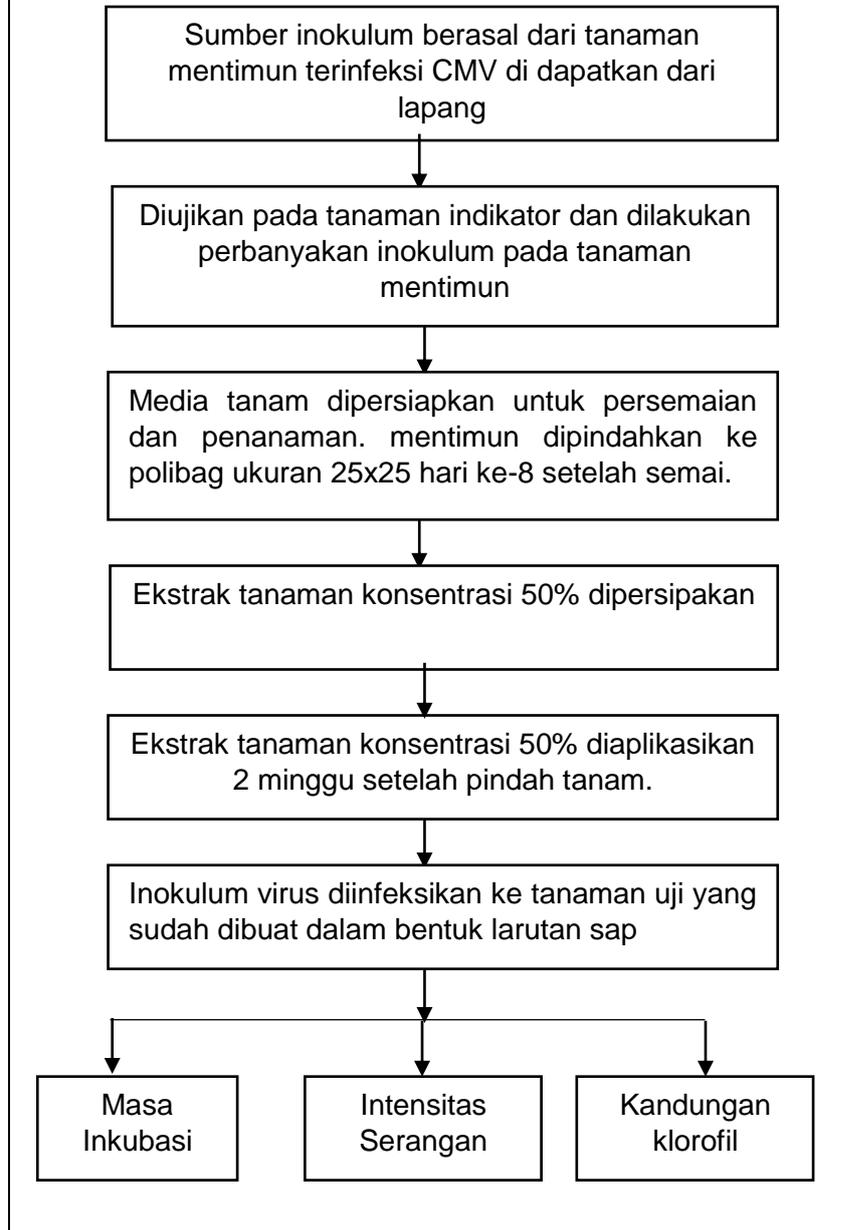


III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Kerangka Operasional

Kerangka operasional penelitian disusun berdasarkan urutan langkah untuk melaksanakan penelitian



Gambar 6. Kerangka operasional

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di rumah kaca dan Laboratorium Virologi Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang, penelitian dilaksanakan pada bulan Mei- Agustus 2017.

3.3 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah gelas ukur (vol. 100 ml), tabung reaksi, cuvet, pipet mikro, cawan petri, timbangan analitik, kain kasa, tisu, botol semprot, mortar, pistil, sarung tangan, polibag ukuran 25 x 25 cm, cangkul atau cetok, spektrofotometer, kertas label, gunting atau *cutter*, kamera, alat tulis, orbital shaker, rotary evaporator.

