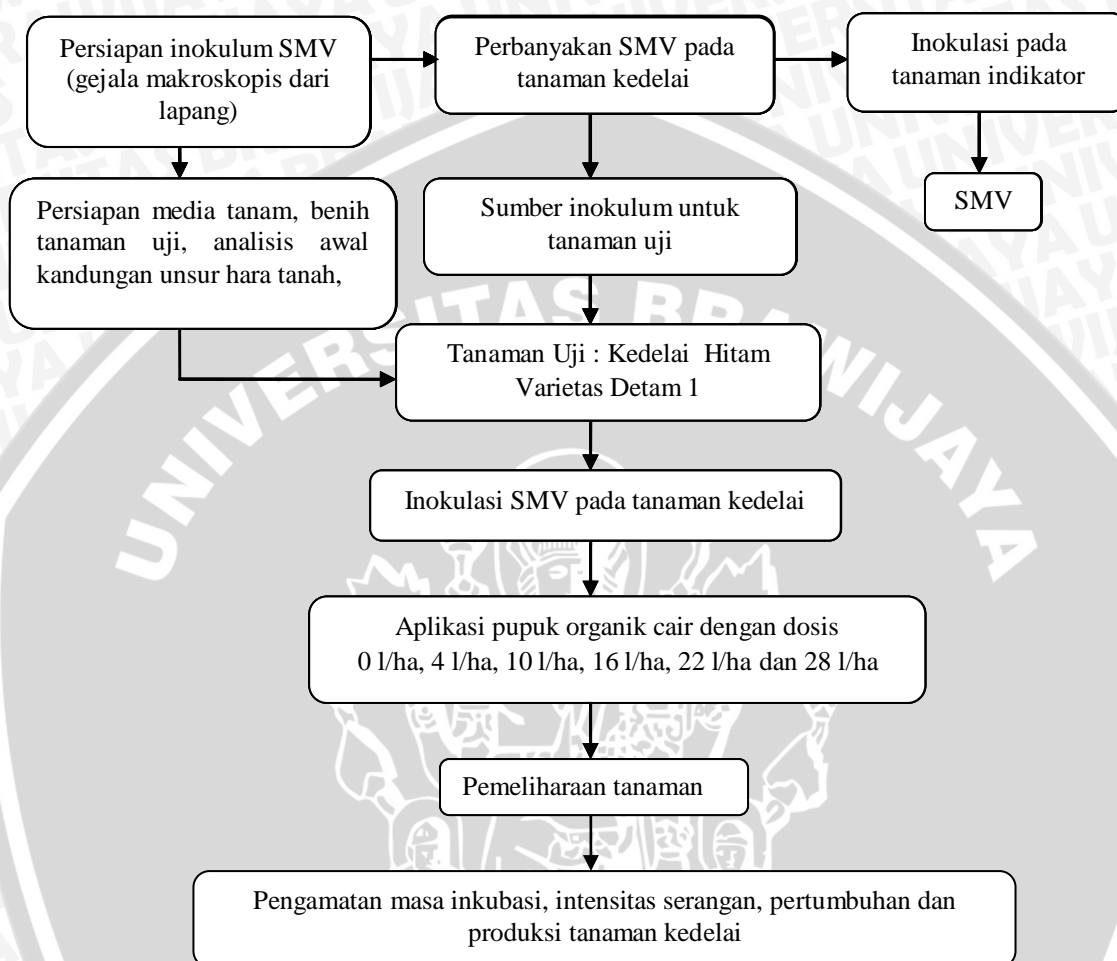


III. METODE PENELITIAN

3.1. Kerangka Operasional



Gambar 4. Kerangka Operasional

3.2. Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium dan Rumah Kawat Jurusan Hama Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang mulai bulan Januari - Mei 2013.

3.3. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah polibag (35cm x 17cm), gembor, sekop, mortar, kain kasa steril, kapas, plastik, gelas ukur, alat tulis, penggaris, timbangan analitik, oven, sprayer dan kamera digital.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah inokulum SMV pada daun kedelai sakit yang diperoleh dari lahan tanaman kedelai milik petani, benih tanaman kedelai hitam varietas Detam-1, *Chenopodium amaranticolor*, *Vigna unguiculata*, *Zinnia elegans*, *Gomphrena globosa*, tanah steril, formalin 5%, kompos, karborundum 500 mesh, larutan buffer fosfat 0.01 M pH 7, dan pupuk organik cair yang diproduksi oleh Pusat Pelayanan Agen Hayati (PPAH) Tani Makmur Kecamatan Beji Kabupaten Pasuruan.

