipersiapkan.

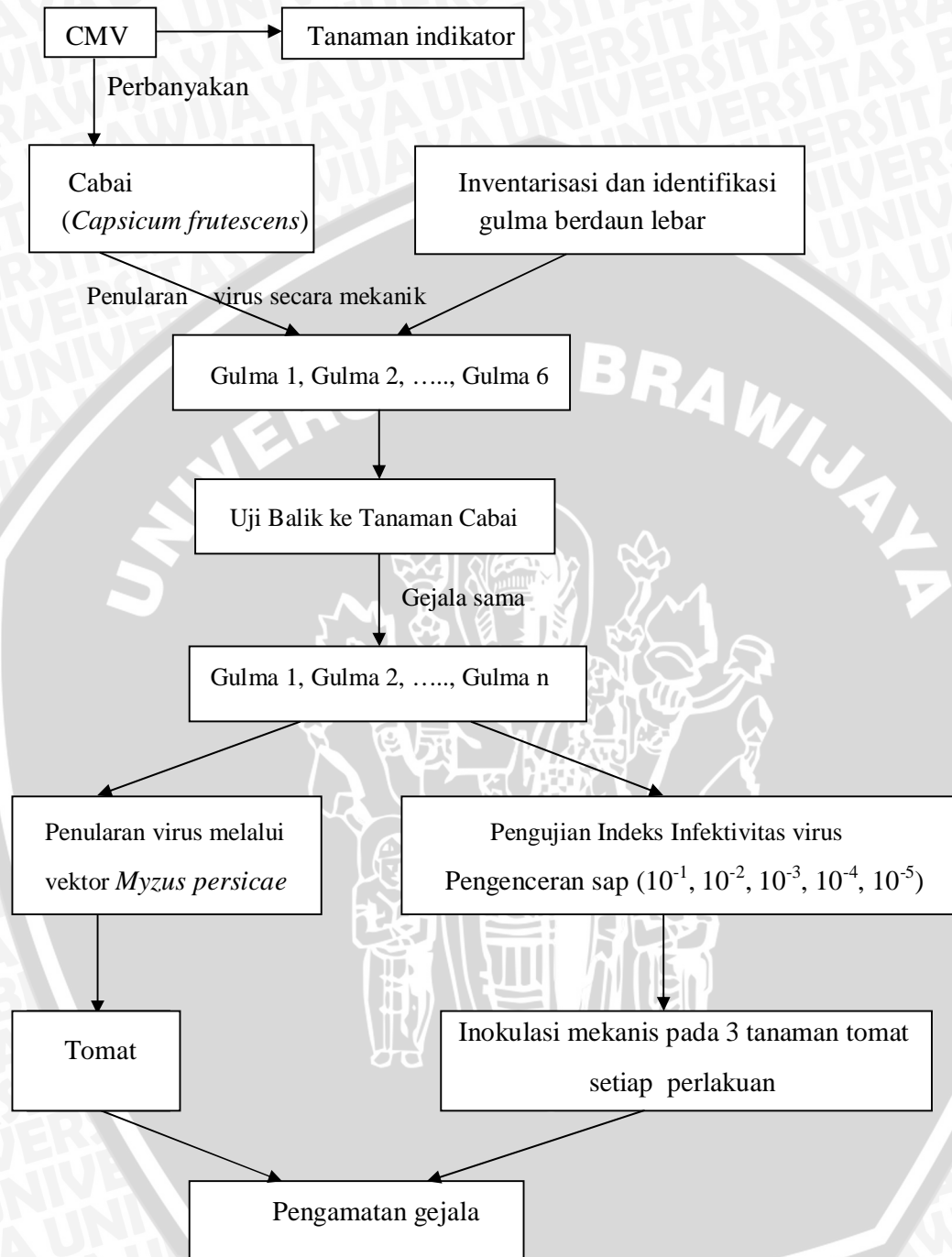
3.4.4. Persiapan Benih Tomat dan Penanaman

Benih tomat disemaikan terlebih dahulu dengan nampan sebelum dilakukan penanaman. Nampan pembibitan dipersiapkan dengan pada bagian bawah dibuat lubang untuk keperluan drainase dan ditempatkan yang teduh, cukup mendapat sinar matahari, serta tidak diganggu oleh keadaan sekitar, termasuk air hujan. Media tanam yang sudah disiapkan dimasukkan kedalam nampan persemaian setebal 6 cm, disiram, kemudian dibuat larikan-larikan sedalam 1 cm dengan jarak antar larikan 5 cm. Benih selanjutnya ditanam pada media persemaian serta diupayakan tetap lembab dengan cara disiram setiap hari (Pitojo, 2005). Bibit tomat yang telah berumur 2-3 minggu, berdaun 3-4 buah dapat ditanam di pot, pada tiap pot berisi satu tanaman.

