UJI EFEKTIVITAS BERBAGAI ELIMINASI PMMoV (*Pepper Mild Mottle Virus*) PADA BENIH CABAI PAPRIKA (*Capsicum annuum* L. var. *grossum*) DI PT BISI INTERNATIONAL Tbk

Oleh

SATRIA PRIMA BUDI UTAMA

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS PERTANIAN

MALANG

2017

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

UJI EFEKTIVITAS BERBAGAI ELIMINASI PMMoV (*Pepper Mild Mottle Virus*) PADA BENIH CABAI PAPRIKA (*Capsicum annuum* L. var.*grossum*) DI PT BISI INTERNATIONAL Tbk

Oleh:

SATRIA PRIMA BUDI UTAMA

135040207111001

PROGRAM STUDI AGROEKOTEKNOLOGI

MINAT HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh Gelar Sarjana Pertanian Strata Satu (S-1)

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS PERTANIAN

JURUSAN HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN

MALANG

2017

Repository Universitas Brawijaya

REPOSITORY.UB.AC.ID

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KEMENTERIAN RISET TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI UNIVERSITAS BRAWIJAYA FAKULTAS PERTANIAN

LEMBAR PERSETUJUAN SKRIPSI

Judul Penelitian : UJI EFEKTIFITAS BERBAGAI ELIMINASI PMMoV (*Pepper Mild Mottle Virus*) PADA BENIH CABAI PAPRIKA (*Capsicum annuum*. L var. *grossum*) DI PT BISI INTERNATIONAL Tbk.

Nama Mahasiswa : SATRIA PRIMA BUDI UTAMA

NIM : 135040207111001

Jurusan : Hama dan penyakit tumbuhan

Program Studi : Agroekoteknologi

Disetujui Oleh :

Pembimbing Utama,

Prof. Dr. Ir. Tutung Hadiastono, MS.
NIP. 19521028 197903 1 003

Pembimbing Pendamping II,

Dr. Ir. Mintarto Martosudiro, MS.
NIP. 19590705 198601 1 003

Pembimbing Pendamping III,

Hoerussalam, SP. M.Sc
NIK. 20600517

Diketahui,
Ketua Jurusan

Dr. Ir. Ludji Pantja Astuti, MS
NIP. 19551018 198601 2 001

Tanggal Persetujuan:

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

LEMBAR PENGESAHAN

Mengesahkan
MAJELIS PENGUJI

Penguji I	Penguji II
Hoerussalam, SP., M.Sc. NIK. 20600517	Dr. Ir. Mintarto Martosudiro, MS. NIP. 19590705 198601 1 003
Penguji III	**Penguji IV**
Prof. Dr. Ir. Tutung Hadiastono, MS. NIP. 19521028 197903 1 003	Luqman Qurata Aini, SP., MSi., Ph.D NIP. 19550522 198103 1 006

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang sepengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Malang, 09 Agustus 2017

Satria Prima Budi Utama
NIM. 135040207111001

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Skripsi ini kupersembahkan untuk kedua orang tua tercinta,
Ibunda Eni Sulis Sianti dan Ayahanda Drs. Nanang Dwi Wijono
Serta Adinda Anisa Fa'izah Septianti.

RIWAYAT HIDUP

Penulis merupakan anak pertama dari dua bersaudara dari pasangan Bapak Drs. Nanang Dwi Wijono dan Ibu Eni Sulis Sianti yang di lahirkan di Lamongan pada tanggal 7 Maret 1995. Penulis pernah menempuh pendidikan dasar di SDN 01 Ngimbang Lamongan pada tahun 2001-2007, kemudian pada tahun 2007 melanjutkan pendidikan di SMPN 1 Ngimbang Lamongan hingga tahun 2010, dan selanjutnya pada tahun 2010 melanjutkan pendidikan di SMAN 1 Ngimbang Lamongan hingga lulus pada tahun 2013. Tahun 2013 penulis terdaftar sebagai mahasiswa Strata-1 Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang, Jawa Timur, melalui jalur SPMK.

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif dalam organisasi dan pernah menjadi staff kewirausahaan dan pengembangan profesi di CADS (Center for Agriculture Development Studies) dan anggota bidang fotografi Bengkel Seni Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya pada periode kepengurusan 2013-2014. Pada tahun 2014 penulis pernah menjadi Koordinator FORKOM FM (Forum Komunikasi Mahasiswa Fotografi Malang) pada periode kepengurusan 2014-2015, Penulis juga pernah aktif dalam beberapa kegiatan kepanitiaan diantaranya yaitu POSTER (Program Orientasi Studi Terpadu) pada tahun 2014 sebagai divisi keamanan, menjadi panitia pengawas dalam acara PEMIRA UB (Pemilihan Mahasiswa Raya) pada tahun 2014. Penulis pernah mengikuti kegiatan magang kerja di PT BISI International Tbk.

Repository Universitas Brawijaya

RINGKASAN

Satria Prima Budi Utama. 135040207111001.Uji Efektifitas Berbagai Eleminasi PMMoV (*Pepper Mild Mottle Virus*) Pada Benih Cabai Paprika (*Capsicum annuum*. L var. *grossum*) DI PT BISI INTERNATIONAL Tbk . Dibawah Bimbingan Prof. Dr. Ir. Tutung Hadiastono, MS. sebagai Pembimbing Utama , Dr. Ir. Mintarto Martosudiro, MS. dan Hoerussalam, SP. M.Sc sebagai Pembimbing Pendamping.

Cabai paprika (*Capsicum annum* .L. var. *grossum*) merupakan tanaman sayuran yang mulai dikenal di Indonesia pada tahun 1990-an. Di Eropa dan Amerika paprika banyak digunakan sebagai penyedap makanan. Penanaman paprika semakin berkembang akibat meningkatnya kebutuhan pasar sehingga memiliki prospek yang cerah untuk di budidayakan. PMMoV (*Pepper Mild Mottle Virus)* merupakan virus yang dikategorikan sebagai *seedborne* pada *C. annuum* dan *C. frutescens,* Masalah kesehatan benih merupakan hal yang penting untuk dijaga agar tidak mempengaruhi produksi tanaman paprika. Oleh karena itu diperlukan pengujian kesehatan benih dan mengkaji cara yang efektif untuk mengeleminasi virus yang terbawa benih, mengingat kebutuhan untuk persyaratan distribusi benih harus terbebas dari spesifik patogen target. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkaji perlakuan yang efektif untuk pengendalian penyakit pada benih Paprika (*C. annum.* L. *var.grossum*). Hipotesa pada penelitian ini ialah PMMoV yang menginfeksi benih Paprika (*C. annum*. L. *var.grossum*) dapat tereleminasi dengan perlakuan fisik, kimia atau senyawa nabati.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Proteksi Tanaman, Laboratorium Molekuler Departemen Bioteknologi PT. BISI Internasional, Tbk dan *green house* di Dusun Jungo, Desa Bumiaji, Kota Batu di mulai dari Desember 2016 sampai dengan Mei 2017. Metode pengujian efektivitas perlakuan pada penelitian ini menggunakan *Double Antibody Sandwich Enzyme-linked immunosorbent assay* (DAS- ELISA) dan *Reverse Transciptase Polymerase Chain Reaction* (RT- PCR). Penelitian terdiri dari 6 perlakuan, dengan masing- masing perlakuan diulang sebanyak 4 ulangan. Parameter yang diamati ialah hasil DAS- ELISA, Uji *Grow Out Test* (GOT) meliputi daya kecambah dan vigor dan Uji gejala tanaman meliputi masa inkubasi dan kejadian penyakit. Data pengamatan dianalisis mengunakan analisis ragam pada taraf 5 %. Bila hasil pengujian terdapat perbedaan yang nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT pada taraf 5 %.

Hasil pengujian *Double Antibody Sandwich Enzyme-linked immunosorbent assay* (DAS- ELISA) menunjukkan perlakuan perendaman benih paprika dalam ekstrak minyak daun cengkeh 4% selama 20 menit dan *Trisodium phosphate* (TSP) 9.6% selama 2 jam efektif menghilangkan virus pada benih cabai paprika. Berdasarkan hasil analisis ragam menunjukkan bahwa semua perlakuan dapat menurunkan daya perkecambahan dibandingkan dengan kontrol, Perlakuan perendaman benih dengan TSP 9.6% selama 2 jam direkomendasikan karena memiliki daya kecambah sebesar 88.3%. Berdasarkan hasil analisis ragam semua perlakuan tidak berbeda nyata terhadap kejadian penyakit namun perlakuan perendaman benih dengan TSP 9.6% selama 2 jam memiliki presentase kejadian penyakit terkecil (30.0%) dibandingkan dengan perlakuan lainya.

Repository Universitas Brawijaya

SUMMARY

Satria Prima Budi Utama. 135040207111001. Effectiveness of PMMoV (*Pepper Mild Mottle Virus)* Elimination in Bell Pepper (*Capsicum annuum*. L var. *grossum*) Seed in PT BISI International Tbk. Under the supervision of Prof. Dr. Ir. Tutung Hadiastono, M.S. as main supervisor, Dr. Ir. Mintarto Martosudiro, M.S., and Hoerussalam, SP. M.Sc. as secondary supervisor.

Bell Pepper (*Capsicum annuum* L. *var. grossum*) is a horticultural product and it started to be popular in Indonesia in 1990s. In Europe and America, bell peppers are utilized as food spices. Cultivation of bell peppers come to an increase as the result of their rising demand, and thus it becomes a prospect of profit. PMMoV (*Pepper Mild Mottle Virus*) is categorized as seed-borne plant virus on C. annum and C. frutescens. Seed health issue is an important thing. Thus, it is also important to assess seed health and figure out and effective way of seed-borne plant virus elimination, as it is required to distribute virus-free seeds. The objective of this reseach was to figure out an effective treatment for bell peppers' disease management. The hypothesis tested in this research was PMMoV infecting bell pepper seed can be eliminated with physical, chemical, or natural compund treatment.