3.4. Rancangan Percobaan

Percobaan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 12 perlakuan dan 3 ulangan. Sehingga diperoleh total 36 tanaman.

In4	I0	I4	In22	In16	In0
In28	I10	I28	In10	In16	I22
I0	In22	I28	In0	In28	I4
In4	I16	I10	In16	I22	In10
I4	In0	In28	I16	I28	I0
In16	I22	In22	I10	In4	In10

Gambar 5. Denah Rancangan Percobaan

Keterangan :

1. I0 = Tanaman kedelai tidak dipupuk (kontrol) dan diinokulasi SMV
2. I4 = Tanaman kedelai dipupuk 4 l/ha dan diinokulasi SMV
3. I10 = Tanaman kedelai dipupuk 10 l/ha dan diinokulasi SMV
4. I16 = Tanaman kedelai dipupuk 16 l/ha dan diinokulasi SMV
5. I22 = Tanaman kedelai dipupuk 22 l/ha dan diinokulasi SMV
6. I28 = Tanaman kedelai dipupuk 28 l/ha dan diinokulasi SMV
7. In0 = Tanaman kedelai tidak dipupuk (kontrol) dan tanpa diinokulasi SMV

8. In4 = Tanaman kedelai dipupuk 4 l/ha dan tanpa diinokulasi SMV
9. In10 = Tanaman kedelai dipupuk 10 l/ha dan tanpa diinokulasi SMV
10. In16 = Tanaman kedelai dipupuk 16 l/ha dan tanpa diinokulasi SMV
11. In22 = Tanaman kedelai dipupuk 22 l/ha dan tanpa diinokulasi SMV
12. In28 = Tanaman kedelai dipupuk 28 l/ha dan tanpa diinokulasi SMV

3.5. Persiapan Penelitian

3.5.1. Persiapan Inokulum

Inokulum awal SMV yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tanaman kedelai sakit yang diperoleh dari lahan tanaman kedelai milik petani di Kecamatan Purwosari, Kabupaten Pasuruan. Bentuk gejala daun melilit, melengkung, mosaik, berwarna lebih tua dibandingkan dengan daun yang sehat, dan rapuh. Daun juga dicirikan berkerut dan mempunyai gambaran mosaik dengan warna hijau gelap di sepanjang tulang daun. Tepi daun mengalami klorosis dan menjadi tidak rata (berkerut).

Untuk perbanyak inokulum dilakukan penularan secara mekanis pada daun tanaman kedelai sehat setelah berumur 10 hari setelah tanam (HST) sebagai inang virus SMV melalui cairan sari air perasan.



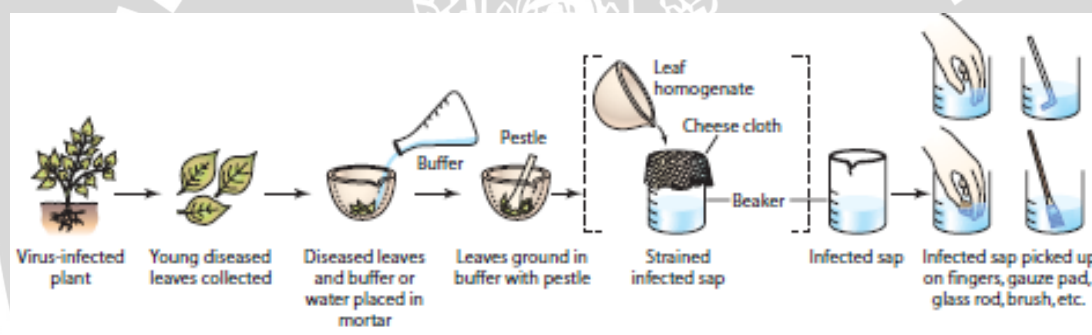
Gambar 6. Sumber Inokulum SMV Dari Lahan Tanaman Kedelai Varietas Wilis
Milik Petani

3.5.2. Pembuatan Sap Tanaman Kedelai

Daun kedelai yang terserang SMV ditimbang sebanyak 5 gram kemudian dilumatkan dengan mortar yang berfungsi untuk memecahkan sel tumbuhan dan

membantu keluarnya virus dari sel tanaman. Menurut Hadiastono, (1998) untuk memperoleh cairan perasan (sap) dilakukan dengan menghancurkan bagian jaringan sakit dengan menggunakan alat penumbuk (*grinder*). Pecahnya sel tumbuhan dapat membantu keluarnya virus dari sel ke cairan perasaan. Setelah ditumbuh halus, ditambah dengan buffer phospat 0.01 M pH 7 sebanyak 10 ml yang berfungsi untuk mempertahankan nilai pH agar tidak berubah.

