

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2017 sampai bulan Mei 2017. Penelitian ini bertempat di Rumah Kaca Kelurahan Purworejo, Kecamatan Purworejo, Kota Pasuruan dan Laboratorium Penyakit Tumbuhan Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Universitas Brawijaya.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian ini adalah polibag berukuran 30x30 cm, label, gunting, plastik, cetok, timbangan analitik, gelas ukur, mortar dan penumbuk, botol semprot, botol kaca, cawan petri, gunting, orbital shaker, rotary evaporator, spektrofotometer, kertas kasa dan kamera.

Bahan yang digunakan yaitu inokulum TuMV yang berasal dari lapang yaitu tanaman sawi yang menunjukkan gejala spesifik serangan TuMV. Benih sawi yang digunakan adalah benih sawi varietas Shinta, ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.), ekstrak daun bayam duri (*Amaranthus Spinusus* L.), ekstrak kunyit (*Curcuma domestica* V.), ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.), ekstrak daun lidah buaya (*Aloe vera* L.), ekstrak daun bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa* L.), karborundum 600 mesh, alkohol 96%, NaoH, FeCl₃, alumunium foil, kapas, aquadest steril, kassa steril, pupuk kompos dan buffer fosfat 0,01 M dengan pH 7.

3.3 Metode Penelitian

Rancangan percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial dengan 2 faktor. Faktor pertama adalah cara aplikasi ekstrak yang terdiri dari dua aras yaitu permukaan daun dilukai dan permukaan daun tidak dilukai. Faktor kedua adalah jenis ekstrak tanaman yang terdiri dari enam jenis ekstrak tanaman yaitu ekstrak tanaman Sirsak (*Annona muricata* L.), Bayam Duri (*Amaranthus Spinusus* L.), Kunyit (*Curcuma domestica* V.), Kemangi (*Ocimum sanctum* L.), Lidah Buaya (*Aloe*

vera L.), Bunga Pukul Empat (*Mirabilis jalapa* L.). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali sehingga didapatkan 42 unit percobaan. Denah pengacakan dapat dilihat pada lampiran.

Untuk mengetahui pengaruh masing-masing perlakuan maka data dianalisis menggunakan uji F taraf kesalahan 5% dan apabila diperoleh data yang berbeda nyata dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil pada taraf kesalahan 5%.

Tabel 1. Kode Perlakuan

Jenis Ekstrak	Kode	Metode Aplikasi	
		Pelukaan Mekanis (M1)	Tidak Dilukai (M2)
Tanpa ekstrak (Kontrol)	P0	M1P0	M2P0
Ekstrak daun sirsak	P1	M1P1	M2P1
Ekstrak daun bayam duri	P2	M1P2	M2P2
Ekstrak kunyit	P3	M1P3	M2P3
Ekstrak daun kemangi	P4	M1P4	M2P4
Ekstrak daun lidah buaya	P5	M1P5	M2P5
Ekstrak daun bunga pukul empat	P6	M1P6	M2P6

3.4 Persiapan Penelitian

a. Persiapan Inokulum TuMV

Inokulum TuMV yang digunakan berasal dari tanaman sawi yang telah terserang virus TuMV dan yang menunjukkan gejala spesifik serangan TuMV. Sebelum inokulum TuMV digunakan dalam penelitian, terlebih dahulu dilakukan identifikasi menggunakan tanaman indikator. Inokulum berbentuk sap diinokulasikan secara mekanis pada tanaman indikator *Chenopodium amaranticolor* dan *Gomphrena globosa* termasuk tanaman yang dapat menunjukkan gejala spesifik serangan TuMV yaitu klorotik dan lesio lokal (Brunt *et al.* dalam Plant Virus Online, 1997)

b. Persiapan Media Tanam

Tanah yang digunakan dalam penelitian adalah tanah yang telah disterilkan terlebih dahulu. Tanah disterilkan dengan cara mencampur formalin 4% kedalamnya secara merata kemudian setelah tercampur tanah ditutup menggunakan plastik selama

tujuh hari. Setelah tanah ditutup selama tujuh hari, plastik dibuka kemudian tanah dikering anginkan selama tiga hari. Setelah bau formalin pada tanah hilang, tanah siap dipindahkan ke dalam polibag. Proses pensterilan tanah perlu dilakukan terlebih dahulu untuk mencegah kontaminasi dari patogen lain pada tanah yang akan digunakan. Tanah yang telah melalui proses sterilisasi kemudian dicampur pupuk kompos dengan perbandingan 1:1.

