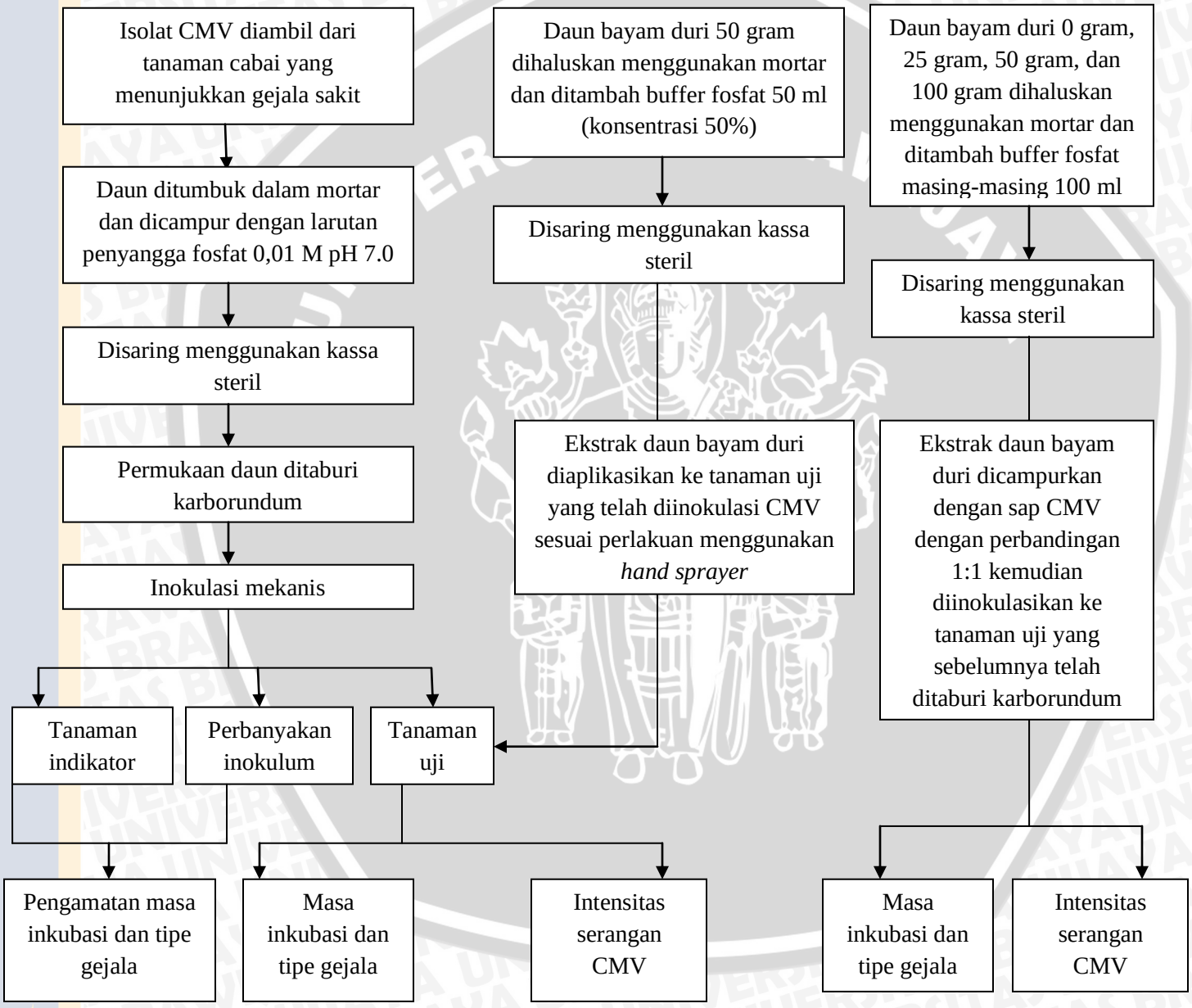
III. BAHAN DAN METODE

3.1 Kerangka Operasional Penelitian



3.2 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Rumah Kawat dan Laboratorium Penyakit Tumbuhan Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei sampai September 2014.

3.3 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mortar dan pistil, timbangan analitik, gelas ukur, nampan plastik, mistar, *hand sprayer*, polibag berukuran 5 kg, dan gunting.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah benih cabai besar varietas Hot Beauty, bayam duri (*Amaranthus spinosus*), inokulum CMV dari tanaman cabai besar yang menunjukkan gejala sakit, tanaman indikator berupa bunga kenop (*Gomphrena globosa*), karborundum 600 mesh, alkohol 70%, larutan penyangga fosfat 0,01 M pH 7.0, kain kasa steril, aquades, fungisida Dithane M-45, formalin 4%, pupuk urea, TSP, KCl, serta media tanam berupa tanah dan pupuk kandang.