Penambahan larutan penyangga (*buffer*), seperti larutan penyangga fosfat sangat diperlukan untuk kestabilan virus dalam cairan perasan, khususnya terhadap pengaruh keasaman yang dapat mempengaruhi persistensi virus (Hadiastono, 1998). Campuran daun yang telah dilumatkan dengan buffer phospat kemudian disaring dengan kain kasa atau diperas dengan kapas sehingga akan diperoleh cairan sap. Sap ini kemudian dimasukkan dalam gelas ukur 100 ml sebagai inokulum.



Gambar 7. Langkah Pembuatan SAP
Sumber : (Agrios, 2005)

3.5.3. Identifikasi Virus Menggunakan Tanaman Indikator

Identifikasi SMV pada tanaman kedelai dilakukan berdasarkan reaksi dari tanaman indikator yaitu *Chenopodium amaranticolor*, bunga kancing atau ronggo ino (*Gomphrena globosa*), bunga kertas (*Zinnia elegans*), dan kacang tunggak (*Vigna unguiculata*). Tanaman indikator adalah tanaman yang dapat memberikan gejala dengan jelas (Wahyuni, 2005). Menurut Osmond (2006), *Chenopodium amaranticolor*, *Gomphrena globosa*, *Vigna unguiculata ssp*, *Zinnia elegans*, merupakan inang alternatif bagi *Soybean Mosaic Virus* serta dapat berfungsi sebagai tanaman indikator. Tanaman indikator tersebut berbentuk bibit yang diperoleh dari kampung bunga di Desa Padas Kecamatan Batu. Masing-masing tanaman indikator ditanam dalam polibag 1 kg.

Tanaman Indikator bertujuan untuk meyakinkan kebenaran jenis virus yang menyerang pada tanaman kedelai. Penularan virus pada tanaman indikator dilakukan secara mekanik. *Chenopodium amaranticolor* yang diinokulasi SMV menunjukkan gejala nekrotik lesio lokal (Almeida *et al.*, 2002). Pada tanaman *G. Globosa* gejala SMV yang ditimbulkan adalah mosaik dan klorosis. Pada tanaman *V. unguiculata* (kacang tunggak) menunjukkan gejala belang semar dan gejala klorosis (Gultom, 2009).

3.5.4. Persiapan Media Tanam

Tanah yang akan digunakan sebagai media tanam, dilakukan sterilisasi terlebih dahulu dengan menggunakan formalin (5%). Kemudian ditutup plastik selama 7 hari dan dibolak-balik selama 3 hari sekali agar formalin merata. Menurut Sastrosuwignyo (1984 dalam Karjadi dan Sutiarsih 1990). Perlakuan tanah dengan penguapan atau zat kimia dapat mengeradikasi patogen tanah. Bravenboer (1973 dalam Karjadi dan Sutiarsih, 1990) juga menyebutkan bahwa, selain itu penguapan dan penggunaan sterilan dapat membunuh sebagian besar penyakit tular tanah yang menyerang tanaman muda.

Penggunaan formaldelyde (formalin) yang diberikan pada barisan tanam-tanaman pada waktu tanam dapat menekan serangan penyakit cendawan. Hasil percobaan-percobaan terdahulu, ternyata penggunaan sterilisasi dengan penguapan atau pemberian zat kimia (soil sterilant) pada tanah merupakan cara untuk membunuh patogen tanah (Karjadi dan Sutiarsih, 1990). Sterilisasi tanah dapat dilakukan fumigasi dengan formalin 5% dengan cara menuangkan 100 ml formalin 5% pada 4 kg tanah (Astiko, 2000).