c. Persiapan Benih Tanaman Uji

Benih sawi yang digunakan pada penelitian ini menggunakan benih varietas Shinta. Benih disemai terlebih dahulu pada baki persemaian (tray) yang telah diisi tanah yang telah disterilkan. Bibit hasil persemaian berumur 14 hst dengan jumlah daun 4-5 helai dipindahkan ke dalam polibag untuk keperluan percobaan.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

a. Pembuatan Sap untuk Inokulum TuMV

Daun tanaman sawi yang menampilkan gejala TuMV dicuci dan dipotong-potong, kemudian diambil sebanyak 5 gram dan ditumbuk dengan mortar. Penumbukan daun berfungsi untuk memecahkan sel tumbuhan untuk membantu keluarnya virus dari sel ke dalam cairan perasan. Kemudian ditambahkan buffer fosfat 0,01 M, pH 7 sebanyak 10 ml. Pemberian buffer berfungsi untuk menstabilkan keasaman (pH) cairan perasan yang dapat mempengaruhi persistensi virus. Setelah ditambahkan buffer phospat disaring menggunakan kasa steril. Sap siap untuk diinokulasi pada tanaman.

b. Pembuatan Ekstrak Tumbuhan Penginduksi Ketahanan Sistemik

Proses pembuatan ekstrak tumbuhan penginduksi ketahanan sistemik dibagi menjadi tiga metode yaitu metode untuk preparasi. Preparasi ekstraksi pertama dilakukan untuk ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.), ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.), ekstrak daun bayam duri (*Amaranthus spinosus* L.), dan daun bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa* L.) kemudian metode preparasi ekstraksi kedua dilakukan untuk ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica* V.) dan preparasi

metode ketiga dilakukan untuk mendapatkan ekstrak daun lidah buaya (*Aloe vera* L.). Metode ekstraksi yang dilakukan menggunakan metode maserasi. Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan. Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah yang tertutup rapat pada suhu kamar. Cara ini sesuai, baik untuk skala kecil maupun skala industri (Agoes, 2007).

Metode Ekstraksi Pada Daun Sirsak, Daun Kemangi, Daun Bayam Duri dan Daun Bunga Pukul 4

Daun yang akan diekstraksi diambil dan dicuci kemudian dioven pada suhu 40°C selama 3 hari. Sampel dihaluskan menggunakan mortar dan penumbuk kemudian diayak hingga diperoleh hasil serbuk. Serbuk seberat 50 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang selanjutnya direndam dengan 250 mL etanol 96%. Erlenmeyer ditutup dengan alumunium foil kemudian diletakkan pada orbital shaker selama 24 jam. Ekstrak yang diperoleh disaring menggunakan kertas saring kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 80°C sampai proses penguapan selesai sehingga diperoleh ekstrak pekat daun.

Metode Ekstraksi Pada Rimpang Kunyit

Rimpang kunyit dicuci dan dikupas kemudian dikukus pada suhu 82-85°C selama 4-5 menit. Rimpang kunyit diblender dengan ditambah sedikit air. Bubur dari rimpang kunyit dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C hingga bubur kering kemudian butiran yang menggumpal dihaluskan menggunakan mortar hingga diperoleh serbuk. Serbuk seberat 50 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang selanjutnya direndam dengan 250 mL etanol 96%. Erlenmeyer ditutup dengan alumunium foil kemudian diletakkan pada orbital shaker selama 24 jam. Ekstrak yang diperoleh disaring menggunakan kertas saring kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 80°C sampai proses penguapan selesai sehingga diperoleh ekstrak pekat daun.