3.4 Metode Percobaan

Penelitian ini menggunakan 2 metode percobaan. Percobaan pertama yaitu menguji peran ekstrak bayam duri sebagai penginduksi ketahanan tanaman cabai besar terhadap CMV dan percobaan kedua yaitu menguji peran ekstrak bayam duri sebagai inhibitor infeksi CMV pada tanaman cabai besar.

Percobaan pertama menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 4 kali ulangan. Setiap ulangan terdiri dari 2 tanaman sehingga diperoleh 40 tanaman uji. Perlakuan yang digunakan yaitu frekuensi tertentu ekstrak bayam duri yang diberikan pada tanaman cabai besar sebagai berikut.

A_0 : Tanpa aplikasi ekstrak bayam duri (kontrol)

A_1 : Ekstrak daun bayam duri diaplikasi sebanyak 1 kali pada tanaman cabai besar pada umur tanaman 14 HST

A_2 : Ekstrak daun bayam duri diaplikasi sebanyak 2 kali pada tanaman cabai besar pada umur tanaman 14 dan 18 HST

A_3 : Ekstrak daun bayam duri diaplikasi sebanyak 3 kali pada tanaman cabai besar pada umur tanaman 14, 18, dan 22 HST

A_4 : Ekstrak daun bayam duri diaplikasi sebanyak 4 kali pada tanaman cabai besar pada umur tanaman 14, 18, 22, dan 26 HST

Parameter yang diamati meliputi masa inkubasi dan intensitas serangan.

1. Masa inkubasi penyakit

Masa inkubasi penyakit diamati mulai dari setelah dilakukan inokulasi CMV sampai munculnya gejala pertama kali.

2. Intensitas serangan

Intensitas serangan diamati pada 7, 14, 21, dan 28 hari setelah inokulasi (HSI) dan dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

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

Keterangan :

I = intensitas serangan
n = jumlah tanaman skala tertentu
v = nilai skala tertentu
N = jumlah tanaman yang diamati
V = nilai skala keparahan tertinggi

Skala serangan berdasarkan Dolores (1996) adalah sebagai berikut.

0 = tanaman tidak menunjukkan gejala virus
1 = tanaman menunjukkan gejala mosaik sangat ringan, atau tidak ada penyebaran sistemik
2 = tanaman menunjukkan gejala mosaik sedang
3 = tanaman menunjukkan gejala mosaik atau belang berat tanpa penciutan atau kelainan bentuk daun
4 = gejala mosaik atau belang berat dengan penciutan atau kelainan bentuk daun
5 = gejala mosaik atau belang sangat berat dengan penciutan atau kelainan bentuk daun yang parah, kerdil, atau mati

Data yang diperoleh dianalisis dengan uji F dengan taraf kesalahan 5%. Apabila berbeda nyata, maka dilanjutkan dengan uji Beda NyataTerkecil (BNT) pada taraf kesalahan 5%.

Percobaan kedua menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 3 ulangan. Setiap ulangan terdiri dari 2 tanaman sehingga diperoleh 24 tanaman uji. Perlakuan yang digunakan yaitu perbedaan konsentrasi ekstrak bayam duri yang diinokulasikan bersamaan dengan CMV pada tanaman cabai besar sebagai berikut.

K0 : inokulum CMV (sap) tanpa dicampur ekstrak bayam duri (kontrol)
K1 : inokulum CMV (sap) dicampur dengan 25% ekstrak bayam duri
K2 : inokulum CMV (sap) dicampur dengan 50% ekstrak bayam duri
K3 : inokulum CMV (sap) dicampur dengan 100% ekstrak bayam duri

Parameter yang diamati meliputi masa inkubasi dan intensitas serangan. Untuk mengetahui pengaruh perlakuan yang diuji selanjutnya, data yang diperoleh dianalisis dengan uji F dengan taraf kesalahan 5%. Apabila berbeda nyata, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf kesalahan 5%.

3.5 Persiapan Penelitian

3.5.1 Persiapan Inokulum dan Identifikasi Virus

Inokulum awal CMV berasal dari tanaman cabai besar yang menunjukkan gejala sakit. Sebelum digunakan dalam percobaan, inokulum CMV terlebih dahulu dilakukan identifikasi dengan menggunakan tanaman indikator. Tanaman indikator yang digunakan ialah bunga kenop (*Gomphrena globosa*).

3.5.2 Persiapan Media Tanam

Media tanam yang digunakan berupa campuran tanah dan pupuk kandang dengan perbandingan 1 : 1. Tanah diayak dengan menggunakan ayakan tanah, kemudian disterilkan menggunakan formalin 4% dengan cara menyemprotkan ke permukaan tanah. Sterilisasi menggunakan formalin berfungsi untuk mematikan mikroba dalam tanah (serangga, nematoda, dan vektor). Selanjutnya, media tanam

ditutup menggunakan plastik selama ± 7 hari dan dibuka lalu dikeringanginkan. Setelah 7 hari, media tanam siap dipindahkan ke polybag berukuran 5 kg.

