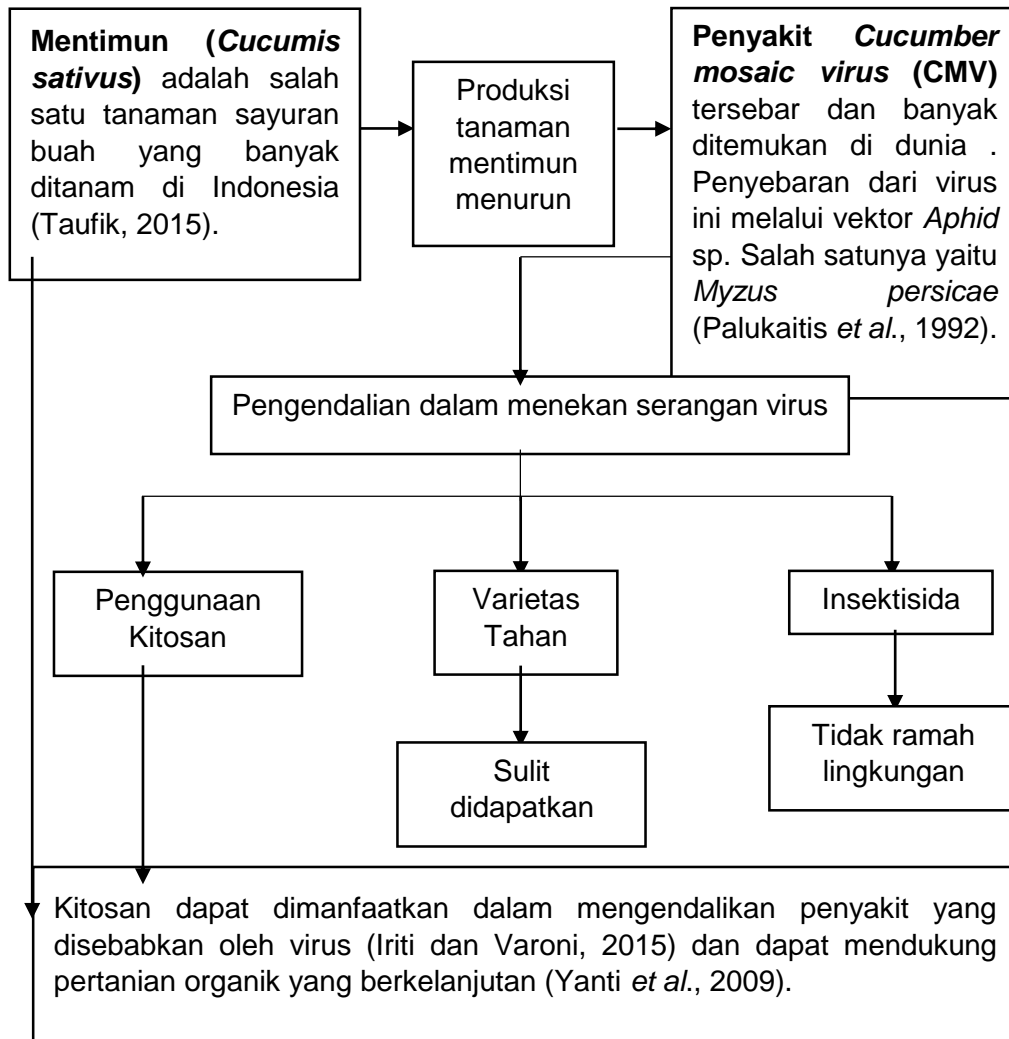


### 3. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konseptual

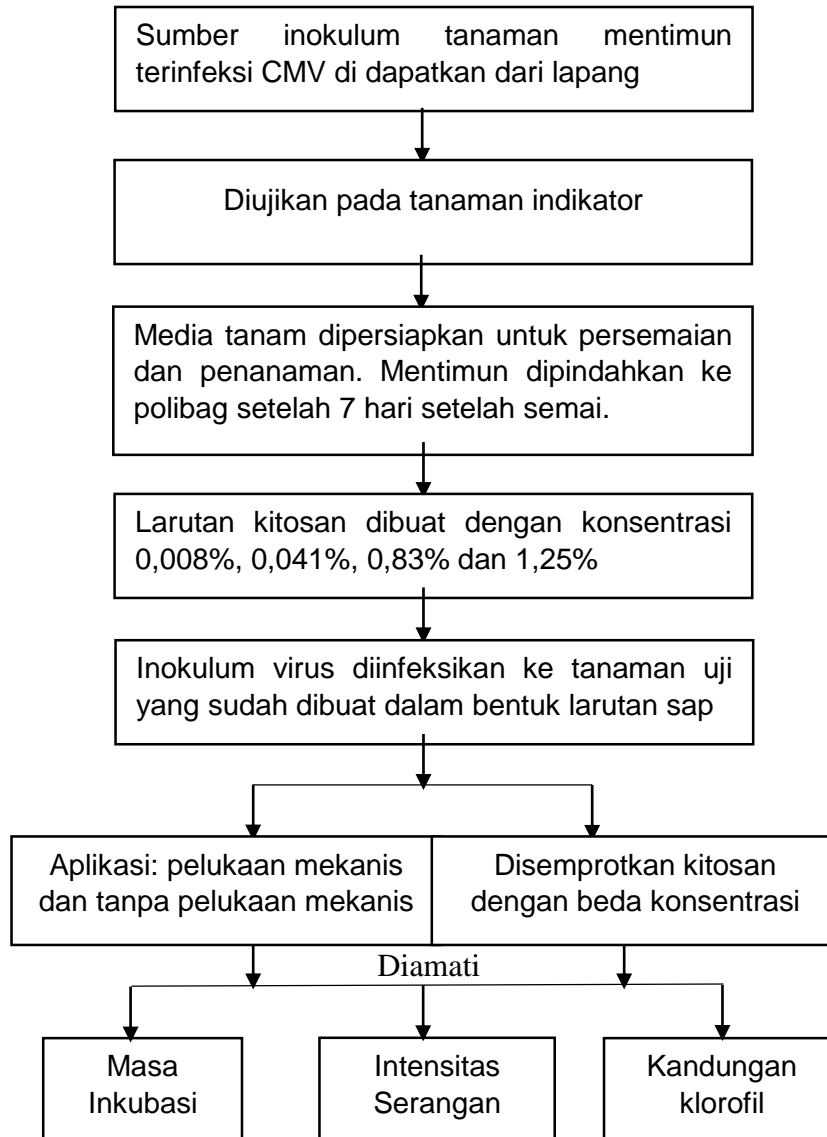
Kerangka konseptual penelitian merupakan logika ilmiah. Penyusunan ini didasarkan dengan teori dan hasil-hasil penelitian yang telah diuji. Berikut kerangka konseptual yang tersaji pada gambar 4.



Gambar 4. Kerangka Konseptual

### 3.2 Kerangka Operasional

Kerangka operasional penelitian disusun berdasarkan urutan langkah untuk melaksanakan penelitian Berikut kerangka operasional yang disajikan dalam gambar 5.



Gambar 5. Kerangka Operasional

### 3.3 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Juni hingga Agustus 2017, bertempat di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Sub Virologi, dan Rumah Kaca Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang.

### 3.4 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas ukur (vol. 100 ml), tabung reaksi, cuvet, pipet mikro, cawan petri, timbangan analitik, kain kasa, tisu, botol semprot, mortar, pistil, polibag 30 x 30 cm, cangkul atau cetok, bambu, gembor, spektrofotometer, botol kaca (5ml), kertas label, suntikan, isolasi, gunting atau *cutter* dan kamera.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kitosan 2% dalam bentuk bubuk yang di dapatkan dari Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor, benih tanaman mentimun, air, tanah, pupuk NPK, arang sekam, inokulum CMV di lapang daerah Karangploso Malang, tanaman indikator *Chenopodium amaranticolor* dan *Gomphorena globosa* karborundum 600 mesh, aquades, buffer phospat pH 7, alkohol 70%, asam asetat, formalin 4% dan aseton 80%.

