

III. METODE PELAKSANAAN

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penyakit, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang dan rumah kawat Universitas Widyagama Malang. Pelaksanaan penelitian dimulai pada bulan Juni 2016 sampai dengan September 2016.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian di lapang adalah *polybag* berukuran 30 x 30, cangkul, sekop, cetok, meteran, gunting, jangka sorong, kertas label, plastik, tali rafia, gembor, *sprayer*, alat tulis dan kamera. Alat yang digunakan untuk penelitian di laboratorium adalah cawan petri, lampu ultra violet, timbangan analitik, pipet, gelas ukur, *autoclave*, *laminar air flow cabinet* (L AFC), *microwave*, botol media 250 ml, stik *L*, bunsen, korek, plastik, plastik *wrapping*, kertas saring, *sprayer*, gunting, aluminium foil, kapas, tisu steril, mortar dan penumbuk, gelas ukur (vol. 100 ml), dan label.

Bahan yang digunakan yaitu inokulum CMMV yang menginfeksi tanaman krisan di lapang. Bahan tanam yang digunakan berupa stek tanaman yang berasal dari pucuk tanaman krisan yang sehat jenis standar varietas *Cocobeach*. Tanaman indikator yang digunakan adalah *Chenopodium amaranthicolor*. Cocopeat dan sekam yang sudah disterilisasi dengan formalin 5% sebagai media tanam, kompos, ZA, NPK, fungisida b.a Propineb, karborundum 600 mesh, aquades steril, dan buffer fosfat 0,01 M pH 7, PGPR isolat *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, dan *Azotobacter* sp. dalam bentuk cair dengan kerapatan 10^8 yang diproduksi oleh jurusan hama dan penyakit tumbuhan (HPT), Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, aquades, alkohol, spirtus, klorok dan sabun cair. Serta media biakan bakteri *King's B* yang merupakan media selektif untuk pertumbuhan bakteri *Pseudomonas fluorescens*, *Ash B* yang merupakan media selektif untuk pertumbuhan bakteri *Azotobacter* sp., dan media *Nutrient Agar* (NA) sebagai media pertumbuhan *Bacillus subtilis*.

3.3. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) 9 perlakuan (Tabel 1) dengan 3 ulangan sehingga diperoleh 27 tanaman (Lampiran 8, Gambar Lampiran 2). Perlakuan tersebut meliputi:

Tabel 1. Perlakuan Penelitian

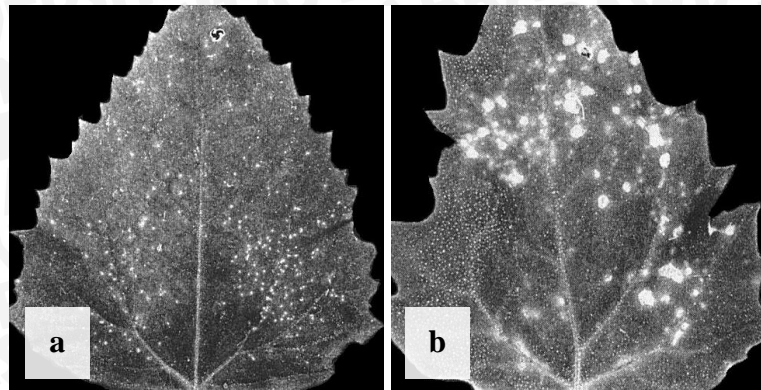
No	Perlakuan
1	Kontrol A (tanpa pemberian PGPR, tanpa inokulasi virus)
2	Kontrol B (tanpa pemberian PGPR, dengan inokulasi virus)
3	Inokulasi virus + PGPR isolat <i>B. subtilis</i>
4	Inokulasi virus + PGPR isolat <i>P. fluorescens</i>
5	Inokulasi virus + PGPR isolat <i>Azotobacter</i> sp.
6	Inokulasi virus + PGPR isolat <i>B. subtilis</i> + <i>P. fluorescens</i>
7	Inokulasi virus + PGPR isolat <i>B. subtilis</i> + <i>Azotobacter</i> sp.
8	Inokulasi virus + PGPR isolat <i>P. fluorescens</i> + <i>Azotobacter</i>
9	Inokulasi virus + PGPR isolat <i>P. fluorescens</i> + <i>B. subtilis</i> + <i>Azotobacter</i> sp.