3.5.3 Persiapan Benih Tanaman Uji

Sebelum ditanam, benih cabai besar direndam pada air hangat 25°-30°C selama ± 1 jam. Perendaman benih bertujuan untuk mempercepat waktu dorman sehingga proses perkecambahan dapat berlangsung lebih cepat. Selain itu untuk mencegah penyakit, benih juga direndam dalam fungisida Dithane M-45 selama ± 5 menit. Benih disemaikan pada media semai berupa nampan plastik yang telah diisi dengan media tanam. Benih dipindahkan dari media semai ke polybag berukuran 5 kg setelah berumur ± 21 hari.

3.6 Pelaksanaan Penelitian

3.6.1 Metode Aplikasi Ekstrak Bayam Duri

Konsentrasi ekstrak daun bayam duri yang digunakan adalah 50% yang didapatkan dari hasil perbandingan 1 bagian daun dan 1 bagian buffer fosfat (50 gram daun bayam duri : 50 ml buffer fosfat). Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan konsentrasi yang sesuai untuk memicu ketahanan sistemik tanaman terhadap CMV (Hersanti, 2003). Daun ditimbang dan dicuci bersih, dihaluskan menggunakan mortar yang terlebih dahulu disterilkan menggunakan alkohol 70%, kemudian ditambahkan buffer fosfat sebanyak 50 ml. Ekstrak daun disaring menggunakan kain kasa steril. Penginduksian dilakukan dengan menyemprotkan sap ekstrak daun menggunakan *hand sprayer* pada dua helai daun cabai besar termuda (bukan kotiledon) yang telah membuka penuh berumur 30 hari setelah semai (Hersanti, 2003). Tiga puluh menit setelah aplikasi ekstrak bayam duri pada tanaman cabai besar, dilakukan pembilasan menggunakan air pada permukaan daun.

3.6.2 Metode Inokulasi Virus Secara Mekanis

Inokulasi CMV dilakukan 24 jam setelah aplikasi ekstrak bayam duri. Inokulum diperoleh dengan cara daun tanaman cabai besar sakit sebagai sumber inokulum CMV dicuci dengan menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada permukaan daun. Daun digunting dan dipisahkan dari tulang daunnya, kemudian ditumbuk dalam mortar steril. Tumbukan daun selanjutnya dicampur dengan larutan penyangga fosfat 0,01 M pH 7.0 dan disaring menggunakan kain kasa steril. Karborundum 600 mesh terlebih dahulu ditaburkan pada permukaan daun, kemudian sap dioleskan pada permukaan daun yang telah diinduksi oleh ekstrak bayam duri secara searah. Karborundum berfungsi untuk melukai sel-sel daun sehingga sap dapat terserap tanpa menyebabkan kematian jaringan tanaman. Pembilasan menggunakan air dilakukan beberapa saat setelah proses inokulasi dilakukan untuk menghilangkan sisa-sisa karborundum.

3.6.3 Peran Ekstrak Bayam Duri Sebagai Inhibitor Infeksi CMV pada Tanaman Cabai Besar

Konsentrasi ekstrak bayam duri yang digunakan adalah 0% (inokulum CMV tanpa dicampur ekstrak bayam duri), 25% (25 gram daun:100 ml buffer fosfat), 50% (50 gram daun:100 ml buffer fosfat), dan 100% (100 gram daun:100 ml buffer fosfat). Ekstrak daun bayam duri yang telah disaring kemudian dicampurkan dengan sap CMV dengan perbandingan 1:1. Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali dan setiap ulangan terdiri dari 2 tanaman uji. Inokulasi dilakukan dengan terlebih dahulu menaburkan karborundum 600 mesh pada permukaan daun, kemudian mengoleskan campuran ekstrak bayam duri dan sap CMV secara searah. Selanjutnya dilakukan pembilasan menggunakan air untuk menghilangkan sisa-sisa karborundum.

3.6.4 Pemeliharaan Tanaman

Pemeliharaan tanaman meliputi penyiraman, pengendalian gulma, dan pemupukan. Penyiraman dilakukan setiap hari hingga tanah pada polybag basah. Pengendalian gulma dilakukan secara mekanik dengan mencabut gulma yang tumbuh di sekitar polybag. Pupuk yang diberikan yaitu urea, TSP, dan KCl. Dosis pemberian pupuk sesuai rekomendasi ialah 150 kg/ha urea atau 3,75 g/tanaman, 100 kg/ha TSP atau 2,5 g/tanaman, dan 100 kg/ha KCl atau 2,5 g/tanaman. Pupuk TSP dan KCl diberikan satu hari sebelum tanam, sedangkan urea diberikan dengan dua tahap, yaitu pada saat tanaman berumur 14 hari dan 28 hari.