### 3.5 Metode Penelitian

Rancangan lingkungan yang digunakan di penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RALF). Faktor yang digunakan adalah metode aplikasi dan pemberian konsentrasi kitosan. Pada perlakuan metode aplikasi terdiri dari (A1) pelukaan secara mekanis dan (A2) tanpa pelukaan secara mekanis. Dan pada faktor konsentrasi kitosan terdiri dari 5 taraf yaitu: (C0) 0% (kontrol), (C1) 0,008%, (C2) 0,041%, (C3) 0,83% dan (C4) 1,25%.

Sehingga akan didapatkan kombinasi perlakuan seperti yang tersaji pada tabel 1 sebagai berikut.

Tabel 1.kode Perlakuan

Metode Aplikasi	Konsentrasi Kitosan				
	0% (C0)	0,008% (C1)	0,041 % (C2)	0,83% (C3)	1,25% (C4)
Pelukaan Mekanis (A1)	A1C0	A1C1	A1C2	A1C3	A1C4
Tanpa Pelukaan Mekanis (A2)	A2C0	A2C1	A2C2	A2C3	A2C4

Kode perlakuan untuk kontrol positif adalah A1C0 sebagai perlakuan dengan diinfeksi virus tanpa diaplikasikan kitosan sedangkan untuk kode perlakuan A2C0 (kontrol negatif) yaitu tanaman tidak diinfeksi virus dan tidak diaplikasikan dengan kitosan. Setiap perlakuan akan diulang sebanyak 3 kali dan

dalam tiap kali ulangan terdiri dari 2 unit tanaman uji sehingga, akan dihasilkan 30 satuan percobaan. Setiap satuan percobaan terdiri dari 60 tanaman.

### 3.6 Persiapan Penelitian

Persiapan yang dilakukan pada penelitian ini adalah:

#### A. Persiapan Media Tanam

Media tanam yang digunakan adalah campuran tanah dan arang sekam dengan perbandingan 1:1. Tanah yang digunakan disterilisasi terlebih dahulu dengan formalin 4%. Langkah pertama yang dilakukan adalah tanah yang telah dibentangkan lalu ditutup dengan plastik yang pada bagian luar pinggir plastik tersebut ditahan oleh tanah sisa lainnya. Kemudian formalin diberikan dengan cara disuntikan melalui plastik sebagai penutup tanah tersebut. Setelah disuntikkan dengan formalin, lubang suntikan tersebut langsung ditutup lubang dengan isolasi. Tanah, didiamkan selama 1 minggu. Saat setelah dibuka dari plastik, tanah diaduk-aduk hingga kiranya rata. Tahapan terakhir adalah tanah tersebut dipindahkan ke polibag sebagai media tanam.

#### B. Persiapan Tanaman Uji

Benih mentimun disemai terlebih dahulu selama 7 hari. Setelah itu, bibit tanaman mentimun dipindahkan ke polibag dan ditanam satu bibit per polibag nya dan diletakkan di rumah kaca.