3.4. Persiapan Penelitian

3.4.1. Penyediaan Inokulum dan Identifikasi Virus

Inokulum CMMV berasal dari lokasi ditemukannya tanaman yang terinfeksi CMMV yaitu di Desa Bumiaji, Batu. Tanaman yang terserang CMMV dicirikan dengan adanya gejala serangan seperti mottle atau belang pada daun, malformasi pada daun, serta kerusakan pada bunga. Inokulum yang digunakan yaitu daun tanaman krisan yang menunjukkan gejala belang atau mottle.

Sebelum penelitian, dilakukan identifikasi virus CMMV dengan menggunakan tanaman indikator. Tanaman indikator yang digunakan untuk identifikasi virus CMMV adalah *Chenopodium amaranticolor*. Identifikasi virus pada tanaman indikator dilakukan dengan cara diinokulasi mekanis. Virus tersebut akan menunjukkan gejala serangan CMMV pada *C. amaranticolor* yaitu lesio lokal klorotik atau nekrotik tanpa gejala sistemik (Gambar 4).



Gambar 3. Gejala pada Tanaman Indikator *C. amaranthicolor*. (a: lesio lokal klorotik dan b: lesion lokal nekrotik) (Noordam, 1995)

3.4.2. Persiapan Media Tanam

Media yang digunakan adalah sekam sebagai media persemaian serta campuran cocopeat dan kompos yang digunakan untuk media tanam. Cara sterilisasi media yaitu pertama media disiram menggunakan formalin 5% dengan konsentrasi 5 cc/liter air secara merata. Tujuannya adalah untuk membersihkan media tanam dari mikroorganisme yang dapat merugikan tanaman. Setelah cairan formalin merata pada media tanam selanjutnya media ditutup dengan plastik selama 7 hari dan dibolak-balik selama 3 hari kemudian media dikeringanginkan selama 7 hari atau sampai formalin tidak berbau. Media yang sudah siap digunakan kemudian dipindahkan ke wadah persemaian dan polybag.

Pemilihan media tanam ini mempertimbangkan sifat fisik media yaitu harus ringan, gembur, dan memiliki aerasi yang cukup baik. Adriani (2015) menjelaskan bahwa, kebanyakan krisan ditanam dengan media tanpa tanah. Media krisan yang baik harus dapat memegang air, mempunyai drainase yang baik dan bersih atau bebas dari hama, penyakit, dan gulma. Media tanam yang padat dan berdrainase buruk tidak dapat memberikan kondisi pertumbuhan akar yang optimal. Perbandingan media tanam yang digunakan adalah 4 : 1 dengan komposisi cocopeat dan kompos.

3.4.3. Pembibitan Tanaman Krisan

Tanaman krisan diperbanyak dengan bahan tanam dari stek pucuk. Bahan tanam berupa stek pucuk disemaikan dalam media persemaian menggunakan media arang sekam. Kemudian setelah tanaman sudah berusia 14 hari setelah semai (HSS),

bibit siap dipindahkan pada *polybag* yang berukuran 30 x 30 cm. Bibit krisan siap dipindahkan apabila sudah muncul akar.

3.4.4. Perbanyak Inokulum CMMV

CMMV diperbanyak pada tanaman krisan varietas *Cocobeach* dengan cara menginokulasikannya secara mekanis. Inokulasi dilakukan setelah tanaman berumur \pm 14 hst. Sap yang mengandung CMMV diinokulasikan pada daun muda yang telah membuka sempurna. Kemudian daun krisan yang menunjukkan gejala diambil dan diawetkan dengan cara disimpan dalam botol kaca (100ml) yang sebelumnya sudah diisi dengan CaCl_2 . Penggunaan CaCl_2 berfungsi sebagai bahan pengering atau desikator pada daun yang bergejala.