Metode Ekstraksi Pada Daun Lidah Buaya

Daun lidah buaya dikupas kemudian dicuci. Daging daun diblender hingga halus. Bubur dari daun lidah buaya dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 70°C hingga bubur mengering. Bagian yang menggumpal dihaluskan menggunakan mortar hingga didapatkan serbuk. Serbuk seberat 50 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang selanjutnya direndam dengan 250 mL etanol 96%. Erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil kemudian diletakkan pada orbital shaker selama 24 jam. Ekstrak yang diperoleh disaring menggunakan kertas saring kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 80°C sampai proses penguapan selesai sehingga diperoleh ekstrak pekat daun.

c. Pelukaan Permukaan Daun Sawi

Proses pelukaan dilakukan dengan menggunakan karborundum 600 mesh yang dilakukan dengan mengusapkan karborundum ke permukaan daun sawi secara perlahan sehingga dapat menimbulkan luka tanpa menyebabkan kematian jaringan tanaman.

d. Aplikasi Ekstrak Tumbuhan

Aplikasi ekstrak dilakukan pada daun tanaman sawi yang berumur 3 minggu setelah tanam. Daun yang diaplikasikan ekstrak adalah daun muda yang telah membuka sempurna. Proses aplikasi dilakukan dengan menyemprotkan masing-masing ekstrak yang telah dibuat pada permukaan daun, pada proses aplikasi ekstrak tumbuhan ada dua perlakuan yaitu ekstrak tumbuhan disemprotkan pada permukaan daun yang telah dilakukan pelukaan terlebih dahulu dan yang kedua disemprotkan pada permukaan daun yang sebelumnya tidak dilakukan proses pelukaan. Setelah aplikasi ekstrak kemudian dilakukan pembilasan menggunakan aquades dilakukan setelah \pm 30 menit untuk membersihkan sisa karborundum agar tidak mengganggu proses fisiologi.

e. Inokulasi SAP pada Tanaman Sawi

Inokulasi sap virus TuMV dilakukan satu minggu setelah aplikasi ekstrak tumbuhan. Inokulasi dilakukan dengan cara permukaan daun tanaman sawi yang akan diinokulasi ditaburi karborundum 600 mesh kemudian digosok secara perlahan untuk pelukaan pada permukaan daun. Pemberian karborundum bertujuan untuk menambah abrasive, yang berperan menimbulkan luka mikroskopis pada dinding sel permukaan pada bagian tanaman yang diinokulasi (Hadiastono, 1998). Setelah pemberian karborundum, cairan sap diusapkan pada permukaan daun searah tulang daun dan tidak dilakukan dengan berlawanan arah agar jaringan epidermis pada permukaan daun tidak rusak. Daun yang sudah diberi cairan sap dilakukan pembilasan menggunakan aquades yang dilakukan setelah 5-10 menit sebelum permukaan daun mengering untuk membersihkan sisa karborundum agar tidak mengganggu proses fisiologi.

f. Pemeliharaan Tanaman

Pemeliharaan tanaman meliputi penyiraman, pengendalian gulma serta pengendalian OPT (Organisme Pengganggu Tanaman). Penyiraman dilakukan setiap hari pada pagi atau sore hari. Pengendalian gulma dilakukan dengan interval waktu dua hari sekali, pengendalian dilakukan dengan cara mekanis yaitu dengan mencabut gulma yang tumbuh di sekitar tanaman sawi. Pengendalian OPT dilakukan dengan cara mekanis yaitu dengan mengambil langsung hama yang menyerang tanaman sawi.