#### C. Persiapan Inokulum dan Identifikasi CMV

Inokulum CMV berasal dari tanaman mentimun yang menunjukkan gejala CMV di daerah Karangploso, Malang. Inokulum disimpan dan diawetkan di dalam botol yang diurutkan dengan  $\text{CaCl}_2$ , kapas steril, inokulum CMV, kapas steril yang lalu ditutup dengan alumunium foil hingga rapat dan disimpan dalam freezer kulkas. Sebelum inokulum CMV diinokulasikan ke tanaman uji, dilakukan identifikasi virus terlebih dahulu dengan tanaman indikator *G. globosa*, *C. amaranticolor*. Menurut Brunt *et al.*, (1996) dalam Plant Virus Online (1997), bahwa kedua jenis gulma ini dapat dijadikan sebagai tanaman indikator dan termasuk dari sekian tanaman inang yang mudah terserang oleh CMV. Gejala spesifik CMV pada tanaman indikator *G. globosa* dan *C. amaranticolor* adalah mengalami lesio lokal. Pada tanaman *G. globosa* terjadi penggulungan daun yang cenderung mengarah ke arah dalam dan *C. amaranticolor* mengalami gejala klorotik (Brunt *et al.*, 1996 dalam Plant Virus Online, 1997) dan (Bujarski *et al.*, 2016 dalam ICTV, 2016)

#### **D. Pembuatan Sap dan Penularan CMV**

Penularan virus yang dilakukan dalam penelitian ini adalah dengan cara mekanis. Inokulum CMV yang telah didapatkan dari tanaman mentimun yang terinfeksi, dicuci dengan air mengalir dan dipotong-potong dan dipisahkan dari tulang daunnya. Setelah itu, diambil dari potongan-potongan daun tersebut sebanyak 5 gr, lalu ditambahkan dengan larutan penyangga (*buffer phospat*) 0.01 M pH 7 sebanyak 40 ml dan kemudian ditumbuk dengan mortar hingga halus. Larutan penyangga memiliki fungsi untuk menstabilkan virus (Agrios, 2005).

Setelah daun dihancurkan, disaring dengan kain kasa steril yang bertujuan agar ampas dipisahkan dari larutan sap. Permukaan dari daun mentimun dilukai terlebih dahulu dengan karborundum 600 mesh. Larutan sap kemudian diusapkan dengan jari di atas permukaan daun muda mentimun yang satu minggu sebelumnya telah disemprotkan dengan kitosan pada daun bagian bawah. Sap diaplikasikan secara perlahan sehingga tidak merusak bagian jaringan epidermis yang berada di permukaan daun dan setelah itu, dibiarkan terlebih dahulu sekitar 1- 2 menit lalu disemprotkan dengan aquades. Proses ditularkannya virus ke tanaman uji adalah saat mentimun telah berumur 21 hari setelah tanam.

#### **E. Pembuatan Larutan Kitosan**

Kitosan yang digunakan pada penelitian ini berupa bubuk yang telah diproses terlebih dahulu dalam pembuatannya (Lampiran 3). Konsentrasi kitosan yang digunakan dalam penelitian adalah 0,008%; 0,041%; 0,83% dan 1,25%. Pembuatan larutan dimulai dari disiapkannya stok larutan 0,83% yaitu digunakan 10 gr kitosan ditambahkan dengan 200 ml asetat dan aquades 1000 ml. Selanjutnya, untuk pembuatan stok larutan konsentrasi kitosan lainnya, perbandingan yang digunakan untuk asam asetat dan aquades adalah sama. Hal yang membedakan adalah berat dari kitosan yang digunakan untuk setiap konsentrasi. Untuk konsentrasi 0,008% dibutuhkan kitosan sebanyak 0,1 gr, konsentrasi 0,041% dibutuhkan kitosan sebanyak 0,5 gr dan untuk konsentrasi 1,25% dibutuhkan 15 gr.

Konsentrasi kitosan yang dipilih dan digunakan dalam penelitian ini didasarkan pada konsentrasi tertentu yang melebihi konsentrasi optimum karena kitosan dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Dewanty, 2011). Hal tersebut dikarenakan kitosan mengeluarkan  $H_2O_2$  yang

dapat menyebabkan kerusakan dan kematian pada sel tanaman. Aktivitas yang  $H_2O_2$  dapat menyebabkan pengurangan secara substansial sitoplasma dan kondensasi dari kromatin yang meningkat bersamaan dengan peningkatan dari aktivitas protease. Hal ini akan terjadi saat pengaplikasian dari dosis kitosan yang terlalu tinggi (Zuppini *et al.*, 2003).