This research was conducted in Plant Protection Laboratory, Molecular Laboratory of Biotechnology Department of PT BISI Internasional, Tbk., and a greenhouse in Jungo Hamlet, Bumiaji Village, Batu City from December 2016 up to May 2017. The effectiveness test in this research consisted of Double Antibody Sandwich Enzyme-linked Immune Sorbent Assay (DAS- ELISA) and Reverse Transciptase Polymerase Chain Reaction (RT- PCR). There were 6 treatments in this experiment, with 4 repetitions for each one. Observation parameters were DAS-ELISA results, Grow Out Test (GOT) consisting seed viability and seed vigor index, also, plant symptom test consisting disease incubation period and incidence. Observation data were analyzed with variance analysis. The data were further analyzed with 5% level of Least Significant Difference test if they appeared to be significantly different.

Results of DAS-ELISA test showed that treatment immersion in 4% of clover leave extract for 20 minutes and immersion in 9.6 % of trisodium phosphate for 2 hours were effective to eliminate seed-borne virus. According to variance analysis results, all treatments decreased seed viability, compared to control. Treatment P4 could be recommended as it showed 88,3% of seed viability. Variance analysis results showed that all treatments were not significantly different in terms of plant disease incidence. However, treatment P4 proved to have the lowest disease incidence (30.0 %) compared to others.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa yang telah senantiasa memberikan rahmat, taufik dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian skripsi yang berjudul "Uji Efektifitas Berbagai Eleminasi PMMoV (Pepper Mild Mottle Virus) Pada Benih Cabai Paprika (Capsicum annum L. var. grossum) Di PT BISI INTERNATIONAL, Tbk."

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Prof. Dr. Ir. Tutung Hadiastono, MS. selaku Dosen Pembimbing Utama, Dr. Ir. Mintarto Martosudiro, MS. dan Hoerussalam, SP. M.Sc. selaku Pembimbing Pendamping atas kesabaran, nasihat, arahan, dan bimbingan kepada penulis. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Rudy Lukman, Ph.D. selaku kepala Departemen Bioteknologi PT BISI Internasional, Tbk yang telah memberikan izin dan mengakomodasi kepada penulis untuk melakukan penelitian di perusahaan tersebut. Terima kasih juga disampaikan kepada Dr. Ir. Ludji Pantja Astuti, MS. Selaku Ketua Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya atas motivasi dan dukungan selama proses penelitian skripsi ini.

Penghargaan yang tulus juga penulis sampaikan kepada Ibunda Eni Sulis Sianti dan Ayahanda Drs. Nanang Dwi Wijono serta Adik tercinta Anisa Fa'izah Septianti atas perhatian, motivasi serta doa yang selalu dipanjatkan. Semoga hasil dari penelitian ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Malang, 09 Agustus 2017

Penulis

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR ISI

RINGKASAN i
SUMMARY ii
KATA PENGANTAR iii
RIWAYAT HIDUP iv
DAFTAR ISI v
DAFTAR TABEL vi
DAFTAR GAMBAR vii
DAFTAR LAMPIRAN viii

1.PENDAHULUAN 1
1.1. Latar Belakang 1
1.2. Rumusan Masalah 2
1.3 .Tujuan 2
1.4. Hipotesis 2
1.5. Manfaat 3
1.6. Kerangka Konseptual Penelitian 3

2. TINJAUAN PUSTAKA 4
2.1. Deskripsi Tanaman Paprika 4
2.2. Karakteristik *Pepper Mild Mottle Virus* (PMMoV) 4
2.3. Benih Bermutu 8
2.4. Perlakuan Benih 9
2.5. Metode Serologi Enzyme- Linked Immunosorbed Assay (ELISA) 9
2.6. Metode Reverse Transciptase Polymerase Chain Reaction (RT- PCR) 12

3. METODE PENELITIAN 14
3.2. Kerangka Operasional Penelitian 14
3.3. Tempat dan Waktu 15
3.4. Alat dan Bahan 15
3.5. Metode Penelitian 16
3.6. Persiapan penelitian 16
3.7. Pelaksanaan Penelitian 20
3.8. Analisis Data 24

4. HASIL DAN PEMBAHASAN 25
4.1. Hasil penelitian 25
4.2. Pembahasan Umum 35

5. KESIMPULAN DAN SARAN 39
5.1. Kesimpulan 39
5.2. Saran 39

DAFTAR PUSTAKA 40
LAMPIRAN 45

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR TABEL

Nomor **Halaman**

Teks

1. Komponen campuran PCR (RT- PCR two step) 19
2. Hasil uji ELISA pada benih sebelum perlakuan 25
3. Hasil uji ELISA setelah perlakuan eliminasi PMMoV pada benih cabai paprika varietas SP Maxima 26
4. Pengaruh perlakuan eleminasi PMMoV (*Pepper Mild Mottle Virus*) pada benih cabai paprika varietas SP Maxima terhadap daya tumbuh bibit 29
5. Perbandingan Masa Inkubasi dan Gejala PMMoV pada tanaman paprika varietas SP Maxima 30
6. *Disease Incidence* pada tanaman paprika varietas SP Maxima 32

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR GAMBAR

Nomor **Halaman**

Teks

1. Partikel PMMoV 5
2. Gejala PMMoV pada tanaman Cabai Paprika 6
3. Diagram varian teknik elisa..... 11
4. Siklus PCR..... 12
5. Plate uji serologi ELISA, eliminasi PMMoV pada benih cabai paprika varietas SP Maxima 27
6. Gejala PMMoV pada tanaman paprika 31
7. Bandpita RNA pada tanaman paprika 33
8. Amplifikasi cDNA menggunakan primer spesifik PMMoV ... 34

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor **Halaman**

Lampiran

1. Tabel pengacakan pada greenhouse 45
2. Uji pendahuluan presentase vigor daya kecambah benih perlakuan dry heat treatment 45
3. Hasil analisis sidik ragam vigor benih paprika 45
4. Hasil analisis sidik ragam uji daya kecambah benih paprika. 45
5. Uji pendahuluan pengaruh perlakuan ekstrak bunga cengkeh dan ekstrak daun cengkeh terhadap perkecam bahan benih paprika 46
6. Hasil analisis sidik ragam Masa Inkubasi dan Gejala PMMoV pada tanaman paprika varietas SP Maxima 46
7. Hasil analisis sidik ragam presentase *Disease Incidence* pa da tanaman paprika varietas SP Maxima pada 7 hst 46
8. Hasil analisis sidik ragam presentase *Disease Incidence* pa da tanaman paprika varietas SP Maxima pada 14 hst..... 46
9. Dokumentasi uji daya kecambah benih paprika 47
10. Dokumentasi insiden penyakit tanaman paprika 50
11. Dokumentasi penelitian 54
12. Deteksi PCR Pada Tanaman Uji Yang Bergejala Virus Menggunakan Primer Gemini Virus (*Tomato Yellow Leafcurl Virus, Mungbean Yellow Mosaic Virus, Pepper Yellow Leaf Curl Virus*) 56

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

UNIVERSITAS BRAWIJAYA
REPOSITORY.UB.AC.ID
Repository Universitas Brawijaya

1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Cabai paprika (*Capsicum annum* .L. var. *grossum*) merupakan tanaman sayuran yang mulai dikenal di Indonesia sejak tahun 1990-an. Paprika banyak digunakan sebagai penyedap makanan di Eropa dan Amerika. Selain itu paprika bermanfaat pada industri farmasi dalam formulasi obat-obatan, kosmetik, pewarna bahan makanan, serta bahan campuran pada berbagai industri pengolahan makanan (Cahyono, 2003). Berdasarkan hal tersebut paprika memiliki potensi yang besar untuk dibudidayakan, akan tetapi dalam proses budidaya terkendala oleh beberapa hal salah satunya adalah organisme penggangu tanaman (OPT).

Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) merupakan virus yang dikategorikan sebagai *seedborne* pada *C. annuum* dan C. *frutescens* (Avgelis, 1986). Virus ini terbawa oleh benih spesies *Capsicum* sehingga benih yang terinfeksi mungkin telah didistribusikan dengan tidak sengaja secara Internasional, sehingga mungkin lebih luas dari yang dilaporkan sekarang dan mungkin terjadi diseluruh dunia (Lamb *et al*., 2001).

Masalah kesehatan benih merupakan hal yang penting untuk dijaga agar tidak mempengaruhi produksi tanaman paprika, Menurut Suena *et al.,* (2005) benih dinyatakan berkualitas baik jika benih memiliki presentase perkecambahan yang tinggi, kekuatan tumbuh yang tinggi, serta terbebas dari hama dan penyakit. Terkait mutu patologis benih dikatakan baik apabila benih itu sehat hal ini sesuai dengan pendapat (Sutopo, 2012) benih dikatakan sehat jika benih tersebut bebas dari patogen, baik berupa bakteri, cendawan, virus maupun nematoda. Maka dari itu diperlukan pengujian kesehatan benih untuk mencegah kerugian karena serangan patogen terbawa benih.

Benih yang terkontaminasi patogen harus diberi perlakuan benih yang tepat agar dapat mengeleminasi *patogen* terbawa oleh benih terutama virus. Di hampir negara maju, pengujian benih merupakan kegiatan yang rutin dilakukan (Klag, 1997). Di Indonesia, pengujian kesehatan benih belum merupakan kegiatan yang secara rutin dilakukan sehubungan dengan sertifikasi benih (Saleh, 2008; Situmeang, *et al.,* 2014). Salah satu faktor tidak adanya pengujian kesehatan benih karena anggapan bahwa indonesia masih terbebas dari OPT penting yang masuk dalam daftar dilarang oleh banyak negara (Anwar, et al.,2005).

Berdasarkan pendapat (Demski, 1981; Avgelis, 1986) TMV (*Tobacco Mosaic Virus*) pada benih paprika secara substansial dapat dihilangkan dari kulit benih dengan perlakuan benih yang direndam dalam 4,2 % NaCl (*Sodium hypoclorite*) selama 15 menit dan 10% Na_3PO_4 (*Trisodium fosfat*) selama 30 menit, atau dengan pemanasan kering (*Dry heat*) pada benih selama 72 jam pada suhu 70^0C. Selain itu penggunaan senyawa nabati minyak cengkeh dengan konsentrasi 3%, 4% dan 5% dapat bersifat toksik terhadap patogen terbawa benih (Ilyas *et al*., 2007).