Setelah tanah ditutup plastik selama 7 hari, plastik dibuka dan dikering anginkan, kemudian tanah diberi kompos untuk menambah unsur hara dengan perbandingan 1:1 dan ditutup plastik selama 2 minggu serta dibolak-balik selama 3 hari sekali. Lalu tanah diisikan pada polibag berukuran 3 kg (35cm x 17 cm). Kompos mengandung banyak mikroba, dengan ditambahkannya kompos ke dalam tanah, mikroba lain yang berada di dalam tanah akan terpacu untuk terus berkembang sehingga proses dekomposisi akan terus berlanjut di tanah tanpa mengganggu tanaman. Selama proses pengomposan, mikroba yang bersifat

patogen akan mati karena suhu yang sangat tinggi (Setyorini *et al.*, 2006). Percampuran kompos dan tanah dapat dicampur dengan perbandingan 1:1 (Heroeno, 2013).

3.5.5. Analisis Awal Kandungan Unsur Hara Dalam Tanah

Analisis kandungan unsur hara dalam tanah bertujuan untuk mengetahui kandungan unsur hara awal sebelum diberikan perlakuan penambahan berbagai dosis pupuk organik cair. Unsur hara tanah yang akan dianalisis sesuai dengan kandungan unsur hara dalam pupuk organik cair yang diproduksi oleh Pusat Pelayanan Agen Hayati (PPAH) tersebut meliputi N, P, K, serta pH tanah. Analisis unsur hara ini dilakukan di Laboratorium Kimia, Jurusan Tanah, Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya.

3.5.6. Persiapan Benih Tanaman Uji

Benih tanaman kedelai yang digunakan dalam penelitian adalah benih kedelai hitam varietas Detam-1 yang diperoleh dari Balitkabi (Balai Penelitian Kacang-Kacangan dan Umbi-Umbian) Malang. Benih-benih tersebut ditanam dalam polibag berukuran 3 kg (35cm x 17 cm) berisi media tanam yang telah disterilkan. Masing-masing media tanam berisi 2 benih kedelai. Setelah benih tumbuh dan muncul daun kelima dipilih tanaman kedelai yang pertumbuhannya baik untuk diinokulasi.

3.6. Pelaksanaan Penelitian

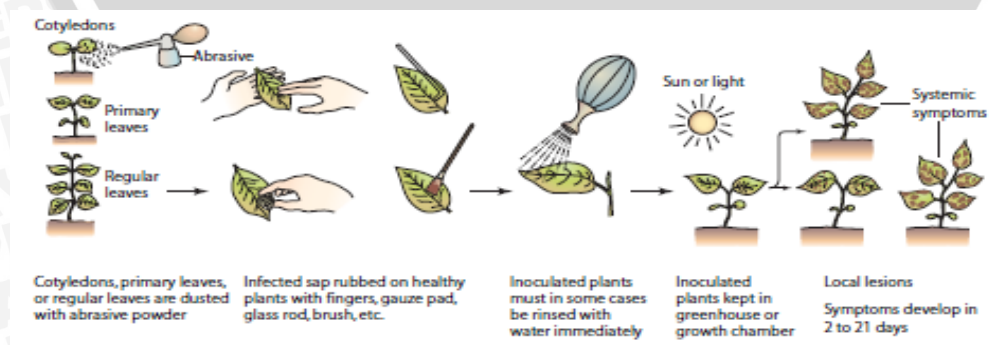
3.6.1. Inokulasi Virus Secara Mekanis Pada Tanaman Uji

Inokulasi dilakukan pada saat tanaman kedelai berumur 16 hari setelah tanam (HST), caranya yaitu pada permukaan daun termuda (pucuk) diberi karborundum 500 mesh dan diusapkan dengan jari tangan dengan lembut. Hal ini bertujuan untuk membuat pelukaan kecil dan mematahkan bulu-bulu daun tanpa melukai jaringan epidermis dan mematikan sel daun yang akan diinokulasi dengan SMV.

Abrasif sering ditambahkan dalam inokulum atau disemprotkan dengan tekanan pada permukaan daun untuk meningkatkan keberhasilan penularan. Bahan-bahan abrasif yang sering digunakan antara lain karborundum (kalsium karbida), atau tanah di atome seperti celit. Abrasif berperan menimbulkan luka mikroskopis pada dinding sel permukaan pada bagian tanaman yang diinokulasi (Hadiastono, 1998). Setelah diberi karborundum, kemudian mengusapkan cairan sari air perasan yang berisi suspensi inokulum virus pada permukaan daun termuda tersebut.