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah benih mentimun, rimpang kencur, rimpang jahe, rimpang kunyit, daun bunga pukul empat, inokulum CMV yang berasal dari tanaman mentimun, tanaman indikator *Gomphorena globosa*, aquades, buffer fosfat 0,01 M pH 7, Karborondum 600 mesh, alkohol 70 %, tanah steril, pupuk urea, sekam padi.

3.4 Metode Penelitian

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 4 kali ulangan. Setiap ulangan terdiri dari 2 tanaman sehingga diperoleh 40 tanaman. Perlakuan tersebut dijelaskan pada Tabel 1.

Tabel 1. Perlakuan Aplikasi Ekstrak Tanaman pada Tanaman Mentimun

Kode	Perlakuan
P0	Tanpa aplikasi ekstrak tanaman, dengan inokulasi CMV
P1	Pemberian ekstrak rimpang jahe konsentrasi 50%, dengan inokulasi CMV
P2	Pemberian ekstrak rimpang kencur konsentrasi 50%, dengan inokulasi CMV
P3	Pemberian ekstrak rimpang kunyit konsentrasi 50%, dengan inokulasi CMV
P4	Pemberian ekstrak daun bunga pukul empat konsentrasi 50%, dengan inokulasi CMV

3.5 Persiapan dan Pelaksanaan Penelitian

Adapun persiapan dan pelaksanaan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pengambilan Inokulum *Cucumber mosaic virus (CMV)*

Inokulum awal CMV yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari tanaman mentimun yang terserang CMV dengan gejala pada daun terdapat mosaik kekuningan pada daun yang diperoleh di desa Ngijo, kota Malang. Sebelum digunakan dalam penelitian dilakukan identifikasi menggunakan tanaman indikator, tanaman indikator yang digunakan adalah *Gomphorena globosa*. CMV yang meninfeksi *Gomphorena globosa* akan menghasilkan gejala local lesio dan malformasi (Kelaniyangoda, 2010). Setelah dilakukan identifikasi pada tanaman indikator, inokulum diinokulasi pada tanaman mentimun sebagai tanaman perbanyakan yang selanjutnya akan digunakan sebagai sumber inokulum pada penelitian ini.

2. Pembuatan sap

Pembuatan larutan sap menggunakan bagian daun tanaman mentimun yang terinfeksi virus CMV daun tanaman mentimun dibersihkan menggunakan kapas. Daun tanaman mentimun yang terinfeksi dipisahkan dari tulang daunnya, menggunakan gunting kemudian ditimbang hingga 5 gram. Daun tanaman yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam mortar kemudian ditambahkan 35 ml buffer fosfat 0,01 M pH 7,0 lalu dihaluskan dengan menggunakan pistil (Lampiran 4.1). Langkah selanjutnya ialah dilakukan penyaringan menggunakan saringan kain kasa steril yang sudah diberikan wadah pada bagian bawah kain kasa. Hasil dari penyaringan adalah larutan sap yang sudah siap untuk diinokulasikan.

3. Persiapan Media Tanam

Media tanam yang digunakan adalah tanah yang sudah disterilkan menggunakan formalin dengan cara tanah ditutup terlebih dahulu menggunakan plastik sehingga membentuk sungkup, kemudian dari bagian atas sungkupan disuntikkan formalin menggunakan suntik dengan konsentrasi 5cc/liter air. Media yang sudah diberikan formalin ditutup dan dibiarkan selama 7 hari, setelah 7 hari plastik dibiarkan terbuka selama 3 hari atau sampai formalin tidak berbau. Tujuannya adalah untuk mensterilkan media tanam dari mikroorganisme yang dapat merugikan tanaman. Tanah yang sudah steril dicampur dengan arang sekam dengan perbandingan 1:1. Setelah tanah dan arang sekam tercampur kemudian dimasukkan ke dalam polybag berukuran 25x25 cm. Untuk media

tanam pada proses penyemaian menggunakan tanah dan komposisi yang sama, media tanam di masukkan ke dalam tray semai.