3.4.5. Penyediaan Bakteri PGPR

Isolat bakteri PGPR yang didapatkan berasal dari koleksi Laboratorium Penyakit, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Universitas Brawijaya Malang. Bakteri yang digunakan yaitu *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* dan *Azotobacter* sp. dalam bentuk cair dengan kerapatan 10^8 yang diproduksi oleh jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya.

3.5. Pelaksanaan Penelitian

3.5.1. Aplikasi PGPR

Bibit tanaman krisan yang sudah berusia 14 HSS selanjutnya dipindahkan ke *polybag* untuk ditanam. Bibit dicabut dari media semai lalu akar dicuci dengan aquades. Akar yang sudah bersih dari media semai kemudian direndam di PGPR selama 10 menit. Konsentrasi larutan yang digunakan untuk merendam adalah 10ml PGPR/liter air. Terdapat 21 pot yang diberi perlakuan PGPR sedangkan 6 tanaman sebagai kontrol tanpa diberi perlakuan PGPR.

3.5.2. Penanaman

Media tanam yang sudah disiapkan dan telah di sterilkan dimasukkan dalam *polybag* berukuran 30 x 30 berjumlah 27 buah. Pengisian tanah sejumlah $\frac{4}{5}$ bagian dari tinggi *polybag*. Bibit krisan yang sudah tumbuh normal pada persemaian kemudian dipindahkan pada *polybag*.

3.5.3. Inokulasi CMMV pada Tanaman Krisan

Penularan inokulum CMMV pada tanaman krisan dilakukan secara mekanis menggunakan sap. CMMV diinokulasikan pada tanaman krisan saat berumur 7 hari setelah tanam (HST). Inokulasi dilakukan pada daun muda yang telah membuka sempurna. Tanaman krisan dilukai secara mekanis menggunakan carborundum 600 mesh pada bagian permukaan daun kemudian sap CMMV dioleskan menggunakan tangan pada permukaan daun yang telah dilukai. Daun yang telah diinokulasi dibiarkan dua menit, kemudian dibilas dengan air dengan kapas atau tisu bersih. Pembilasan setelah perlakuan inokulasi ini dimaksudkan untuk menghilangkan sisa karborundum yang masih menempel pada bagian permukaan daun.

3.5.4. Monitoring Pertumbuhan PGPR pada Perakaran

Monitoring pertumbuhan PGPR pada perakaran tanaman krisan dilakukan dua kali pengamatan yaitu pada saat tanaman krisan berusia 3 MST dan 12 MST dengan tujuan untuk mengetahui apakah PGPR yang telah diaplikasikan masih tumbuh di dalam perakaran tanaman. Dengan demikian maka akan diketahui bahwa PGPR tersebut adalah faktor yang berperan penting terhadap intensitas serangan CMMV, pertumbuhan dan produksi tanaman krisan.

Metode yang digunakan untuk monitoring pertumbuhan PGPR pada perakaran adalah dengan menggunakan metode hitungan cawan atau *Total Plate Count* (TPC). Prinsip metode hitungan cawan adalah jika sel mikroba yang masih hidup ditumbuhkan pada media agar maka sel mikroba tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dengan mata tanpa menggunakan mikroskop.

Prosedur pelaksanaan dari metode ini adalah menimbang tanah sampel yang akan digunakan sebanyak 1 gram dengan menggunakan timbangan analitik. Selanjutnya 1 gram tanah tersebut dimasukkan ke dalam mikrotube yang berisi aquades steril sebanyak 1000 μl dan dihomogenkan. Setelah itu digunakan metode *dilution plate* 10^{-7} menggunakan mikrotube yang dilakukan di dalam LAFC. Kemudian hasil larutan yang telah homogen diambil dengan menggunakan mikropipet sebanyak 0,1 ml ke tabung reaksi yang berisi aquades steril sebanyak 9 ml dan seterusnya hingga pada tabung reaksi ketujuh. Pada pengenceran ketujuh dilakukan penanaman bakteri dengan memasukkan larutan tersebut sebanyak 1 ml

ke dalam media NA (Natrium Agar) untuk bakteri *B. subtilis*, King's B untuk *P. fluorescens*, dan *Ashby* untuk *Azotobacter* sp..

