

3. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Desa Badas, Dusun Blaru, Kecamatan Pare, Kabupaten Kediri, berada pada ketinggian 125 mdpl dengan suhu 20-31⁰C, curah hujan 1000-2000 mm pertahun. Penelitian dilaksanakan pada bulan April 2013 sampai Juli 2013.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan tanam yang digunakan untuk penelitian adalah populasi kacang panjang P₁ (UB 715 A), populasi kacang panjang P₂ (Hitam Putih), populasi kacang panjang F₁ dan populasi kacang panjang F₂ serta pupuk Urea, SP36 dan KCl. Larutan KH₂PO₄ dan Na₂HPO₄ serta daun yang terkena penyakit kuning sebagai bahan isolasi virus. Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain cangkul, pisau, papan nama, mistar, label, rafia, kamera, spidol dan kertas gosok ukuran 0.

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian menggunakan metode *single plant*, yaitu dengan menanam semua populasi dalam satu populasi di lingkungan pertanaman yang sama tanpa ulangan dengan populasi kacang panjang P₁ (UB 715 A), kacang panjang P₂ (Hitam Putih) masing-masing adalah 100 tanaman dan kacang panjang F₁ sebanyak 50 tanaman serta populasi kacang panjang F₂ sebanyak 360 tanaman dengan pemberian 2 biji setiap lubang tanam. Jarak tanam yang dipakai adalah 50 cm x 60 cm dengan jarak antar bedengan sebesar 50 cm.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Persiapan Lahan

Sebelum dibajak lahan dibersihkan dari gulma. Setelah pembersihan gulma kemudian diolah dengan cara dicangkul untuk memperoleh struktur tanah yang gembur dan remah. Kemudian dibentuk guludan-guludan dengan ukuran 0,9 m x 2,5 m.

3.4.2 Penanaman

Penanaman kacang panjang dapat dilakukan dengan cara menanam manual di setiap lubang tanam. Setiap lubang tanam diberi 2 benih kacang panjang.

3.4.3 Pemeliharaan

Pemeliharaan meliputi penyulaman, penyiangan, pengairan, pemupukan dan perlindungan dari hama dan penyakit yang dilakukan sesuai dengan standar budidaya kacang panjang.

Penyulaman dilakukan 1 minggu setelah penanaman dengan mengganti tanaman yang rusak ataupun terkena hama dan penyakit. Pengairan dilakukan pada saat tanah menunjukkan gejala kekeringan, jadi penyiraman bisa dilakukan 1 hari sekali tergantung kondisi cuaca.

Pemupukan dengan cara ditugal ke dalam tanah dengan jarak ± 10 cm dari tanaman. Pemupukan dasar dengan takaran pupuk 50 kg/ha Urea, 75 kg/ha SP36 dan 25 kg/ha KCl, pemupukan kedua dengan menggunakan Urea sebanyak 50 kg/ha, 25 kg SP36 dan 75 kg/ha KCl dilakukan pada saat tanaman berumur 45 hari.

Penyiangan disesuaikan dengan kondisi lapang. Rumput-rumputan atau gulma yang tumbuh liar di areal pertanaman harus dikendalikan atau dilakukan penyiangan. Penyiangan dilakukan dua kali yaitu setelah tanaman berumur 3 dan 6 minggu sejak penanaman.

3.4.4 Pembuatan Buffer untuk Isolasi Virus (Hadiastono, 2012)

- Membuat larutan A (1,36 g KH_2PO_4 dalam 1 liter aquades)
- Membuat larutan B (1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dalam 1 liter aquades)
- Membuat larutan C (campuran dari 51 ml larutan B dan 49 ml larutan A dan menghasilkan 100 ml larutan 0,01 M larutan buffer phosphate pH 7.
- Membuat Buffer stabilator virus yaitu EDTA 0,001

3.4.5 Isolasi Virus

- Mencari tanaman yang terinfeksi sangat parah oleh virus kuning dan mengambil daunnya

- b. Menggerus jaringan daun yang terinfeksi tersebut sebanyak 50 gram dalam mortar sampai lumat dan ditambahkan 125 ml buffer phosphate (larutan C) dan 25 ml EDTA (buffer disimpan dikulkas)
- c. Cairan gerusan disaring dengan kertas saring
- d. Hasil saringan sebagai inokulum segera diinokulasikan atau disimpan di kulkas

3.4.6 Inokulasi Virus pada Tanaman Uji pada Umur 2 MST

- a. Melukai secara mekanis bagian daun yang muda dengan kertas gosok ukuran 0
- b. Mengoleskan cairan virus pada bagian daun yang telah dilukai tersebut.

3.4.7 Panen

Ciri kacang panjang yang siap panen adalah kacang panjang yang mudah dipatahkan dan biji-biji di dalam polongnya tidak menonjol. Waktu panen terbaik adalah pagi dan sore hari setelah tanaman berumur 45 HST, selanjutnya tanaman dipanen setiap satu minggu sekali.