3.4.5. Pemeliharaan

Tanaman tomat dilakukan pemeliharaan dari masa pra inokulasi sampai dengan masa pengamatan meliputi penyiraman tanaman, pemberian pupuk, penyiangan gulma, dan pengendalian OPT.

Penyiraman dilakukan setiap 2 hari sekali atau jika kondisi media tanam telah kering. Untuk mendukung tanaman uji, tanaman diberi pupuk NPK pada 4 hari setelah pemindahan bibit dengan dosis 5 gram/pot. Penyiangan dilakukan secara mekanik dengan cara mencabut gulma bila dijumpai pada pot. Sedangkan pengendalian OPT dilakukan dengan cara mengambil OPT yang menyerang kemudian dimusnahkan.



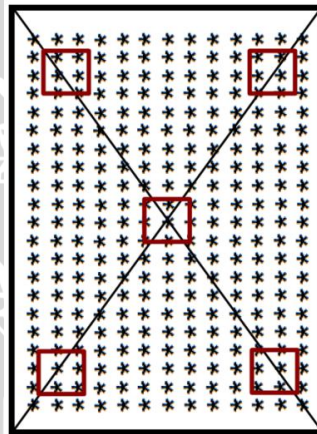
Gambar 3. Diagram Operasional Penelitian

3.5. Pelaksanaan Penelitian

3.5.1. Pengujian Gulma Berdaun Lebar sebagai inang Alternatif CMV Melalui Vektor

A. Inventarisasi dan Identifikasi Gulma Berdaun Lebar pada Tanaman Tomat

Gulma berdaun lebar diperoleh dari pertanaman tomat di Desa Tegalweru, Kecamatan Dau, Kabupaten Malang. Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan tali yang dibentuk segiempat dengan masing-masing panjang sisi 2 meter dengan luas 4 m². Pengambilan sampel menggunakan metode acak diagonal sebanyak 5 petak pengamatan (Gambar 4). Gulma berdaun lebar yang telah ditemukan kemudian dilakukan identifikasi menggunakan buku Flora (Steenis, 1992) dan buku *The World's Worst Weeds Distribution and Biology* (Holm et al., 1977).



Gambar 4: Skema Pengambilan Petak Pengamatan Gulma Berdaun Lebar

Beberapa jenis gulma yang telah didapatkan di lapang kemudian diperbanyak dan dilakukan identifikasi. Gulma yang digunakan merupakan gulma yang sehat tidak menunjukkan gejala serangan hama maupun penyakit dan dirawat sampai dengan masa inokulasi tiba. Perawatan meliputi penyiraman, pemupukan, dan pengendalian hama penyakit.

B. Inokulasi Gulma Berdaun Lebar dengan CMV Secara Mekanis

Daun tanaman cabai yang terserang CMV dibersihkan dari kotoran dengan tisu kemudian diambil sebanyak 10 gram ditumbuk sampai halus dengan mortar. Hasil tumbukan yang telah hancur ditambahkan larutan penyangga buffer

phosphat 0,01 M pH 7 sebanyak 10-15 ml dan disaring menggunakan kasa steril. Sap yang telah diperoleh kemudian siap diinokulasikan secara mekanik pada gulma berdaun lebar. Permukaan daun gulma berdaun lebar yang diinokulasi ditaburi terlebih dahulu serbuk karborundum 600 mesh kemudian digosok secara perlahan pada bagian permukaan daun. Selanjutnya sap tanaman sakit dioleskan ke daun gulma berdaun lebar dengan tangan dan setelah beberapa menit dibilas dengan aquades. Gulma berdaun lebar diinkubasi sampai muncul gejala.

Untuk memastikan bahwa virus yang menginfeksi pada masing-masing gulma berdaun lebar adalah sama dengan virus CMV isolat cabai maka dilakukan inokulasi balik. Masing-masing gulma uji baik yang bergejala maupun yang tidak bergejala diinokulasikan kembali ke tanaman cabai. Tanaman cabai yang menunjukkan gejala sama dengan sumber inokulum dapat dipastikan bahwa virus yang menginfeksi pada gulma berdaun lebar adalah virus CMV dan akan dilakukan untuk pengujian selanjutnya. Hasil inokulasi balik ke tanaman cabai yang tidak menunjukkan gejala atau gejala yang muncul berbeda dengan sumber inokulum sebelumnya tidak digunakan untuk uji selanjutnya. Proses inokulasi dilakukan secara mekanis dan pengamatan dilakukan selama 14 hari.

