

### III. METODOLOGI

#### 3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan pada bulan April 2016 sampai dengan bulan Juli 2016 di Laboratorium Penyakit Tumbuhan, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan dan rumah kaca (*screenhouse*) Universitas Widyagama.

#### 3.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah polybag (5 kg), gembor, mortar, gelas ukur (100 ml), gunting, timbangan digital, leaf area meter, cetok, kerts label, cawan petri (diameter 9 cm), penggaris, plastik, *sprayer*, mikroskop elektron dan kamera.

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah inokulum TuMV dari tanaman sawi yang menunjukkan gejala spesifik serangan mosaik dari lapangan. Benih sawi varietas Tosakan, tanaman indikator *Chenopodium amaranticolor*. tanah steril, karborundum 600 mesh, larutan buffer fosfat 0,01 M pH 7, alkohol 70%, akuades steril, tissue steril, saringan (kasa steril), formalin 4%, kitosan Oligo saccharin (BM  $\leq$ 3kDa) diencerkan aquades untuk mendapatkan konsentrasi 1,0%, 1,1%, 1,2%, 1,3%, 1,4%, 1,5% kitosan sebanyak 100ml. Kitosan didapatkan dari Departemen THP Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Pertanian Bogor.

#### 3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini digunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 8 perlakuan. Setiap perlakuan diulang sebanyak 4 kali, sehingga diperoleh 32 percobaan. Perlakuan yang diberikan adalah tingkat konsentrasi dari kitosan untuk perendaman benih tanaman sawi. Perlakuan sebagai berikut:

P0 : Kontrol sehat tanpa inokulasi

P1 : Kontrol tanpa perlakuan kitosan diinokulasi virus TuMV

P2 : Perlakuan kitosan 1,0% + inokulasi virus TuMV

P3 : Perlakuan kitosan 1,1% + inokulasi virus TuMV

P4 : Perlakuan kitosan 1,2% + inokulasi virus TuMV

P5 : Perlakuan kitosan 1,3% + inokulasi virus TuMV

P6 : Perlakuan kitosan 1,4% + inokulasi virus TuMV

P7 : Perlakuan kitosan 1,5% + inokulasi virus TuMV

### 3.4. Persiapan dan Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1. Persiapan Inokulum dan Identifikasi TuMV

Inokulum TuMV yang digunakan berasal dari daun tanaman sawi yang menunjukkan gejala terinfeksi TuMV. Inokulum didapatkan dari Daerah Desa Torongrejo, Kecamatan Dau, Malang dan Desa Tulusayu Tumpang, Malang. Inokulum yang didapat kemudian diidentifikasi sebelum digunakan untuk penelitian. Identifikasi TuMV secara morfologi menggunakan *Transmission Electron Microscope* (TEM) yang berada di Lab. Kimia Universitas Gajah Mada. Selain menggunakan Mikroskop Elektron inokulum diidentifikasi pada tanaman indikator, yang diinokulasikan secara mekanis pada tanaman indikator yaitu *Chenopodium amaranticolor*.

#### 3.4.2. Persiapan Benih dan Penanaman Tanaman Uji

Benih Sawi yang digunakan dalam penelitian ini adalah benih sawi varietas Tosakan direndam didalam kitosan dengan konsentrasi sesuai perlakuan selama satu jam. Kemudian ditanam pada *polybag* 5kg yang sudah terisi dengan tanah dan pupuk kandang dengan perbandingan 2:1. Setiap *polybag* ditanami 1 benih sawi.

#### 3.4.3. Pembuatan Larutan Kitosan

Kitosan Oliga saccharin ( $BM \leq 3kDa$ ) didapatkan dari Departemen THP Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Pertanian Bogor, kitosan yang masih bersifat asam ditambahkan NaOH untuk menetralkan larutan tersebut, lalu diberikan aquades untuk mendapatkan konsentrasi 1,0%, 1,1%, 1,2%, 1,3%, 1,4%,1,5% kitosan. Kitosan yang sudah diencerkan dengan konsentrasi tersebut digunakan untuk merendam benih selama 1 jam pada tanaman sawi satu hari sebelum diinokulasi TuMV. Perlakuan kitosan dengan konsentrasi sempit yaitu hanya selisih 0,1 saja dikarenakan megacu pada penelitian sebelumnya.