Penanaman bakteri dilakukan dengan metode *spread plate*. Tahapan yang dilakukan adalah dengan memasukkan suspensi pengenceran 0,1 ml suspensi bakteri pada cawan petri yang sudah berisi media. Selanjutnya dilakukan penyebaran bakteri dengan menggunakan stik L. Setelah ditanam di media NA selanjutnya di inkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu ruang kemudian diamati dan dihitung koloni yang tumbuh. Setelah diperoleh data jumlah koloni dari pengamatan jumlah koloni bakteri, selanjutnya adalah menghitung jumlah mikroorganisme dari sampel tanah

3.5.5. Pemeliharaan Tanaman Krisan

Pemeliharaan tanaman uji meliputi penyiraman, pemberian hari panjang atau penyinaran, pemangkasan pucuk atau *pinching*, pemupukan, pemasangan tali penyangga atau ajir, penyiangan gulma, dan pengendalian hama penyakit tanaman. Penyiraman dilakukan setiap dua hari sekali atau jika kondisi media tanam pada *polybag* kering. Pemberian hari panjang atau penyinaran diberikan sejak awal tanam hingga 21 hst. Setelah 1 minggu pemberian hari panjang dilakukan pemangkasan pucuk yang bertujuan untuk memperbanyak tunas.

Pemupukan dilakukan setiap 1 minggu sekali sejak stek dipindah ke *polybag* hingga 2 minggu sebelum panen. Pupuk yang digunakan adalah urea dengan konsentrasi 2 g/l. Pemasangan tali penyangga atau ajir dilakukan pada saat tanaman berumur 21 HST. Tujuannya adalah untuk mempertahankan kondisi tanaman agar tidak rebah. Tali penyangga yang digunakan bisa dengan tali rafia yang diikatkan pada kawat. Sanitasi gulma dilakukan secara manual dengan melakukan pencabutan jika terdapat gulma yang dapat mengganggu pertumbuhan dan perkembangan dari tanaman penelitian. Pengendalian OPT juga dilakukan secara manual dengan mengambil hama dan diletakkan pada botol air mineral agar tidak menyerang pada tanaman uji, sedang jika terdapat tanda tanaman terserang oleh patogen lain selain virus dilakukan perompesan bagian tanaman yang terserang.

3.6. Variabel Pengamatan

Variabel pengamatan dalam penelitian ini meliputi masa inkubasi serta kenampakan gejala CMMV, intensitas serangan, pertumbuhan tanaman (tinggi tanaman dan jumlah daun), dan produksi tanaman (waktu munculnya primordia bunga, jumlah bunga total, dan diameter bunga).

3.6.1. Masa Inkubasi dan Kenampakan Gejala

Masa inkubasi adalah periode waktu dari inokulasi sampai munculnya gejala pada tanaman krisan. Pengamatan masa inkubasi dihitung mulai dari satu hari setelah inokulasi sampai dengan munculnya gejala pertama pada semua perlakuan dalam satuan hari. Kenampakan gejala yang diamati meliputi perubahan bentuk dan warna daun yang diinokulasikan CMMV.

3.6.2. Intensitas serangan

Pengamatan intensitas serangan penyakit pada tanaman krisan yang terinfeksi CMMV, terlebih dahulu dilakukan dengan cara menentukan skala kerusakan. Kerusakan yang terjadi akibat serangan penyakit dapat dilihat dari kondisi fisik tanaman seperti daun, bunga, dan kondisi tanaman tanaman sesuai dengan gejala penyakit CMMV. Rumus untuk menghitung intensitas serangan CMMV pada tanaman uji dan skor tiap kategori serangan ditentukan menurut metode Zubaidah dkk (2006) dalam Suryanto, dkk. (2015) yaitu:

$$I = \frac{\sum(n \times v)}{N \times V} \times 100\%$$

Keterangan:

- I : intensitas serangan tiap tanaman
- n : jumlah daun dari setiap kategori serangan
- v : nilai skor dari setiap kategori serangan
- N : jumlah daun yang diamati tiap tanaman
- V : nilai skor dari kategori serangan tertinggi

Tabel 2. Skoring Serangan CMMV pada Daun Tanaman Krisan

Gejala Serangan	Skor
Tanaman sehat tanpa gejala infeksi	0
Tanaman tampak sehat namun terdapat sedikit <i>mottle</i> , tetapi tidak jelas	1
Tampak <i>mottle</i> dan tidak berkerut	2
Tampak <i>mottle</i> , sedikit berkerut, sedikit mosaik	3
Tampak <i>mottle</i> , berkerut, mosaik	4
Tampak <i>mottle</i> , berkerut, mosaik, nekrosis pada permukaan dan bagian bawah daun, malformasi, daun kerdil, melengkung ke bawah atau ke atas	5

(Suyanto dkk., 2015)

3.6.3. Pertumbuhan dan Produksi Tanaman Krisan

Pertumbuhan Tanaman Krisan. Pengamatan pertumbuhan tanaman krisan dilakukan pada 7, 14, 21, 28, 35 HST Adapun indikator pertumbuhan tanaman krisan yang diamati sebagai variabel pengamatan adalah:

1. Tinggi Tanaman

Tinggi tanaman diukur mulai dari pangkal batang (batas dengan akar) sampai titik tumbuh menggunakan penggaris. Sitompul dan Guritno (1995) menjelaskan bahwa pengamatan tinggi tanaman diukur mulai dari bagian batang dekat permukaan tanah sampai dengan titik tumbuh tanaman.

2. Jumlah Daun

Jumlah daun dihitung dengan cara menghitung jumlah helai daun pada tiap sampel tanaman yang sudah membuka sempurna secara manual. Rojudin dan Slamet (2003) menjelaskan bahwa pengamatan jumlah daun dilakukan dengan cara menghitung seluruh bagian daun yang telah membuka sempurna.

Produksi Tanaman Krisan. Pengamatan produksi tanaman krisan dilakukan ketika tanaman telah memasuki fase generatif yaitu tepatnya ketika sudah muncul primordia bunga. Adapun indikator produksi tanaman krisan yang diamati sebagai variabel pengamatan adalah:

1. Waktu Munculnya Primordia Bunga

Waktu muncul primordia bunga dihitung sejak awal tanam hingga muncul primordia bunga.

2. Jumlah Bunga Total

Jumlah bunga total dihitung keseluruhan untuk bunga yang masih kuncup, memasuki fase *colouring*, maupun yang sudah mekar. Perhitungan jumlah bunga total dilakukan lima kali tepatnya sejak tanaman berusia 6 mst hingga 10 mst.

3. Diameter Bunga

Diameter bunga diukur menggunakan jangka sorong dengan cara memilih kuntum bunga yang terbesar dalam satu tanaman, selanjutnya diukur mahkota bunga krisan terluar.

3.7 Analisis Data

Analisis sidik ragam atau *Analysis of Variance* (ANOVA) pada data hasil penelitian mengenai masa inkubasi CMMV, intensitas serangan CMMV pada tanaman krisan, pertumbuhan dan produksi tanaman krisan dilakukan dengan menggunakan uji F. Aplikasi yang digunakan adalah perangkat lunak excel dan DSAASTAT ver. 1.101. Masing-masing F hitung dibandingkan dengan F tabel pada level nyata 5%. Apabila F hitung $<$ F tabel 5% berarti perlakuan tersebut tidak berpengaruh nyata terhadap variabel yang diamati. Jika F hitung $>$ F tabel 5% berarti perlakuan berpengaruh nyata terhadap variabel yang diamati. Apabila data yang dianalisis berbeda nyata, maka akan diuji lanjut menggunakan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) taraf 5%.