Salah satu alternatif untuk pengendalian patogen terbawa benih dengan cara perlakuan benih. Meskipun tidak semua virus dapat ditularkan melalui benih, tetapi sampai saat ini telah diketahui lebih dari 100 jenis virus dapat terbawa dan ditularkan oleh benih (Wahyuni. W.S, 2005). Untuk mengatasi kendala tersebut maka perlunya mengkaji lebih lanjut mengenai cara yang efektif untuk mengeleminasi virus yang terbawa benih, mengingat kebutuhan untuk persyaratan distribusi benih harus terbebas dari spesifik patogen target.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah :

1. Apakah perlakuan benih paprika (*C. annum.* L. *var.grossum*) secara fisik, kimia dan senyawa nabati dapat mengeleminasi PMMoV?
2. Apakah perlakuan eliminasi virus pada benih paprika (*C. annum.* L. *var. grossum*) dengan metode secara fisik, kimia dan senyawa nabati berpengaruh terhadap daya tumbuh benih?

1.3. Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengkaji efektivitas eliminasi fisik, kimia, dan senyawa nabati untuk pengendalian penyakit pada benih paprika (*C. annum.* L. *var.grossum*).
2. Mengkaji pengaruh perlakuan fisik, kimia, dan senyawa nabati terhadap daya tumbuh benih paprika (*C. annum.* L. *var.grossum*).

1.4. Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah:

1. PMMoV yang menginfeksi benih paprika (*C. annum.* L. *var.grossum*) dapat tereleminasi dengan perlakuan fisik, kimia atau senyawa nabati.
2. Perlakuan benih Paprika secara fisik, kimia, dan senyawa nabati tidak berpengaruh terhadap daya berkecambah benih paprika (*C. annum.* L.

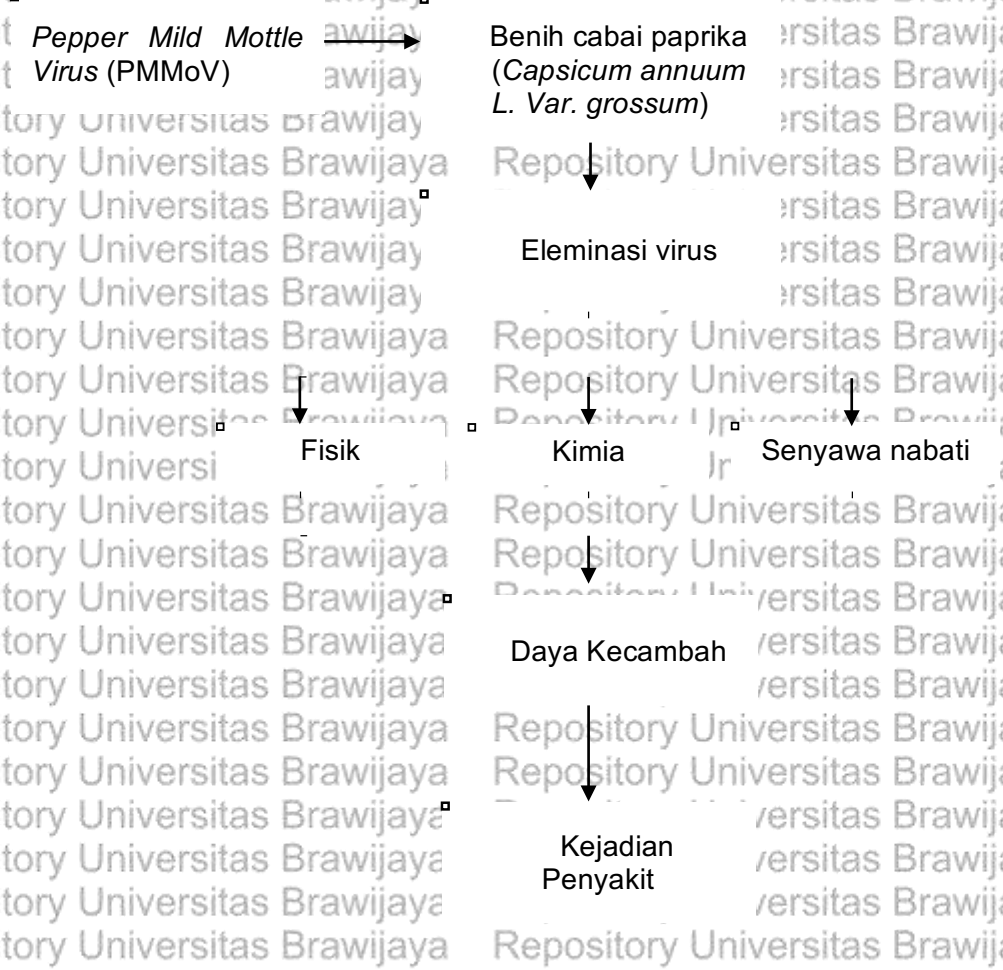
var.grossum).

1.5. Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai perlakuan benih yang baik untuk eliminasi virus sebagai salah satu cara pengendalian.

1.6. Kerangka Konseptual Penelitian

Kerangka konseptual penelitian adalah logika ilmiah yang disusun berdasarkan teori dan hasil-hasil penelitian yang telah teruji.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Deskripsi Tanaman Paprika

Berdasarkan pendapat Prihmantoro dan Indriani (1995), tanaman paprika mempunyai nama ilmiah *Capsicum annuum.* L .*var. grossum* atau sering disingkat dengan *Capsicum grossum*. Cabai termasuk satu keluarga dengan tanaman tomat dan terung, yaitu famili *Solanaceae*.

Paprika merupakan tanaman yang masuk ke dalam klasifikasi divisi *Spermatophyta* dan sub divisi *Angiospermae* termasuk dalam kelas *Dicotyledoneae*, ordo *Solanales* dengan genus *Capsicum*, spesies *Capsicum annuum*, varietas *grossum*.

Paprika membutuhkan kondisi tertentu untuk pertumbuhannya, yaitu suhu 24-30° C pada siang hari dan 9-12^{0} C pada malam hari. Meskipun demikian, tanaman paprika masih dapat bertahan pada suhu 38^{0} C. Di Indonesia, tanaman paprika cocok ditanam didataran tinggi yang bersuhu 16-25^{0} C (Prihmantoro dan Indriani, 1995). Tanaman paprika baru mulai dibudidayakan di Indonesia pada tahun 1990. Propinsi Jawa Barat merupakan salah satu pusat penanaman paprika di Indonesia (Gunawan, 2009).

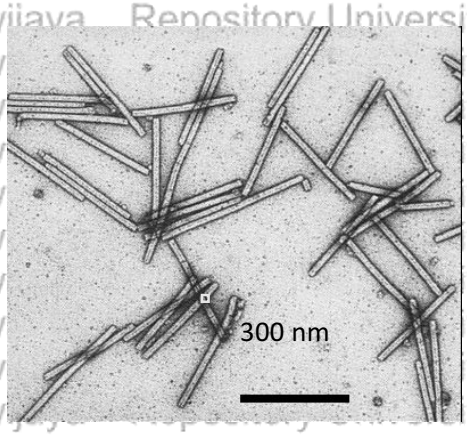
Bentuk buah paprika mirip lonceng, sehingga dinamakan *bell pepper*. Meskipun aroma buah paprika pedas menusuk, namun rasanya tidak pedas, bahkan cenderung manis sehingga disebut *sweet pepper*. Paprika pada umumnya dibedakan menurut bentuk, warna, dan ukuran. Pada umumnya bentuk paprika dibedakan menjadi dua bentuk, yaitu bentuk blok (*blocky*) atau lonceng (*bell*) dan bentuk lonjong (*lamujo*). Paprika dikelompokkan berdasarkan 4 warna utama yaitu merah, hijau, kuning dan jingga (Gunawan, 2009). Paprika hijau merupakan paprika yang paling banyak dibudidayakan dan dikonsumsi. Selanjutnya paprika merah menempati urutan kedua. Urutan ketiga atau yang paling jarang dibudidayakan adalah paprika kuning (Prihmantoro dan Indriani, 1995).

2.2. Karakteristik *Pepper Mild Mottle Virus* (PMMoV)

2.2.1. Deskripsi Morfologi PMMoV

PMMoV merupakan virus yang termasuk dalam famili Vigaviridae, genus Tobamovirus, spesies *Pepper Mild Mootle Virus* (ICTVdb, 2015) memiliki partikel berbentuk batang dengan ukuran 18x297-312 nm (nano meter), virus ini berisi 158 asam amino, dan memiliki komposisi yang berbeda dari tobamoviruses

lainnya (Wetter *et al*., 1984; Pares, 1985, 1988). Partikel virus ini mengandung RNA untai tunggal dengan massa molekul diperkirakan 210.000 (Xiang *et al*., 1994). RNA genomik dari beberapa isolat terbukti mengandung 6.357 nukleotida, dan memiliki empat bingkai terbuka membaca (ORFs) yang dikodekan, masing-masing 126 K protein dan membaca 183 K protein (nukleotida 70-4908), 28 K protein (nukleotida 4909-6582) dan 17,5 K mantel protein (nukleotida 5685-6158).



Gambar 1. Partikel PMMoV (M. Marte, 1986 dalam DPV)

PMMoV pertama kali ditemukan di Amerika Serikat sebagai strain laten pada tembakau mosaik virus (McKinney, 1952). Setidaknya ada enam Tobamovirus menginfeksi paprika secara alami namun ada beberapa keraguan tentang identitas virus, oleh karena itu distribusi geografis Tobamovirus dilaporkan menginfeksi paprika sebelum tahun 1984 (Wetter *et al*., 1984). Virus ini terbawa oleh benih spesies *Capsicum* dan benih yang terinfeksi mungkin telah didistribusikan dengan tidak sengaja secara Internasional, sehingga mungkin lebih luas dari pada yang dilaporkan sekarang dan mungkin terjadi diseluruh dunia (Lamb *et al*., 2001).