#### 3.4.4. Pembuatan Inokulum TuMV

Pembuatan inokulum TuMV dilakukan setelah tanaman sawi sudah direndam kitosan dan Pembuatan SAP menggunakan daun tanaman sawi yang menampakkan gejala sakit karena infeksi TuMV. Cara Pembuatan SAP yaitu daun dicuci dan dipotong-potong, daun yang telah dipotong-potong diambil sebanyak 5 g dan ditambahkan larutan *buffer phospat* 0,01 M sebanyak 10 ml, lalu ditumbuk menggunakan mortar. Proses penumbukkan ini bertujuan untuk memecahkan sel tumbuhan sehingga dapat membantu keluarnya virus dari sel ke cairan perasan. Daun yang telah lunak setelah ditumbuk kemudian disaring dan diperas menggunakan kasa untuk mendapatkan SAP. Setelah disaring SAP sudah siap diinokulasikan ke tanaman sawi.

#### 3.4.5. Inokulasi TuMV pada Tanaman Sawi.

Penularan virus TuMV pada tanaman sawi dilakukan secara mekanis pada umur 7 hst (hari setelah tanam) dengan SAP yang mengandung TuMV. Inokulasi dilakukan pada daun muda yang telah membuka sempurna. Tanaman sawi dilukai tulang daunnya dengan mengoleskan karborundum, kemudian SAP TuMV diusapkan pada bagian daun yang telah dilukai. Proses pengolesan cairan SAP secara perlahan searah tulang daun dan tidak digosok berlawanan arah agar jaringan epidermis pada permukaan daun tidak rusak. Daun yang diinokulasi dibilas dengan tetesan air menggunakan kapas atau tissue bersih. Pembilasan setelah inokulasi dimaksudkan untuk menghilangkan sisa – sisa karborundum yang masih menempel pada permukaan daun.

#### 3.4.6. Pemeliharaan Tanaman Uji

Pemeliharaan tanaman meliputi penyiraman dan penyiangan gulma. Penyiraman dilakukan 1 kali sehari dilakukan pada pagi atau sore hari dengan menggunakan gembor. Pengendalian gulma dilakukan 1–2 kali setiap minggu setelah tanaman uji ditanam.

### 3.5. Parameter Pengamatan

#### 3.5.1. Masa Inkubasi

Masa inkubasi adalah waktu yang dibutuhkan patogen mulai inokulasi hingga muncul gejala pertama kali. Pengamatan masa inkubasi dan gejala tanaman dilakukan setiap hari sejak inokulasi TuMV sampai timbul gejala. Pengamatan masa inkubasi menggunakan hitungan hari.

#### 3.5.2. Intensitas Serangan

Intensitas serangan adalah besarnya serangan penyakit pada suatu area pertanaman yang dapat dinyatakan secara kumulatif. Pengamatan intensitas serangan dilakukan setiap hari sampai panen. Menurut Abadi (2003), untuk menggunakan intensitas serangan ditentukan dengan menggunakan rumus :

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

Keterangan :

I = Intensitas serangan

n = Jumlah daun dalam setiap kategori

v = Skala serangan

N = Jumlah daun yang diamati

Z = Skala kategori serangan tertinggi

Tabel 2. Penilaian skor daun tanaman sakit berdasarkan gejala mosaik

Skor	Kategori Serangan
0	Daun sehat
1	Luas mosaik pada daun < 25%
2	Luas mosaik pada daun > 25% < 50% disertai melepuh
3	Luas mosaik pada daun > 50% disertai melepuh
4	Malformasi, daun melepuh dan kerdil

#### 3.5.3. Luas Daun

Pengamatan luas daun dilakukan pada daun yang telah membuka sempurna dan dilakukan pada saat tanaman dipanen dan dipilih pada setiap tanaman 3 sampel daun yang terdiri dari daun kecil, daun sedang dan daun besar.

#### 3.5.4. Tinggi Tanaman

Pengamatan tinggi tanaman dilakukan dengan cara mengukur panjang batang tanaman mulai pangkal batang sampai ujung pertumbuhan tanaman sawi dengan menggunakan meteran jahit atau dengan penggaris. Pengamatan tinggi tanaman dilakukan pada saat tanaman telah di panen. Data pengamatan merupakan rerata tinggi tanaman.

#### 3.5.5. Bobot Basah Tanaman

Pengamatan bobot basah tanaman dilakukan pada saat tanaman baru dipanen, yaitu dengan menimbang berat mulai dari bagian akar tanaman, batang, dan daun tanaman sawi pada setiap perlakuan. Data pengamatan bobot basah merupakan rerata bobot basah tanaman (gram).

#### 3.5.6. Analisa Data

Untuk mengetahui pengaruh perbedaan konsentrasi dari kitosan terhadap tanaman sawi dilakukan analisis data. Menggunakan uji F pada taraf kesalahan 5%, apabila terdapat pengaruh nyata maka dilakukan pengujian dengan menggunakan uji DMRT pada taraf kesalahan 5%.