3.6 Parameter Pengamatan

a. Masa Inkubasi dan Gejala Penyakit

Masa inkubasi diukur mulai inokulasi virus sampai munculnya gejala pertama pada tanaman sawi. Pengamatan dilakukan satu hari setelah inokulasi sampai munculnya gejala pertama pada daun yang masih muda setelah perlakuan. Tanaman

sawi yang terserang TuMV menunjukkan gejala malformasi, mosaik, *vein clearing*, maupun melepuh (*blister*) setelah terinfeksi.

b. Intensitas Serangan

Intensitas serangan gejala virus mosaik dapat dihitung menggunakan metode skoring menurut Abadi (2003) yang disajikan dalam Tabel 2. Sedangkan perhitungan persentase daun tanaman sawi yang terserang penyakit virus mosaik TuMV dapat dihitung dengan rumus persamaan:

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

Tabel 2. Penilaian skor daun tanaman sakit.

Skor	Kategori serangan
0	Daun sehat
1	Luas daun terserang mencapai ≥ 1 - $< 25\%$
2	Luas daun terserang mencapai ≥ 26 - $< 50\%$
3	Luas daun terserang mencapai ≥ 51 - $< 75\%$
4	Luas daun terserang mencapai ≥ 76 - $< 100\%$

Keterangan :

I : Intensitas serangan

n : Jumlah daun dari tiap kategori serangan

V : Nilai skala tiap kategori serangan

N : Jumlah daun yang diamati

Z : Nilai skala dari kategori serangan tertinggi

c. Analisis Kandungan Klorofil

Terganggunya pertumbuhan tanaman seperti tinggi tanaman dan luas daun akibat infeksi virus secara tidak langsung dapat berpengaruh negatif terhadap perkembangan tanaman melalui gangguan pada proses fisiologi dalam tanaman seperti proses fotosintesis, selain penurunan lebar daun, infeksi virus dapat menyebabkan munculnya mosaik pada daun tanaman muda yang diikuti dengan

klorosis yang secara umum akan mengurangi jumlah total klorofil akibatnya mengurangi efisiensi fotosintesis tanaman (Hooks, 2008)

Analisis kadar klorofil dilakukan menggunakan spektrofotometer berdasarkan prosedur yang dilakukan oleh Hendry dan Grime (1993) sebagai berikut: Daun yang telah membentang sempurna diambil 1 gram, kemudian potongan daun tersebut dihancurkan dalam mortar dan kemudian ditambahkan 10 ml aseton 80%. Penggerusan dilakukan sampai seluruh klorofil larut dalam aseton 80% dengan ampas telah menjadi putih. Setelah itu 3 ml filtrat dimasukkan ke dalam kuvet kemudian dimasukkan ke dalam spektrofotometer. Absorbansi (A) diukur pada panjang gelombang 645 nm dan 663 nm. Konsentrasi klorofil dihitung dengan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

A : Nilai absorbansi

d. Bobot dan Skala Kualitas Panen

Pengukuran bobot sawi dilakukan setelah dilakukannya panen, sawi terlebih dahulu dicuci dan dibersihkan kemudian ditimbang semua bagian tanaman beserta akarnya menggunakan timbangan digital untuk mengetahui bobot sawi dalam satuan gram. Penentuan skala kualitas panen dibagi menjadi menjadi 3 skala yang dibuat menyesuaikan dengan hasil dari variabel-variabel pengamatan yang lain kemudian ditentukan standar pengukuran skala untuk tanaman uji.

Tabel 3. Skala Kualitas Panen

Skala	Variabel Pengamatan		
	Tinggi Tanaman (termasuk akar)	Presentase Daun Sehat	Bobot Segar (termasuk akar)
1	> 50 cm	> 60%	> 250 gram
2	> 40 cm- ≤49 cm	30-60%	200-250 gram
3	≤ 40 cm	0-30%	< 200 gram

3.7 Analisis Data

Data hasil pengamatan dianalisis dengan Analisis Ragam atau uji F taraf kesalahan 5%. Apabila hasil analisa diperoleh data yang berbeda nyata dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil pada taraf kesalahan 5%.