2.2.2. Penularan PMMoV

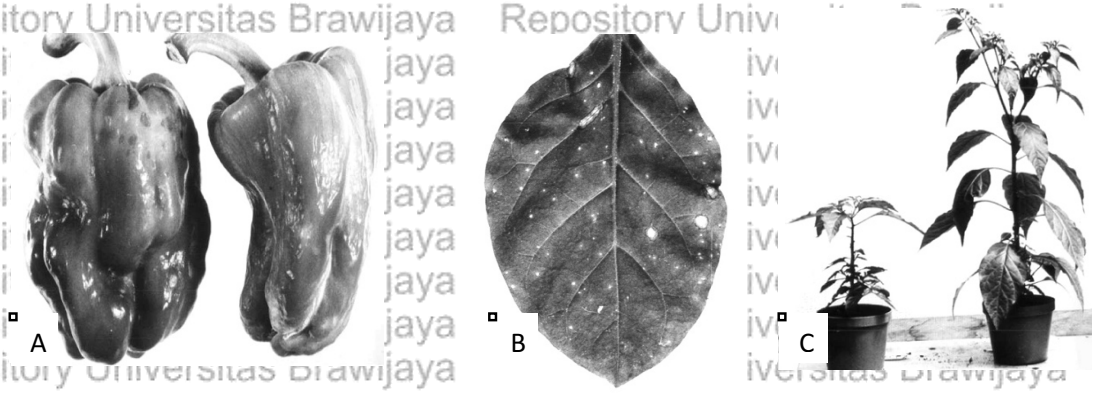
Virus *Pepper Mild Mootle Virus* (PMMoV) belum dilaporkan dapat ditularkan melalui vektor, tetapi melalui 22% dari benih C. *frutescens* (McKinney, 1952) dan melalui 29% dari benih C. *annuum* (Tosic *et al*., 1980).

Berdasarkan pendapat dari Pares *et.al*.(1992) bahwa virus PMMoV biasanya ditemukan pada kulit luar benih, tetapi sangat jarang ditemukan pada endosperm benih dari tanaman terinfeksi. Tingkat infeksi *seedborne* berkisar antara 0,23% dan 100%. Virus ini bersifat sangat stabil dan mudah menular jika

dalam lingkungan *in vitro*. Hal ini sama seperti tobamoviruses lainnya yaitu dapat menyebar dari tanaman yang terinfeksi ke tanaman sehat yang tidak dipelihara dengan baik. Virus ini dapat menular melalui inokulum terbawa dalam cairan gutasi dari daun tanaman sakit.

2.2.3. Inang dan Gejala PMMoV

Virus ini dapat menginfeksi secara sistemik serta memiliki kisaran inang sangat luas, salah satunya adalah genus *Capsicum spp.* Sejauh ini dilaporkan bahwa virus PMMoV memiliki kisaran inang yang sangat luas diantaranya adalah kultivar paprika (misalnya 'Lamuyo' dan 'Yolo Keajaiban') dan cabai (C. *baccatum*, C. *cardenasei*, C. *chacoense*, C. *chinense*, C. *eximium*, C. *frutescens*, C. *microcarpum*, C. *praetermissum*, C. *pubescens*) yang kebal atau hipersensitif (Conti, 1984). Gejala yang ditimbulkan pada tanaman yang terifeksi virus ini yaitu klorosis ringan, buah mengecil, malformasi, berbintik-bintik dan kerdil yang sangat parah apabila menginfeksi sejak awal pertumbuhan.



Gambar 2. Gejala yang sebabkan oleh PMMoV pada tanaman cabai paprika (A. Gejala pada buah yang menyebabkan buah mengecil, B. Daun pada tanaman indikator *Xanthi-nc* yang telah diinokulasi oleh virus PMMoV menyebabkan lesio nekrotik, C. Tanaman *Capsicum frutescens* terinfeksi secara sistemik (kiri); tanaman yang sehat (kanan) (M. Marte, 1986 dalam DPV).

2.2.4. Transmisi PMMoV

Benih yang diekstrak dari buah tanaman cabai yang terinfeksi secara alami oleh PMMoV memiliki tingkat transmisi sekitar 36% apabila ditanam pada tanah yang disterilkan (Avgelis, 1986). Hal ini sama seperti virus pada benih lainnya, apabila bibit terinfeksi secara mekanik dari kulit benih yang terkontaminasi pada saat transplantasi dapat menular ke tanaman yang sehat.

Berdasarkan pendapat Genda *et al*. (2005) bahwa PMMoV menginfeksi pada epidermis dan parenkim benih, akan tetapi tidak ditemukan pada

endosperm atau embrio, namun dalam beberapa hal hanya terjadi dipermukaan luar dari epidermis dan plasenta. Virus ini juga dapat stabil bertahan dalam tanah pada puing-puing yang terinfeksi dari tanaman sebelumnya sehingga juga dapat menjadi sumber utama terjadinya infeksi (Pares dan Gunn, 1989). Virus ini juga cenderung menyebar dengan cepat pada tanaman yang tumbuh dalam sistem hidroponik jika larutan nutrisi terinfeksi dan apabila tidak disterilkan (Pares *et al*., 1992).

2.2.5. Pencegahan dan Pengendalian Virus PMMoV

1. Pencegahan Pengendalian secara Kimia dan Fisik

PMMoV secara substansial dapat dihilangkan dari kulit biji dengan cara benih direndam pada 4,2% *sodium hypochlorite* selama 15 menit atau 10% trisodium fosfat selama 30 menit (Demski, 1981; Avgelis, 1986).

Selain itu perlakuan dengan minyak panas pada 80° C selama 3 hari dapat mengurangi PMMoV secara signifikan tetapi perlakuan tersebut tidak dapat menurunkan perkecambahan (Avgelis, 1986). Perlakuan benih dengan trisodium fosfat (TSP) dapat mengurangi virus, akan tetapi tidak dapat menghilangkan virus secara keseluruhan. Menurut pendapat Jarret *et al*. (2008) bahwa perlakuan benih dengan 10% TSP selama 2,5 jam pada suhu ruang dapat menurunkan infektivitas tetapi tidak dapat menghilangkan, dan mengurangi perkecambahan secara signifikan serta tidak dapat meningkatan jumlah bibit yang abnormal. Perlakuan benih yang banyak dianjurkan yaitu dengan perlakuan 10% TSP selama 2,5 jam, meskipun dapat mengakibatkan kerugian perkecambahan (Jarret *et al*., 2008). Walaupun virus tidak dapat dihilangkan pada semua kasus yang terjadi pada setiap tanaman budidaya, pada perlakuan benih jangka pendek sebelum disemai dapat mengurangi kerusakan pada tanaman (Jarret *et al*., 2008).

Untuk meminimalkan penyebaran infeksi secara sekunder pada tanaman yang terinfeksi PMMoV harus dilakukan pencegahan secepat mungkin. Perlakuan pencegahan dengan susu dapat juga dilakukan, protein pada susu yang bertindak sebagai inhibitor infeksi biasanya disemprotkan pada tanaman yang terinfeksi, selain itu cara untuk mengurangi kemungkinan penyebaran secara mekanik adalah dengan cara menghindari tanaman yang terserang virus dengan tanaman yang sehat, hal ini bertujuan agar virus tidak menular (Hare dan Lucas, 1959; Jaeger, 1966).

Sterilisasi uap pada tanah kadang-kadang efisien untuk mengurangi virus, namun hal ini sangatlah sulit, untuk mensterilkan tanah dengan kedalaman yang cukup dalam serta menghilangkan virus yang mungkin ada dalam sisa-sisa tumbuhan. Berdasarkan pendapat dari Toyoda, *et al*., (2004) bahwa perlakuan *Dry Heat Treatment* (DHT) merupakan terobosan teknologi yang sangat efektif, aplikatif, dan ramah lingkungan dengan memberikan cekaman suhu tinggi pada benih sebelum dikecambahkan. DHT bertujuan untuk mengeliminasi penyakit dan menghasilkan benih sehat. Penyakit yang dapat dihilangkan oleh DHT meliputi penyakit yang disebabkan oleh virus, jamur, dan bakteri (Toyoda, *et al*., 2004). Selain itu menurut Lee (2004), ada beberapa keuntungan dari *seed treatment* antara lain mengurangi dan menginaktivasi patogen seperti virus, bakteri, dan jamur, mengontrol dan mencegah menularnya penyakit melalui tanah. Benih aman digunakan dalam produksi benih skala besar, mudah diaplikasikan, serta ideal untuk menyediakan benih sehat dalam pertanian organik karena perlakuan dilakukan tanpa menggunakan bahan kimia.

2. Pencegahan Pengendalian secara Kultur Teknis (Cultural Control)

Cara yang paling efektif untuk mengontrol efek samping penularan dari PMMoV yaitu dengan cara memilih benih bersertifikat yang bebas virus untuk mencegah penyebaran sekunder dari infeksi virus terbawa benih. Praktek-praktek budidaya harus digunakan dengan cara meminimalkan kontak dengan tanaman lain oleh pekerja dan peralatan pertanian harus steril (Lamb *et. al.*, 2001). Di Jepang, mikroba menguntungkan dalam tanah telah terbukti menonaktifkan PMMoV dan menekan infeksi tanah (Ikegashira *et. al*., 2010).

2.3. Benih Bermutu

Benih merupakan biji tanaman yang sengaja diproduksi dengan perlakuan tertentu, untuk memenuhi persyaratan sebagai bahan pertanaman selanjutnya (Suena, *et al.,* 2005). Penerapan perlakuan yang baik diperlukan untuk membuat benih tertentu. Benih bermutu merupakan benih yang berasal dari varietas murni dan memiliki mutu genetis, fisik, fisiologis dan bebas dari hama dan penyakit. Mutu genetis meliputi sifat-sifat yang diwariskan induk. Mutu fisik meliputi ukuran, bentuk, dan berat benih sedangkan mutu fisiologis meliputi daya kecambah, kekuatan tumbuh (*vigor*) benih dan kesehatan benih. (Suena, *et al.,* 2005).