4. Penanaman Tanaman Mentimun

Benih mentimun disemai pada media tray semai yang sudah diberikan tanah dan arang sekam dengan perbandingan 1:1. Tray semai yang sudah diberikan benih mentimun kemudian diletakkan pada area dengan intensitas matahari cukup, benih kemudian disiram pagi dan sore hari. Setelah benih disemai selama 8 hari benih siap dipindahkan ke polybag ukuran 25x25 cm. Pindahan bibit tanaman mentimun dilakukan dengan mengangkat semua tanah yang ada di daerah perakaran mentimun. Benih dimasukkan ke dalam polybag yang sudah diisi dengan media tanam.

5. Pembuatan Ekstrak Tanaman

Metode pembuatan ekstrak pada rimpang jahe, rimpang kencur, kunyit.

Rimpang tanaman dikupas kemudian dicuci menggunakan air bersih, dikukus pada suhu 85°C selama 5 menit, kemudian rimpang dihaluskan menggunakan blender dengan ditambahkan sedikit air. Bubur dari rimpang dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C hingga bubur kering dan berubah menjadi serbuk. Serbuk kemudian diayak menggunakan ayakan agar diperoleh serbuk yang halus. Kemudian 50 gram serbuk rimpang dimasukkan ke dalam erlenmeyer, ditambahkan 250ml etanol 96% (lampiran 4.2 A). Erlenmeyer ditutup menggunakan aluminium foil kemudian diletakkan pada orbital shaker selama 24 jam. Setelah 24 jam dilakukan pemisahan etanol dengan ekstrak rimpang menggunakan rotari evaporator (lampiran 4.2 B,C)

Metode pembuatan ekstrak pada daun bunga pukul empat.

Daun yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu dikeringkan menggunakan tisu, kemudian di oven pada suhu 40°C selama 3 hari. Daun yang sudah kering kemudian dihaluskan menggunakan mortar dan pestil hingga berubah menjadi serbuk, kemudian serbuk diayak menggunakan ayakan agar diperoleh serbuk yang halus. Serbuk sebanyak 50 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer, ditambahkan 250ml etanol 96%. Erlenmeyer ditutup menggunakan aluminium foil kemudian diletakkan pada orbital shaker selama 24 jam. Setelah 24 jam dilakukan pemisahan etanol dengan ekstrak daun menggunakan rotari evaporator.

6. Pengaplikasian Ekstrak Tanaman

Ekstrak tanaman diaplikasikan pada tanaman mentimun berumur 14hst menggunakan *hand spayer* dengan konsentrasi 50%. Pengaplikasian ekstrak tanaman dengan disemprotkan pada seluruh daun tanaman mentimun, setelah tiga puluh menit dilakukan pembilasan menggunakan air pada daun tersebut. Selanjutnya pengaplikasian ekstrak dilakukan 7 hari setelah aplikasi pertama kali.

7. Penularan Virus

Penularan virus CMV dilakukan secara mekanis pada umur mentimun 15hst. Permukaan daun yang akan diinokulasi ditaburi sedikit Karborondum 600 mesh. Daun yang sudah ditaburi Karborondum diusap perlahan menggunakan jari, pengusapan permukaan daun dilakukan secara searah (lampiran 4.1 D). Kemudian diberikan waktu selama 1 menit agar permukaan daun yang sudah dilukai dengan Karborondum terbuka sempurna, selanjutnya permukaan daun diolesin dengan cairan inokulum secara perlahan. Diberikan waktu selama 3 menit agar cairan inokulum masuk ke pori tanaman. Setelah 3 menit permukaan daun dibersihkan menggunakan aquades yang ditetesin menggunakan kapas yang sudah dibasahi terlebih dahulu, pembasahan dilakukan untuk membersihkan sisa Karborondum pada permukaan daun.