C. Penularan CMV dari Gulma Berdaun Lebar Terinfeksi Virus pada Tanaman Tomat Menggunakan *Myzus persicae*

Tanaman tomat dilakukan penularan CMV dari inokulum gulma berdaun lebar sakit pada umur 14 hst. Prosedur penularan virus CMV dengan menggunakan vektor yaitu *Myzus persicae* yang berada dalam sangkar kasa diambil lima ekor menggunakan kuas yang telah dibasahi dengan air terlebih dahulu. Vektor yang dalam keadaan makan (stilett terbenam dalam jaringan tanaman) diganggu bagian ekor agar vektor mengangkat stilettanya. *M. persicae* diletakkan dalam toples plastik yang ditutup dengan kain kasa dan dibiarkan puasa selama 30 menit. *M. persicae* selanjutnya dipindahkan ke gulma yang telah diinokulasi CMV dan dibiarkan makan selama 15 menit untuk mendapatkan virus. Selanjutnya *M. persicae* pada gulma dipindahkan ke tanaman tomat yang berumur 14 hari dengan lama waktu periode makan inokulasi selama 15 menit. Setelah proses penularan CMV melalui vektor ini selesai semua vektor *M. persicae* dibunuh dan tanaman tomat diamati gejala yang muncul.

D. Variabel Pengamatan

Pengamatan pengujian gulma berdaun lebar sebagai inang alternatif CMV melalui vektor dilakukan setiap hari sampai 14 hsi. Pengamatan meliputi kenampakan gejala, masa inkubasi, dan persentase tanaman yang sakit.

1. Kenampakan gejala

Kenampakan gejala yang diamati meliputi perubahan bentuk dan warna daun serta gejala pada tanaman tomat yang telah diinokulasi CMV.

2. Masa inkubasi

Masa inkubasi dihitung mulai dari waktu inokulasi sampai dengan munculnya gejala pertama pada tanaman yang diinokulasi CMV. Masa inkubasi di hitung dalam satuan hari.

3. Persentase tanaman sakit

Persentase serangan *Cucumber Mosaic Virus* dihitung berdasarkan rumus kerusakan mutlak yaitu dengan cara menghitung jumlah tanaman yang terserang *Cucumber Mosaic Virus* dibagi dengan jumlah tanaman yang diamati. Rumus yang digunakan yaitu:

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

Keterangan:

P = tingkat serangan CMV (%)

a = banyaknya tanaman yang menampakkan gejala

b = banyaknya tanaman yang diamati (10)

E. Analisis Data

Data pengamatan intensitas serangan CMV terhadap tanaman tomat yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan uji F dan kemudian dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf nyata $p=0,05$.

3.5.2. Pengujian Indeks Infektivitas CMV pada Berbagai Gulma sebagai Sumber Inokulum

A. Inokulasi CMV dari Gulma Berdaun Lebar pada Tanaman Tomat secara Mekanis

Masing-masing sap yang berasal dari gulma terinfeksi virus CMV diinokulasikan pada daun tomat umur 14 hst. Sap dari beberapa jenis gulma berdaun lebar sakit diencerkan pada berbagai tingkat pengenceran yaitu 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5} . Hasil sap dari masing-masing pengenceran kemudian diinokulasi secara mekanis pada tanaman tomat. Setiap perlakuan terdapat 3 tanaman tomat yang diujikan.

B. Variabel Pengamatan

Pengamatan pengujian indeks infektivitas dilakukan setiap 2 hari sekali setelah diinokulasi sampai tidak ada peningkatan lebih lanjut dalam jumlah tanaman yang bergejala CMV selama dua kali pengamatan berturut-turut (Diener, 1979). Pengamatan meliputi kenampakan gejala, masa inkubasi, dan banyaknya tanaman yang sakit pada masing-masing perlakuan.

C. Analisis Indeks Infektivitas Berdasarkan Metode Diener

Analisa indeks infektifitas menggunakan metode Diener (1979) dilakukan berdasarkan jumlah tanaman yang menunjukkan gejala dari masing-masing 3 tanaman yang diujikan pada tiap perlakuan. Data tanaman yang terinfeksi CMV dari tiap pengenceran dijumlahkan mulai awal muncul gejala sampai dengan tidak ada peningkatan jumlah gejala sakit tanaman tomat dalam dua kali pengamatan berturut-turut. Untuk mendapatkan nilai produk, jumlah tanaman bergejala dikalikan dengan $-\log$ dari pengenceran. Selanjutnya dari masing-masing hasil produk dari tiap pengenceran dijumlahkan untuk mendapat nilai indeks infektivitas pada pengujian gulma sebagai sumber inokulum. Nilai indeks infektivitas ini kemudian dibandingkan dengan perlakuan inokulum CMV dari gulma berdaun lebar lainnya.