Daun yang diinokulasi tidak boleh lecet atau terluka oleh gosokan, karena luka pada sel-sel epidermis merupakan barrier penetrasi virus ke sel-sel lain. Oleh karena itu pada waktu inokulasi, usapan kapas atau jari-jari tangan yang lembut hanya diperlukan untuk mematahkan bulu-bulu daun saja, dan tidak sampai melukai jaringan epidermis. Virus tidak dapat mengawali replikasi pada sel-sel yang mengalami luka karena sel akan cepat mengalami nekrosis untuk menutup luka tersebut (Wahyuni, 2005). Setelah inokulasi selesai daun ditetesi dengan air dari perasan kapas sampai sisa-sisa sari air perasan tercuci.

Segera setelah inokulasi selesai, daun harus di semprot air sampai sisa-sisa sap daun tercuci. Hal ini untuk menghindari tertinggalnya residu senyawa penghambat inokulasi virus yang berasal dari sap daun, misalnya polifenol dan nuklease (Wahyuni, 2005). Perlakuan pencucian daun segera setelah perlakuan dengan air atau akuades dapat meningkatkan keberhasilan inokulasi. Hal ini bergantung pada ada tidaknya substansi antiviral (inhibitor) dalam cairan perasan (sap). Inokulum yang mengandung substansi antiviral, dengan perlakuan ini dapat meningkatkan keberhasilan inokulasi (Hadiastono, 1998).



Gambar 8. Langkah Inokulasi Secara Mekanik Pada Virus Tumbuhan
 Sumber : (Agrios, 2005)

3.6.2. Perlakuan Pemupukan

Aplikasi pupuk pada tanaman kedelai dilakukan empat kali dalam satu musim tanam. Yaitu pada umur 15 HST dan 25 HST untuk meningkatkan pertumbuhan vegetatif, 35 HST untuk pembungaan dan pembuahan, 49 HST untuk pengisian polong. Pemupukan dilakukan dengan cara disemprotkan pada daun. Pupuk yang diberikan adalah pupuk organik cair dengan dosis 0 l/ha, 4 l/ha, 10 l/ha, 16 l/ha, 22 l/ha dan 28 l/ha pada tanaman sakit (inokulasi SMV) dan tanaman sehat (tanpa inokulasi SMV). Aplikasi pupuk menggunakan volume semprot 600 l, sehingga diperoleh konsentrasi pupuk 4 l/ha (7 ml/l konsentrasi), 10 l/ha (17 ml/l konsentrasi), 16 l/ha (27 ml/l konsentrasi), 22 l/ha (37 ml/l konsentrasi), 28 l/ha (47 ml/l konsentrasi). Untuk menghindari pengaruh suatu perlakuan terhadap perlakuan lainnya, maka digunakan kertas sebagai pembatas (mika) pada saat penyemprotan agar pupuk tidak terkena tanaman lainnya.

3.6.3. Pemeliharaan Tanaman

Pemeliharaan tanaman meliputi penyiraman, penyiangan gulma serta pengendalian hama dan penyakit lain. Penyiraman dilakukan setiap 2 hari sekali, hingga tanah dalam kondisi lembab namun tidak becek. Tanaman kedelai memerlukan air yang cukup dan tidak menghendaki kelebihan air atau tanah becek selama pertumbuhannya (Marwoto *et al.*, 2009). Pengendalian gulma dilakukan secara mekanik dengan mencabut gulma yang tumbuh pada media tanam. Untuk pengendalian OPT dilakukan dengan menggunakan pestisida sesuai dengan jenis OPT yang menyerang. Untuk hama yang populasinya masih rendah dikendalikan secara mekanik yaitu dengan menangkap hama tersebut dan dimusnahkan.

3.7. Variabel Pengamatan

3.7.1. Masa Inkubasi dan Kenampakan Gejala

Masa inkubasi adalah waktu yang diperlukan suatu patogen mulai dari inokulasi sampai dengan muncul gejala pada inang. Sehingga masa inkubasi *Soybean Mosaic Virus*, merupakan waktu yang diperlukan tanaman kedelai mulai dilakukan inokulasi virus sampai munculnya gejala SMV. Pengamatan dilakukan

setiap hari, mulai dari pertama kali inokulasi sampai munculnya gejala pada semua perlakuan.