#### **F. Aplikasi Kitosan**

Kitosan diaplikasikan dengan disemprotkan pada daun mentimun yang dilukai terlebih dahulu dengan karborundum 600 mesh dan pada bagian daun mentimun yang tidak dilukai di tanaman uji yang berbeda. Proses pelukaan dilakukan saat tanaman uji berumur 14 hari setelah tanam. Daun mentimun yang disemprotkan dengan kitosan adalah pada daun yang berbeda dengan daun yang akan diinokulasikan dengan sap virus. Pada bagian daun ini, langsung disemprotkan dengan kitosan tanpa dilakukannya inokulasi virus terlebih dahulu.

#### **G. Pemeliharaan Tanaman Uji**

Pemeliharaan yang dilakukan pada tanaman uji adalah dengan disiram pada pagi dan sore hari. Selanjutnya adalah dilakukan pembersihan gulma yang tumbuh disekitaran polibag dengan cara mekanik yaitu dicabut secara langsung (Lampiran 4).

### **3.7 Variabel Pengamatan**

Variabel pengamatan yang dilakukan pada penelitian ini adalah:

#### **A. Masa Inkubasi dan Gejala Penyakit**

Mengukur masa inkubasi dimulai saat inokulasi virus hingga munculnya gejala pertama pada tanaman mentimun.

#### **B. Intensitas Serangan**

Rumus perhitungan dari intensitas serangan menggunakan rumus yang digunakan Prabaningrum dan Moekasan (2014) untuk menghitung intensitas penyakit, yaitu:

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

Keterangan :

P = Intensitas kerusakan tanaman (%)

v = Nilai (skor) kerusakan tanaman berdasarkan luas daun seluruh tanaman yang terserang, yaitu :

- 0 = Tidak ada kerusakan sama sekali
- 1 = Luas kerusakan tanaman > 0 - ≤ 10 %
- 2 = Luas kerusakan tanaman > 10 - ≤ 20 %
- 3 = Luas kerusakan tanaman > 20 - ≤ 40 %
- 4 = Luas kerusakan tanaman > 40 - ≤ 60 %
- 5 = Luas kerusakan tanaman > 60 %

n = Jumlah tanaman yang memiliki nilai v (kerusakan tanaman) yang sama

Z = Nilai (skor) tertinggi (v = 5)

N = Jumlah tanaman yang diamati

### C. Analisis Kadar Klorofil

Langkah yang dilakukan dalam analisis kadar klorofil dalam daun mentimun dapat diketahui dengan cara daun yang telah dibentangkan dengan sempurna, diambil sebanyak 1 gram. Potongan dari daun kemudian dihancurkan dengan mortar dan ditambahkan dengan 10 ml aseton 80%. Setelah itu, larutan didiamkan sejenak. Selanjutnya, larutan disaring dengan kertas saring whatman. 3 ml filtrat dimasukkan ke dalam kuvet yang selanjutnya dimasukkan ke dalam spektrofotometer. Absorbansi untuk larutan diukur dengan panjang gelombang 645 nm dan 663 nm (Harborne, 1987 dalam Peni *et al.*, 2004).

Berikut rumus yang dapat digunakan untuk perhitungan analisis kadar klorofil menurut Hendry dan Grime (1993) adalah:

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

### 3.8 Analisis Data

Pengaruh dari perbedaan metode aplikasi dan pemberian konsentrasi kitosan yang diberikan ke tanaman mentimun dapat diketahui dengan dilakukannya analisis data. Digunakan uji F pada taraf kesalahan 5%. Jika terdapat pengaruh nyata maka dilakukan pengujian lanjut dengan uji BNT dengan taraf kesalahan 5%.