3.5 Pengamatan

Pengamatan dilakukan 2 minggu setelah penanaman di lahan. Variabel yang diamati pada penelitian ini yaitu:

1. Intensitas penyakit

Intensitas penyakit diamati 2 minggu setelah inokulasi (MSI) pada setiap tanaman uji. Intensitas serangan penyakit (%) untuk setiap tanaman dihitung berdasarkan rumus persamaan (Hadiastono, 1998):

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

Keterangan:

- IP : Intensitas penyakit
- n : jumlah tanaman pada tiap indeks gejala
- v : indeks gejala pada tiap tanaman yang diamati
- N : jumlah total tanaman yang diamati
- V : indeks gejala tertinggi

Tabel 1. Penilaian gejala kerusakan daun akibat infeksi serangan penyakit kuning (Susetio, 2011)

No	Skor	Gejala serangan
1	0	Tidak ada gejala serangan
2	1	Daun khlorosis, daun kuning pucat 1 – 25%
3	2	Daun kuning pucat /belang kuning, tidak terjadi malformasi daun 25 – 50%
4	3	Daun kuning pucat, kuning /belang kuning, terjadi malformasi 1-3 daun 50 – 75%
5	4	Sama dengan no 3. Jumlah daun lebih dari 4 daun >75%

Skor dan kriteria ketahanan kacang panjang terhadap penyakit kuning berdasarkan intensitas penyakit

Tabel 2. Kriteria serangan penyakit (Sinaga, 2003)

Skor	Intensitas Penyakit (%)	Kriteria
1	$0 \leq X \leq 10$	Sangat Tahan
2	$10 < X \leq 20$	Tahan
3	$20 < X \leq 40$	Sedang
4	$40 < X \leq 70$	Rentan
5	$X > 70$	Sangat Rentan

2. Jumlah polong per tanaman, dihitung jumlah polong pada setiap tanaman, selanjutnya dirata- rata per populasi.
3. Jumlah biji per polong, dihitung biji tiap polong, selanjutnya di rata-rata per tanaman.
4. Panjang polong (cm), diukur dengan penggaris dari pangkal hingga ujung polong yang terbentuk tiap tanaman, selanjutnya dirata – rata per tanaman.
5. Bobot segar polong (g), menghitung bobot polong segar per tanaman mulai dari panen pertama sampai panen terakhir, selanjutnya dirata rata per tanaman.
6. Umur awal berbunga (HST), dihitung pada saat 50% populasi tanaman mulai berbunga.
7. Umur awal panen (HST), dihitung pada saat panen pertama.

3.6 Analisa Data

1. Pendugaan nilai heritabilitas

Nilai duga heritabilitas dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Syukur *et al.*, 2012):

$$h^2 = \frac{\sigma^2_{F_2} - \{(\sigma^2_{P_1} + \sigma^2_{P_2} + \sigma^2_{F_1})/3\}}{\sigma^2_{F_2}}$$

dimana:

$$\sigma^2_{F_2} = \text{varians } F_2$$

$$\sigma^2_{P_1} = \text{varians } P_1$$

$$\sigma^2_{P_2} = \text{varians } P_2$$

$$\sigma^2_{F_1} = \text{varians } F_1$$

Menurut stanfield (1991), nilai heritabilitas dikelaskan sebagai berikut:

- a. Rendah = $h^2bs < 0,2$
- b. Sedang = $0,2 < h^2bs \leq 0,5$
- c. Tinggi = $h^2bs > 0,5$

2. Estimasi jumlah pengendali gen

Analisa segregasi bertujuan untuk menduga jumlah gen yang berperan mengendalikan ketahanan. Rasio nilai pengelompokan data dicocokkan dengan setiap nilai harapan dan nilai pengamatan yang diuji dengan analisis chi-square.

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Dimana:

O_i = jumlah fenotip ke- i menurut hasil pengamatan

E_i = jumlah fenotip yang diharapkan

Untuk mengestimasi gen pengendali ketahanan, maka populasi F_2 akan dicocokkan terhadap beberapa nisbah yang sebelumnya sudah dikelompokkan menjadi beberapa kategori ketahanan yang dianalisis pada populasi F_2 . Nisbah tersebut dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Nisbah fenotipe karakter yang terkait adaptasi terhadap suatu cekaman yang dikendalikan oleh gen mayor pada populasi bersegregasi F₂ (Fehr, 1987)

Jumlah gen dan tipe aksi gen berdasarkan nisbah	Nisbah Fenotipe			
	T	AT	AR	R
Satu (1) pasang gen:				
a. Dominan penuh	3	-	-	1
b. Resesif	1	-	-	3
c. Tidak ada dominansi	1	2	-	1
Dua (2) pasang gen:				
a. Tidak ada epistasis	9	3	3	1
b. Resesif epistasis: aa epistatik terhadap B dan b	9	3	-	4
c. Dominan epistasis: A epistatik terhadap B dan b	12	-	3	1
d. Dominan dan resesif epistasis, A epistatik terhadap B dan b; bb epistatik terhadap aa	13	-	-	3
e. Resesif ganda (duplikat resesif epistasis): aa epistatik B dan b; bb epistatik terhadap A dan a	9	-	-	7
f. Isoepistasis: duplikat dominan epistasis. A epistatik terhadap B; B epistatik terhadap A dan a	15	-	-	1
g. Semiepistatis (interaksi duplikat)	9	6	-	1
h. Interaksi kompleks	10	3	-	3
Tiga (3) pasang gen				
A	37	-	-	27
B	45	-	-	19
C	55	-	-	9
D	27	9	9	19

Keterangan: T = Tahan AT = Agak tahan, AR = Agak rentan, R = Rentan