Pengujian daya kecambah dilakukan dengan menghitung presentase kecambah dari seluruh benih yang ditanam dalam satuan hari. Vigor benih diukur dengan variabel kekuatan kecambah dan keseragaman tumbuh setelah diberikan lingkungan yang kurang sesuai, seperti perlakuan pemanasan tingkat tinggi pada benih, cekaman kekeringan mengakibatkan media tidak steril dengan sumber penyakit untuk uji vigor terhadap penyakit yang menyerang. Benih dapat tumbuh secara normal, berarti benih tersebut memiliki vigor ketahanan pada kekeringan dan bebas penyakit (Suena, *et al.*, 2005).

2.4. Perlakuan Benih

Perlakuan benih merupakan bagian dari sistem produksi benih. Setelah benih dipanen dan diproses, benih biasanya diberikan perlakuan *seed treatment* untuk berbagai macam tujuan, Tujuan perlakuan benih adalah yaitu menghilangkan sumber infeksi benih (disinfeksi) untuk melawan patogen tular benih dan hama, Perlindungan terhadap bibit ketika bibit muncul dipermukaan tanah dan meningkatkan perkecambahan atau melindungi benih dari patogen dan hama, perlakuan benih dengan tujuan seperti ini berupa *priming, coating, dan pelleting* (Agustiansyah, 2011).

2.5. Metode Serologi *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Serologi adalah ilmu yang mempelajari prosedur-prosedur diagnostik dan eksperimental yang berhubungan dengan imunologi yang menyangkut reaksi-reaksi serum. Tes serologi juga digunakan untuk identifikasi mikroorganisme-mikroorganisme, dan menunjukan antibodi didalam serum dari hospes pada penyakit-penyakit tertentu dimana penyebab penyakit tidak dapat diisolasi, penemuan spesifik antibodi sangat penting sekali untuk membantu diagnosa.

Salah satu teknik serologi yang bersifat sensitif dibandingkan dua metode serologi yang diuraikan terlebih dahulu dengan *Enzyme Linked Immunisorbent Assay* disingkat ELISA yang telah banyak mengalami perubahan, sejak pertama kali teknik ini dipublikasikan ciri utama teknik ini adalah dipakai indikator enzim untuk reaksi imunologi. ELISA telah berkembang sampai pada tingkatan yang sangat sulit untuk membuat generasi tentang kemampuan kinerja berbagai konfigurasi. Konfigurasi yang paling umum digunakan mengunakan substrat padat (Baron *et al.*, 1994). Antibodi dibiarkan menyerap dalam sumuran cawan mikrotiter. Larutan uji kemudian ditambahkan ke dalam sumuran dan terdapat

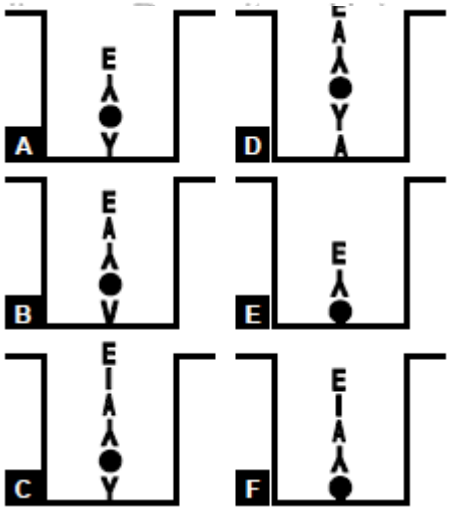
antigen, antigen akan mengikat pada antibodi. Sumuran kemudian dicuci, kemudian ditambahkan antibodi yang dikonjugasikan dengan enzim, sumuran dicuci lagi dan kemudian ditambahkan substrat enzim. Jika terdapat antigen, maka ikatan konjugasi antibodi-enzim mengkatalisasi perubahan substrat kromogenik menjadi produk yang berwarna (Ranson, 2005).

ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay)* merupakan uji serologi yang umum digunakan diberbagai laboratorium *imunologi*. Uji ini memiliki beberapa keunggulan seperti teknik pengerjaan yang relatif sederhana, ekonomis, dan memiliki sensitivitas yang cukup tinggi. ELISA diperkenalkan pada tahun 1971 oleh Peter Perlmann dan Eva Engvall untuk menganalisis adanya interaksi antigen dengan antibodi didalam suatu sampel dengan menggunakan enzim sebagai pelapor. Menurut Djikstra & De Jager (1998) Beberapa keunggulan ELISA sebagai tes serologi untuk virus tumbuhan adalah (a) Antibodi yang digunakan sangat sedikit, (b) Metode ini dapat digunakan untuk deteksi sampel virus skala besar, (c) Uji ini dapat digunakan menggunakan panduan standar yang sudah ditentukan, (d) Hasil deteksi ELISA dapat diukur secara kuantitatif (nilai absorbansi) disamping hasil kualitatif (perubahan warna), (e) Dapat mendeteksi virus pada konsentrasi rendah (1-10 ng/ml).

Umumnya ELISA dibedakan menjadi dua jenis yaitu, standard (*direct*) *double anti body sandwich* (DAS)-ELISA dan indirect ELISA (I-ELISA). Metode DAS-ELISA diperkenalkan pertama kali oleh Clark dan Adams pada tahun 1977 untuk deteksi virus tumbuhan dan uji ini pertama kali dilakukan pada plat 96 sumur berbahan *polystyrene*. Tahapan DAS-ELISA, pertama sumuran plat ditempelkan dengan menggunakan antibodi primer. Setelah plat dicuci, sampel virus dimasukkan ke dalam sumuran. Setelah dicuci kembali dengan *Phosphat Buffer Saline Tween* (PBST), *enzyme konjugat* (antibodi kedua) diisikan ke dalam sumuran. Setelah dicuci kembali, enzyme substrat PNP (P-nitrophenyl phosphate) dimasukkan ke dalam sumuran untuk pewarnaan (Djikstra & De Jager, 1998). Berbeda dengan DAS-ELISA, pada metode I-ELISA sampel virus (antigen) dimasukkan terlebih dahulu, setelah itu baru dimasukkan antibodi primer ke dalam sumuran dan selanjutnya tahapan prosedur sama dengan DAS-ELISA (Djikstra & De Jager, 1998).

Pengamatan hasil ELISA dilakukan secara kuantitatif maupun kualitatif. Hasil ELISA secara kuantitatif dapat diamati dari nilai *Optical Density* (OD) yang diukur dengan menggunakan ELISA *reader* (Miller, 2006). Hasil kuantitatif adalah

data ELISA dapat diinterpretasikan dalam perbandingan dengan kurva standar (purifikasi antigen) agar dapat secara tepat digunakan untuk menghitung konsentrasi antigen dalam berbagai sampel (Sylvest, 2010). Hasil ELISA secara kualitatif dapat diamati dengan adanya perubahan warna menjadi kuning pada reaksi pengujian jika sampel yang diuji mengandung virus. Semakin tinggi intensitas warna yang terbentuk, maka semakin tinggi pula konsentrasi virus pada sampel tersebut (Miller, 2006).



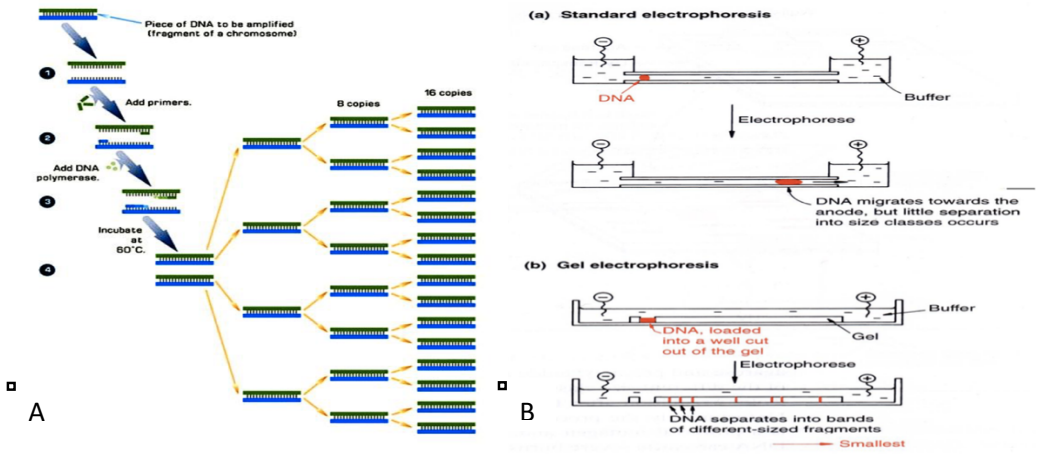
Gambar 3. Diagram varian teknik ELISA (a) = DAS-ELISA langsung, (b) = F(ab')2 ELISA tidak langsung, (c) = DAS-ELISA tidak langsung, (d) = DAS-ELISA dengan konjugat Protein A yang dilekatkan pada lubang cawan ELISA, (e) = ELISA langsung dengan Ag virus dilekatkan pada lubang cawan, (f) = ELISA tidak langsung dengan Ag dilekatkan pada lubang cawan. Y = Ab virus, V = F(ab')2 virus, YE =konjugat Ab virus-enzim, ● = Ag (virus), A = protein A, AE = konjugat Protein A-enzim, A-E = konjugat Ig hewan pertama-enzim (Converse dan Martin, 1990).

Reagen lain yang diperlukan dalam ELISA adalah *buffer, blocking reagent,* dan pelarut substrat. Bufer dasar yang paling sering digunakan dalam ELISA adalah bufer fosfat (*Phosphate-Buffered Saline*, PBS) dan bufer karbonat. Bufer lain, seperti bufer ekstraksi, bufer pencuci, bufer Ab, bufer konjugat, dan bufer substrat dibuat dengan menambahkan senyawa kimia tertentu seperti *Tween*-20, *polyvinylpirrolidone* (PVP), dan 2-*mercaptoethanol* pada bufer dasar. Senyawa yang sering digunakan untuk *blocking reagent* adalah *bovine serum albumin* (BSA), *ovalbumin* (OA), *gelatin,* susu skim, NaOH, dan asam sulfat (H_2SO4) (Lazarovits, 1990).