8. Pemeliharaan Tanaman Uji

Pemeliharaan tanaman dilakukan dengan penyiraman air pada tanaman mentimun pagi dan sore hari, pemberian ajir pada umur mentimun 7 hari setelah tanam agar mempertahankan keseimbangan mentimun, pemberian pupuk pada tanaman. Pemeliharaan selanjutnya adalah Sanitasi gulma dilakukan secara manual dengan melakukan pencabutan jika terdapat gulma didalam polybag yang dapat mengganggu pertumbuhan dan perkembangan dari tanaman penelitian..

3.6 Variabel Pengamatan

Dalam peneltian ini ada 3 variebel pengamatan yang digunakan, yaitu :

1. Masa Inkubasi

Masa inkubasi adalah periode waktu yang dibutuhkan virus dari pertama kali diinokulasi hingga pertama kali gejala muncul. Perhitungan masa inkubasi dimulai dari inokulasi CMV sampai munculnya gejala pertama kali. Pengamatan dilakukan setiap hari pada pagi dan sore hari hingga gejala pertama kali muncul.

2. Intensitas Serangan

Intensitas serangan penyakit dihitung menggunakan rumus yang juga digunakan oleh Abadi (2003), menghitung intensitas serangan ialah sebagai berikut :

$$P = \frac{\sum(n \times v)}{Z \times N} \times 100\%$$

Keterangan

P = Intensitas Kerusakan Tanaman

v = Nilai skala tiap kategori serangan, yaitu :

0 = Daun sehat

1 = Luas kerusakan tanaman > 1 - ≤ 25%

2 = Luas kerusakan tanaman > 26 - ≤ 50%

3 = Luas kerusakan tanaman > 51 - ≤ 75%

4 = Luas kerusakan tanaman > 76 - ≤ 100%

n = Jumlah daun dari tiap kategori serangan

Z = Nilai skala dari kategori serangan tertinggi

N = Jumlah daun yang diamati

3. Kandungan Klorofil

Pengujian kandungan klorofil dalam daun dapat diketahui setelah dilakukan pengujian menggunakan spektrofotometer. Berdasarkan prosedur yang dilakukan oleh Hendry dan Grime (1993) sebagai berikut: daun yang akan diamati diambil 1 gram, kemudian potongan daun tersebut dihancurkan dalam mortar dan kemudian ditambahkan 10 ml aseton 80%. Setelah itu 3 ml filtrat dimasukkan ke dalam kuvet kemudian dimasukkan ke dalam spektrofotometer. Absorbansi (A) diukur pada panjang gelombang 645 nm dan 663 nm. Konsentrasi klorofil dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Klorofil total} = 8,02 (A.663) + 20,2 (A.645) \text{ mg/l}$$

Keterangan:

A : Nilai absorbansi

4. Kategori Tingkat Ketahanan Tanaman

Penilaian kategori tingkat ketahanan tanaman dari mentimun yang terinfeksi CMV didasarkan pada nilai indeks variable yang diamati. Perhitungan nilai indeks menurut Castillo *et al.* (1976) adalah sebagai berikut :

$$\text{Nilai indeks tertinggi} = \frac{\text{Jumlah tertinggi setiap variabel yang diamati}}{\text{Jumlah nilai huruf variabel tersebut}}$$

$$\text{Nilai indeks terendah} = \frac{\text{Nilai indeks tertinggi}}{\text{Nilai notasi tertinggi variabel tersebut}}$$

$$\text{Nilai indeks selanjutnya} = \frac{\text{Nilai indeks tertinggi} \times \text{nilai indeks yang mendampingi}}{\text{Jumlah nilai huruf variabel tersebut}}$$

$$\text{Interval ketahanan} = \frac{\text{Rerata indeks tertinggi} - \text{rerata indeks terendah}}{3 \text{ (tahan, sedang, rentan)}}$$

Variabel yang digunakan untuk penilaian ketahanan adalah masa inkubasi, intensitas penyakit, kandungan klorofil.

3.7 Analisis Data

Semua data menggunakan analisis ragam (ANOVA) dilakukan dengan menggunakan uji F dengan taraf kesalahan 5%. Apabila berbeda nyata, maka dilakukan pengujian lanjut dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) taraf 5%.