3.7.2. Intensitas Serangan *Soybean Mosaic Virus* (SMV)

Menurut Windhan dan Ross (1985 dalam Gultom 2009), intensitas serangan SMV pada tanaman uji dihitung dengan menggunakan rumus :

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

Dengan keterangan sebagai berikut :

- I : Intensitas serangan (%)
 n : Jumlah daun dalam tiap kategori serangan
 v : Nilai atau skor dari setiap kategori serangan (0-5)
 N : Jumlah daun yang diamati tiap dari kategori tertinggi (5)
 Z : Nilai skala dari tiap kategori serangan

Pengamatan intensitas serangan didasarkan pada nilai (skor) daun yang terserang (Tabel 3) dan dilakukan setiap 7 hari sekali.

Tabel 3. Penilaian Skor Daun Tanaman Sakit Berdasarkan Gejala Mosaik Yang Disebabkan Oleh *Soybean Mosaic Virus* (SMV) Pada Tanaman Kedelai (Prayogo, 2012).

Skor	Kategori Serangan Mosaik Pada Daun
0	Daun sehat
1	Gejala mosaik $\leq 50\%$ dari luas daun
2	Gejala mosaik $\geq 50\%$ dari luas daun
3	Gejala mosaik ditandai ukuran daun mengecil
4	Gejala mosaik ditandai daun mengecil dan mengkerut
5	Gejala mosaik dengan ukuran daun mengecil dan berkerut serta daun menggulung

3.7.3. Pertumbuhan Tanaman dan Produksi Tanaman

3.7.3.1. Pertumbuhan Tanaman

a. Tinggi Tanaman

Pengukuran tinggi tanaman dimulai dari pangkal batang sampai titik tumbuh tanaman dengan menggunakan penggaris (satuan cm). Pengukuran dilakukan setiap 7 hari sekali. Data pengamatan adalah rerata tinggi tanaman pada masing-masing ulangan dengan perlakuan dosis pupuk yang berbeda.

b. Jumlah Daun

Pengamatan jumlah daun dilakukan dengan cara perhitungan jumlah helai daun yang membuka sempurna pada setiap tanaman. Pengamatan dilakukan setiap 7 hari sekali. Data pengamatan adalah rerata jumlah daun pada masing-masing ulangan dengan perlakuan dosis pupuk yang berbeda.

c. Berat Basah

Pengamatan dilakukan dengan memanen semua tanaman dan polong kedelai hitam, serta membersihkan dari kotoran-kotoran seperti tanah yang menempel pada akar kemudian ditimbang berat basahanya (satuan gram).

d. Berat Kering

Pengamatan dilakukan setelah panen. Tanaman yang telah dipanen dan dibersihkan kotorannya, dioven selama 2x24 jam pada suhu 80°C, kemudian ditimbang berat keringnya (satuan gram).

3.7.3.2. Produksi Tanaman

a. Jumlah Polong Pertanaman

Jumlah polong dihitung pada tanaman yang telah menghasilkan polong, dan dihitung setelah panen. Data pengamatan adalah rerata jumlah polong pertanaman pada masing-masing ulangan dengan perlakuan dosis pupuk yang berbeda.

b. Bobot Polong Pertanaman

Pengamatan dilakukan dengan menimbang seluruh polong tanaman (satuan gram). Data pengamatan adalah rerata bobot polong pertanaman pada masing-masing ulangan dengan perlakuan dosis pupuk yang berbeda.

c. Jumlah Biji Perpolong

Pengamatan dilakukan dengan mengupas dan menghitung jumlah biji perpolong. Data pengamatan adalah rerata jumlah biji perpolong pada masing-masing ulangan dengan perlakuan dosis pupuk yang berbeda.

d. Bobot Biji Pertanaman

Bobot biji masing-masing tanaman dihitung dengan menimbang biji pertanaman pada masing-masing ulangan dengan perlakuan dosis pupuk yang berbeda (satuan gram).

e. Bobot 100 Biji

Bobot 100 biji dihitung dengan menimbang 25 biji pertanaman yang dipilih secara acak. Bobot 25 biji tersebut kemudian dikonversikan dalam bobot 100 biji (satuan gram).

3.7.4. Analisis Data

Analisis data dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan dari setiap tanaman uji. Data yang diperoleh dari setiap variabel pengamatan dianalisis dengan uji F pada taraf kesalahan 5 %, apabila terdapat beda nyata dilanjutkan pengujian menggunakan Uji Jarak Berganda Duncan (DMRT) pada taraf kesalahan 5%.