2.6. Metode *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT- PCR)

Kemajuan dibidang biologi molekuler telah menghadirkan beberapa teknik yang dapat digunakan untuk deteksi dan identifikasi virus, salah satunya adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Teknik ini sangat sensitif dan spesifik untuk deteksi dan identifikasi patogen-patogen tanaman. Teknik PCR juga dapat digunakan untuk mengetahui mengenai komposisi populasi patogen dan diversitas genetik virus (Rojas *et al*., 1993). Reaksi berantai *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan teknik identifikasi yang dilakukan berdasarkan amplifikasi DNA patogen secara in vitro dengan menggunakan primer tertentu. Primer merupakan oligonukleotida yang berperan sebagai inisiasi amplifikasi molekuler DNA. Pemilihan primer merupakan faktor terpenting dalam menentukan hasil deteksi molekuler berbasis PCR (Aris et al.,2013).

Amplifikasi DNA pada PCR dapat dicapai bila menggunakan primer oligonukleotida yang disebut *amplimers*. Primer DNA suatu sekuens oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA. PCR memungkinkan dilakukannya pelipat gandaan suatu fragmen DNA. Umumnya primer yang digunakan pada PCR terdiri dari 20-30 nukleotida. DNA template (cetakan) yaitu fragmen DNA yang akan dilipat gandakan dan berasal dari patogen yang terdapat dalam spesimen klinik. Enzim DNA polimerase merupakan enzim termostabil dari bakteri termofilik *Thermus aquaticus.* Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) menempel pada ujung 3' primer ketika proses pemanjangan dan ion magnesium menstimulasi aktivasi polymerase (Zuhriana K, 2010).



Gambar 4. Siklus PCR (A. 1. Denaturasi pada suhu 90^0 C-95^0 C; 2. Annealing pada suhu 37^0 C - 65^0 C; 3. Extention pada suhu 72^0 C; 4. Siklus pertama selesai. B. Metode elektroforesis) (Zuhriana K, 2010)

Ada tiga tahapan penting dalam proses PCR yang selalu terulang dalam 30-40 siklus dan berlangsung dengan cepat: (1) Denaturasi adalah proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal, Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk DNA untai ganda lagi) secara cepat, dan ini mengakibatkan gagalnya proses PCR.

Adapun waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktifitas enzim Taq polymerase. (2) Annealing (penempelan primer). (3) Pemanjangan primer (Extention), Selain itu kelebihan lain metode PCR dapat diperoleh pelipat gandaan suatu fragmen DNA (110 bp, 5x10-9 mol) sebesar 200.000 kali setelah dilakukan 20 siklus reaksi selama 220 menit.

Reaksi ini dilakukan dengan menggunakan komponen dalam jumlah sangat sedikit, DNA cetakan yang diperlukan hanya sekitar 5 ug oligonukleotida yang diperlukan hanya sekitar 1 mM dari reaski ini biasa dilakukan dalam volume 50-100 ul. DNA cetakan yang digunakan juga tidak perlu dimurnikan terlebih dahulu sehingga metode PCR dapat digunakan untuk melipat gandakan suatu sekuen DNA dalam genom bakteri hanya dengan mencampukan kultur bakteri di dalam tabung PCR. Teknik PCR dapat dimodifikasi dalam beberapa jenis 1. *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), 2. Inverse PCR, 3. Nested-PCR, 4. Quantitative-PCR, 5. *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), 6. *Reverse Transciptase* (RT-PCR) (Zuhriana K, 2010).

Reverse Transcriptase (RT-PCR) metode ini digunakan untuk amplifikasi, isolasi atau identifikasi sekuen dari sel atau jaringan RNA virus atau viroid yang konsentrasinya sangat sedikit dalam tumbuhan, tekniknya disebut RT- PCR karena RNA akan di transkripsi balik (*reverse transcription)* menjadi DNA (Wahyuni S, 2005).

Reverse transciptase adalah enzim yang dihasilkan oleh semua retrovirus untuk mentranskrip informasi genetik virus dari RNA menjadi DNA sehingga dapat berinteraksi ke dalam gen host. Dalam penelitihan ini *reverse transciptase* menyebabkan data yang dikode pada rantai RNA dapat diubah menjadi bentuk DNA, sebab PCR tidak dapat mereplikasi molekul RNA secara langsung (Sudjadi, 2008).

3. METODE PENELITIAN

3.1. Kerangka Operasional Penelitian

Kerangka operasional menunjukkan langkah-langkah teknis yang digunakan sehingga penelitian telah dapat dilakukan secara bertahap dan sistematis.

- Pengumpulan benih paprika dari tanaman yang bergejala virus PMMoV (*Pepper Mild Mottle Virus*)

↓

Benih
100 biji

↓

- Deteksi virus menggunakan metode *Double anti body sandwich- Enzyme linked immunosorbent assay* (DAS- ELISA)

↓

- Varietas yang terdeteksi positif virus PMMoV maka dilakukan perlakuan eleminasi 100 biji (4 ulangan)

↓

- Macam Perlakuan :

1. Kontrol (Tanpa perlakuan benih positif virus PMMoV)
2. *Dry Heat Treatment* 50^0 C selama 48 Jam
3. Perendaman dengan ekstrak minyak daun cengkeh 4% selama 20 menit
4. Perendaman dengan ekstrak minyak bunga cengkeh 4% selama 20 menit
5. Perendaman dengan *Trisodium phosphate* (TSP) 9.6 % selama 2 jam
6. Perendaman dengan Asam klorida (HCL) 0.25 N selama 30 menit

↓

- Deteksi virus menggunakan metode DAS- ELISA

↓

- Uji GOT (*growing on test*)
  1. Uji daya kecambah
  2. Uji kecepatan tumbuh

- Uji gejala penyakit (*green house*) → Deteksi virus menggunakan RT- PCR

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

3.2. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Proteksi Tanaman, Laboratorium Molekuler Departemen Bioteknologi PT. BISI Internasional, Tbk dan *green house* di Dusun Jungo, Desa Bumiaji, Kota Batu. Dengan ketingian 1.229 Mdpl dengan suhu rata-rata ±23-29° C dimulai dari Desember 2016 sampai dengan Mei 2017.

3.3. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan selama penelitian ini yaitu cawan petri, termometer, *stopwatch*, oven, baki perkecambahan, pinset, pengaris, kamera, tisu, kapas, mikro pipet, gelas ukur, masker, botol semprot, kertas label, spidol, mortar, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) *reader*, timbangan analitik, plastik penggerus, botol *sprayer*, ELISA *washer*, plate ELISA, *multichanel mikropipet*, mikrotip, Pistil, pNPP, *laminar flow cabinet*, refrigator bersuhu 4^0C, inkubator bersuhu 37°C, mesin *Thermal Cycler*, *microcentrifuge*, vortex, *ice box*, *micropippete eppendorf*, *polymerase chain reaction* (PCR) tube 0,1 atau 0,2 ml, microtube 1,5 ml, *white tip*, *yellow tip, blue tip,* PCR cooler, *shaker waterbath* GFL 1086, *gel logic 200 imaging system* (GEL DOC), *shaker* GFL 3019, *ultra low freezer*.

Bahan yang digunakan yaitu benih paprika (*C. annum.* L. var *grossum*) berasal dari tanaman bergejala virus di lahan produksi PT. BISI Internasional, Tbk berada di Desa Pujon, Kabupaten Malang, Jawa Timur. Larutan *Trisodium phosphate* (Na_3PO_4), larutan *Asam klorida* (HCL), ekstrak minyak daun cengkeh, ekstrak minyak bunga cengkeh, tween 20, tanah steril, sekam steril, dan AB Mix. Bahan yang digunakan untuk deteksi pathogen yaitu *Pepper Mild Mottle Virus* (PMMoV) Reagent Set DAS ELISA Alkaline phospatase label catalog number SRA 37501 (Agdia), Primer spesifik *Forward* 5'-CCA ATG GCT GAC AGA TTA CG -3' dan *Reverse* 5'- CAA CGA CAA CCC TTC GAT TT – 3' PMMoV (Integrated DNA Technologies), Alkohol 70%, buffer fostat 0,01 Mph 7, aquades steril, kasa steril, TRIzol® (Invitrogen cat #15596-026), Beta merchaptoethanol, *Nuclease free water*/DEPC-treated water, cloroform, isopropanol, 70% ethanol, buffer PCR, dNTPmix, $MgCl_2$, enzim Taq polymerase, ddH2O, template RNA, nitrogen cair, revertAid H minus first strand DNA synthesis kit catalog number K1631 (*Thermo Scienctific*), RNA Shield.

3.4. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan yaitu menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan sebagai berikut:

1. P0 = Kontrol tanpa perlakuan dan benih positif virus PMMoV
2. P1 = *Dry heat treatment* 50^0C selama 48 jam.
3. P2 = Perendaman dengan ekstrak minyak bunga cengkeh 4% selama 20 menit.
4. P3 = Perendaman dengan ekstrak minyak daun cengkeh 4% selama 20 menit.
5. P4 = Perendaman dengan *Trisodium phosphate* (TSP) 9,6 % selama 2 jam.
6. P5 = Perendaman dengan Larutan *Asam klorida* (HCL) 0,25 N selama 30 menit.

Keterangan: * Tabel pengacakan disajikan pada lampiran 1.
* Penggunaan perlakuan (P1) *Dry heat treatment* 50^0C selama 4 jam berdasarkan uji pendahuluan disajikan pada lampiran 2.

3.5. Persiapan penelitian

3.5.1. Persiapan Benih

Benih cabai paprika diambil dari tanaman yang bergejala virus dari lahan produksi PT. BISI Internasional, Tbk di Desa Pujon, Kabupaten Malang, Jawa Timur.

3.5.2. Persiapan Media Semai

Media semai yang digunakan terdiri dari tanah steril dan sekam steril dengan perbandingan 1:2. Sterilisasi tanah dan cocopeat dengan cara memasukkan pada *autoclave* dengan suhu ±95-100^0 C selama 4 jam.

3.5.3. Persiapan Media Tanam

Media yang digunakan yaitu sekam goreng steril untuk media tanam. Cara sterilisasi media yaitu dengan memasukkan pada *autoclave* dengan suhu ± 95-100^0 C dengan tujuan untuk membersikan dari mikroorganisme yang dapat merugikan tanaman. Media yang telah di sterilkan di biarkan agar dingin, kemudian dimasukkan pada wadah *Polybag* berukuran 25/ 12,5 x 20 cm. Pemilihan media tanam ini mempertimbangkan sifat fisik media agar cukup subur, dan memiliki aerasi yang cukup baik.

3.5.4. Preparasi Buffer pada Uji Serologi Elisa untuk Deteksi *Pepper Mild Mottle Virus* (PMMoV)

1. Larutan PBST (Phosphate Buffer Saline Tween)

Bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan 1.000 ml larutan PBST yaitu *sodium chloride* (NaCl) 8,0 gram, *sodium phosphate* 1,15 gram, *potasium phosphate* 0,2 gram, *potasium chloride* 0,2 gram, *tween 20* 0,5 ml (500 µl).

Semua bahan dicampur sampai larut dengan H_2O kedalam tabung erlenmenyer kemudian pada pH 7,4 lalu ditambahkan H_2O sampai volume 1 liter. Setelah itu larutan disimpan pada suhu ruangan.

2. Substrat (PNP Buffer)

Bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan 800 ml larutan substrat yaitu *Magnesium chloride hexahydrate* (MgCl) 0,1 gram, *sodium azide* 0,2 gram, *diethanolamine* 97,0 ml. Semua bahan dicampur sampai larut dengan H_2O kedalam tabung erlenmenyer. Pada pH 9,8 lalu ditambahkan H_2O sampai volume 250 ml kemudian larutan disimpan pada suhu 4°C pada botol gelap.

3. Coating buffer

Bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan 1000 ml coating buffer yaitu *sodium carbonate* (anhydrous) 1,59 gram, *sodium bicarbonate* 2,93 gram, *sodium azide* 0,2 gram. Semua bahan dicampur sampai larut dengan H_2O kedalam tabung erlenmenyer. Pada pH 9,6 lalu ditambahkan H_2O sampai volume 1.000 ml kemudian larutan disimpan pada suhu 4°C.

4. General extract buffer 3 (GEB 3)

Bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan 1.000 ml larutan GEB 3 digunakan yaitu air steril sebanyak 1.000 ml ditambahkan buffer powder sebanyak 48 gram dan *tween 20* sebanyak 20 ml/ 20gr. Kemudian di gojlok (stirrer) selama 30 menit.

5. Coating Antibodi PMMOV

Bahan-bahan yang digunakan pembuatan coating antibodi yaitu dengan mencampurkan antibodi dengan coating buffer dengan perbandingan 1:400. Masing-masing sumuran pada plate diisi 100 µl. Keperluan coating antibody yaitu sebanyak 4.5 µl dan coating buffer 1x sejumlah 1.795 µl sehingga volume total yaitu 1.800 µl sesuai dengan jumlah sampel yang dianalisis.

6. Conyugate Buffer PMMOV

Bahan-bahan yang digunakan pembuatan conyugate buffer yaitu dengan mencampurkan enzyme conyugate dengan eci buffer (*Enzyme Conyugate Diluent*) dengan perbandingan 1:400. Masing-masing sumuran pada plater diisi 100 µl. Keperluan konjugate yaitu sebanyak 4,5 µl dan eci buffer (*Enzyme Konyugate Diluent*) sejumlah 1.795 µl sehingga volume total yaitu 1.800 µl sesuai dengan jumlah sampel yang dianalisis.

3.5.5. Preparasi Ekstraksi RNA virus PMMoV dengan TRIzol® pada metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

1. DEPC water

Bahan-bahan yang digunakan untuk DEPC yaitu dengan menambahkan 0,1 *Diethylpyrocarbonate* (DEPC) kedalam air steril, lalu dimasukkan kedalam botol reaksi dan diaduk agar homogen, setelah itu di inkubasi selama 24 jam dibawah lemari asam. Kemudian simpan DEPC pada suhu kamar selama beberapa minggu.

2. Persiapan peralatan untuk ekstraksi RNA

Semua peralatan yang digunakan diperlakukan dengan 0,1% air DEPC dan di autoklaf selama 24 jam, termasuk semua tabung microcentrifuge 1,5 ml dan tips yang digunakan dengan RNAse (RNAse-free).

3. Isolasi RNA

Jaringan tanaman diambil dari daun paprika yang menunjukkan gejala virus seberat 50-100 mg, sampel di homogenkan dengan nitrogen cair hingga menjadi serbuk menggunakan mortar dan pestle yang sebelumnya telah didinginkan. Serbuk jaringan dipindahkan kedalam tube berukuran 2 ml yang sebelumnya tube telah ditambahkan dengan 1.000 µl TRIzol® dan 2% beta mercaprothanol (BME), semua sampel jaringan tanaman dicampurkan lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit untuk memastikan terpisahnya komplek nucleoprotein.

Setelah komplek nucleoprotein terpisah kemudian ditambahkan 200 µl Chloroform/ml dari TRIzol® lalu dihomogenkan sampel dengan tangan ±15 menit dengan cara dibolak-balik. Setelah itu disentrifuse sampel pada kecepatan 13.000 rpm 4^0C selama 15 menit bertujuan untuk memisahkan jaringan tanaman.

Setelah disentrifuse dipindahkan lapisan atas (±40 µl) ke dalam tube 1,5 ml baru serta ditambahkan 500 µl isopropanol kedalam tube di bolak-balik lalu di inkubasi pada suhu ruang ±10 menit. Setelah sampel diinkubasi di sentrifus pada kecepatan 13.000 rpm 4^0C selama 15 menit (RNA tampak memiliki pellet seperti gel pada bagian bawah tube).

Dibuang supernatant secara pelan-pelan dan dicuci pellet RNA dengan menambahkan 1 ml 75% ethanol/ml dari TRIzol®, spin sampel pada kecepatan 13.000 rpm 4^0 C selama 5 menit, setelah itu ethanol dibuang dan pencucian diulang selama 2 kali dan dikeringkan RNA selama 15-20 menit pada suhu ruang sampai dirasa kering dan ditambahkan RNAse free water (30-50 µl) kedalam

tube kemudian di simpan pada suhu 80^0 C.

4. Preparasi Elektroforesis Gel Agarose

Bahan- bahan yang dibutuhkan untuk tes elektroforesis gel agarose yaitu sebanyak 200 ml, sejumlah 1,6 gram top vision agarose ditambahkan ke dalam labu erlenmeyer dan ditambahkan larutan *Trisborat EDTA* (TBE) hingga mencapai volume akhir 200 ml.

Setelah komponen dicampurkan kemudian di homogenkan hingga merata dengan stirrer, penggunaan stirrer untuk mempermudah homogenisasi. setelah larutan homogen kemudian dipanaskan ke dalam microwave sampai mendidih ± selama 5 menit. Apabila larutan sudah mendidih kemudian didinginkan agarose sampai dengan suhu ± 60^0 C serta ditambahkan 2 µl *Ethidium bromide* dan aduk hingga merata.

5. Komposisi Larutan PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Tabel 1. Komponen campuran PCR (RT-PCR two step)

Step 1 (Reverse Transciptase) 1X	Volume	Step 2 PCR	Volume
a) Oligo (dT) primer	1 µl	a) 10 Taq buffer	2 µl
b) Nuclease free water	9 µl	b) Mgcl2	0,3 µl
c) 5 x reaction buffer	4 µl	c) dNTP mix	0,4 µl
d) 10 mM dNTP mix	2 µl	d) PMMoV F	1 µl
e) Revertaid H Minus M-Mulv reverse transciptase	1 µl	e) PMMoV R	1 µl
f) Template RNA	2 µl	f) Taq Polymerase	0,2 µl
g) Ribolock RNA- se	1 µl	g) ddH20	13,1 µl
		h) cDNA	2 µl
Volume akhir	20 µl		20 µl

Campuran komponen dimasukkan dalam tabung berukuran 0,5 ml, tabung digoyang-goyang supaya larutan homogen. Amplifikasi dilakukan pada step 1. Suhu 94° C selama 4 menit, kemudian dilanjutkan dengan 35 siklus yang melalui 3 tahapan, yaitu pemisahan (*Denaturation*) pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan (*Annealing*) pada suhu 54°C selama 1 menit dan sintesis

(*Extention*) pada suhu 72°C selama 7 menit, kemudian siklus berakhir dengan suhu 4°C. Sedangkan amplifikasi pada step 2. Suhu 94° C selama 4 menit, kemudian dilanjutkan dengan 35 siklus yang melalui 3 tahapan, yaitu pemisahan (*Denaturation*) pada suhu 94°C selama 15 detik, penempelan (*Annealing*) pada suhu 54°C selama 40 detik dan sintesis (*Extention*) pada suhu 72°C selama 1 menit, kemudian siklus berakhir dengan suhu 4° C.

3.6. Pelaksanaan Penelitian

3.6.1. Deteksi virus PMMoV

1. **Deteksi virus mengunakan DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich Enzyme-linked immunosorbent assay*)**

   Deteksi awal dilakukan untuk mengetahui apakah benih cabai paprika mengandung virus PMMoV (*Pepper Mild Mottle Virus*), deteksi dilakukan dengan dua cara, yang pertama yaitu dengan cara melakukan deteksi langsung pada benih paprika yang sebelumnya dilakukan uji homogenitas untuk memastikan bahwa benih homogen dan yang kedua yaitu dengan cara melakukan deteksi pada daun tanaman paprika yang telah ditumbuhkan. Apabila benih terdeteksi mengandung virus target selanjutnya akan dilakukan perlakuan yang bertujuan untuk mengeleminasi virus tersebut. Setelah dilakukan perlakuan dilakukan deteksi virus pada benih dan bibit untuk mengetahui efektivitas perlakuan untuk mengeleminasi virus.

2. **Deteksi virus mengunakan metode RT- PCR (*Reverse Transciptase Polymerase Chain Reaction)***

   Deteksi virus secara molekuler menggunakan metode RT-PCR menggunakan primer spesifik *Forward* 5'- CCA ATG GCT GAC AGA TTA CG -3' dan *Reverse* 5'- CAA CGA CAA CCC TTC GAT TT-3' untuk mengetahui apakah tanaman cabai paprika mengandung virus PMMoV yang akan menghasilkan pita *Ribonucleid Acid* (RNA) dengan ukuran 730 bp (Nindi Rialch *et al*., 2015). RNA diisolasi dari 100 mg daun tanaman dengan metode TRIzol® sesuai SOP (*Standart Operating Procedure*).

   Visualisasi mengunakan gel electrophoresis agar 2%. Setelah mendapatkan RNA selanjutnya dilakukan *reverse transciptase* untuk mengubah hasil RNA menjadi *Complementary DNA* (cDNA) proses ini dilakukan karena *Polymerase Chain Reaction* (PCR) tidak dapat mengekspresikan RNA secara langsung. cDNA hasil yang diperoleh selanjutnya dilakukan untuk proses PCR.

3.6.2. Perlakuan Benih

Perlakuan benih yang dilakukan ada tiga cara, pertama secara kimia dengan larutan kimia *trisodium phosphate* (TSP) 9,6% selama 2 jam, *asam klorida* (HCL) 0.25 N selama 30 menit dengan metode perendaman (*seed priming)*, setelah benih di perlakukan lalu di cuci dengan air mengalir sampai bersih dan di keringkan pada suhu ruang ± 37^0 C selama 24 jam. Perlakuan kedua yaitu secara fisik menggunakan teknik *Dry Heat Treatment* (DHT) 50^0 C selama 48 jam menggunakan oven, setelah benih di perlakukan lalu benih di diamkan pada suhu ruang ± 37^0 C selama 24 jam.

Perlakuan ketiga yaitu secara senyawa nabati dengan menggunakan ekstrak minyak daun cengkeh 4% selama 20 menit dan ekstrak minyak bunga cengkeh 4% selama 20 menit, dengan metode perendaman (*seed priming*), setelah benih di perlakukan lalu di cuci dengan air mengalir sampai bersih dan di keringkan di suhu ruang ± 37^0 C selama 24 jam.

3.6.3. Pengujian Growing On Test (GOT)

Pengujian GOT dilakukan dengan menanam benih kedalam media semai pada bak perkecambahan dengan tujuan untuk melihat kemampuan daya berkecambah setelah dilakukan perlakuan pada benih. Pada setiap perlakuan ditanam 100 benih dengan jumlah ulangan empat kali setiap lubang tanam di masukkan 1 benih sehingga terdapat 100 lubang tanam pada bak perkecambahan.

Media semai yang digunakan terdiri dari tanah steril dan sekam steril dengan perbandingan 1:2, Sterilisasi tanah dan cocopeat dengan cara memasukkan pada *autoclave* dengan suhu ±95-100^0 C selama 4 jam.

3.6.4. Pengujian Gejala Tanaman

Pengujian gejala tanaman dilakukan dengan mengambil 20 tanaman secara sistematis pada setiap perlakuan dan diulang sebanyak empat kali, tujuan pengujian gejala tanaman untuk mengamati gejala pada tanaman yang berasal dari benih yang positif *Pepper Mild Mottle Virus* (PMMoV).

Pada masing- masing tanaman di masukkan pada wadah *Polybag* berukuran 25/12,5 x 20 cm dan diamati insiden penyakit dengan tujuan untuk melihat setelah dilakukan perlakuan apakah ada gejala yang muncul pada setiap perlakuan.

3.6.5. Pemeliharaan Tanaman Cabai Paprika

Pemeliharaan tanaman uji meliputi penyiraman, pemberian hari panjang atau penyinaran, penyiangan gulma, dan pengendalian hama dan penyakit tanaman. Penyiraman tanaman dilakukan menggunakan irigasi tetes selama 3 kali dalam satu hari selama 15 menit, pada masing- masing polybag memperoleh penyiraman ± 350 cc air pada setiap penyiraman.

Pemberian pupuk dilakukan dengan mencampurkan pupuk A dan B masing-masing sebanyak 1 liter dan dicampurkan kedalam 200 liter air, jumlah konsentrasi dosis antara 20- 30 EC.

Sanitasi gulma dilakukan secara manual dengan melakukan pencabutan jika terdapat gulma yang dapat menggangu pertumbuhan tanaman, selain itu tujuan dari sanitasi untuk menghindari terjadinya kompetisi tanaman dalam menyerap unsur hara. Pengendalian OPT (Organisme penggangu tanaman) dilakukan secara manual dengan mengambilnya akan tetapi apabila populasi nya dapat menggangu tanaman uji maka dilakukan dengan pestisida kimia kontak dengan dosis yang tertera.

3.6.6. Variabel Pengamatan

1. **Uji Serologi DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich Enzyme-linked immunosorbent assay)***

Uji serologi dengan ELISA, dilakukan 2 kali yaitu pada awal bertujuan untuk mendeteksi patogen virus dan akhir untuk mengetahui hasil setelah dilakukan eleminasi dengan perlakuan yang telah ditentukan pada benih setelah dilakukan treatment apakah mengandung patogen spesifik virus PMMoV (*Pepper Mild Mottle Virus*), uji efektifitas perlakuan dinilai berdasarkan hasil pengujian ELISA, hasil uji ditentukan secara kualitatif yaitu dengan reaksi perubahan warna pada sumur plate mikrotiter dan secara kualitatif yaitu dengan pengukuran nilai absorbansi.

Sampel uji dikatakan positif mengandung patogen target (virus) apabila terjadi perubahan warna menjadi kuning pada sumur plate mikrotiter dan nilai absorbansi lebih dari dua kali nilai absorbansi kontrol negatif. Hasil perlakuan pada treatment benih dikatakan efektif apabila hasil uji ELISA negatif terhadap patogen spesifik (Virus) dengan ditandai tidak terjadi reaksi perubahan warna pada sumur plate mikrotiter (Berwarna bening).

2. *Uji Growing On Test* (GOT)

Uji Growing On Test dilakukan untuk mengetahui kualitas fisiologis benih cabai paprika setelah dilakukan perlakuan, Parameter yang diamati meliputi Presentase indeks vigor dan Presentase daya berkecambah benih.

1. Daya Kecambah (%)

Presentase perkecambahan dihitung dengan menggunakan satuan persen berdasarkan rumus sebagai berikut:

$$\text{Presentase perkecambahan} = \frac{\text{n}}{\text{N}} \times 100\%$$

Keterangan :
n : Jumlah benih yang berkecambah
N : Jumlah benih yang diuji

(Sutopo, 2002)

Pengamatan dilakukan pada hari ke 14 dengan cara menghitung seluruh benih yang berkecambah normal pada hari tersebut.

2. Vigor (%)

$$\frac{Total\ kecambah\ normal}{jumlah\ benih\ yang\ ditanam}\ x\ 100\%$$

Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung benih yang berkecambah normal yang diamati setiap hari sampai hari ke 7 dengan tujuan agar mengerti nilai vigor benih pada masing-masing perlakuan.

3. Uji Gejala Tanaman

1. Masa Inkubasi

Pengamatan masa inkubasi untuk mengetahui perbedaan respon antar perlakuan benih yang ditanam pada media tanam sehingga menunjukkan gejala pertama kali muncul dalam satuan hari pada tanaman uji pada masa inkubasi. Kenampakan gejala yang diamati meliputi perubahan bentuk dan warna daun.

2. Kejadian Penyakit (%)

Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung *Disease Incidence* (DI) (proporsi tanaman yang terserang penyakit dalam suatu populasi) pada tanaman berdasarkan presentase jumlah tanaman yang sakit dari total yang diamati, Pengamatan dilakukan pada 7, 14 HST :

$$DI = \frac{n}{N} \times 100\%$$

Keterangan:

DI = *Disease incidence*

n = Jumlah tanaman sakit (Menunjukkan gejala)

N = Jumlah tanaman yang diamati

(Suranto, 2014)

3.7. Analisis Data

Analisis sidik ragam atau A*nalysis of Variance* (ANOVA) pada data hasil penelitian dengan mengunakan uji F aplikasi yang digunakan adalah perangkat lunak excel dan DSAASTAT. Masing-masing F hitung dibandingkan dengan F tabel pada level nyata 5%. Apabila F hitung <F table 5% berarti perlakuan tersebut tidak berpengaruh nyata terhadap variabel yang diamati. Jika F hitung >F table 5% berarti perlakuan berpengaruh nyata terhadap variabel yang diamati. Apabila data yang dianalisis berbeda nyata, maka akan diuji lanjut mengunakan uji lanjut Beda Nyata Terkecil (BNT) taraf kesalahan 5%.

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

4.1.1. Deteksi PMMoV (*Pepper Mild Mottle Virus*) pada benih paprika menggunakan DAS- ELISA (*Double Anti body Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) sebelum perlakuan benih.

Penentuan benih cabai paprika positif PMMoV (*Pepper Mild Mootle Virus*) dilakukan dengan cara mengambil benih dari tanaman bergejala virus dan dikonfirmasi menggunakan uji serologi DAS-ELISA (*Double Anti body Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) dengan *antibody* monoklonal PMMoV . Berdasarkan uji serologi, benih paprika yang dilaporkan positif mengandung virus yaitu pada benih SP Maxima dan SP Champion sedangkan pada SP Goldy dilaporkan negatif mengandung virus. Hasil uji Elisa pada benih sebelum perlakuan disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji ELISA pada benih sebelum perlakuan

No	Varietas	Rata- rata Nilai Absorbansi Elisa- reader pada									Keterangan
		15 menit			30 menit			45 menit			
		U1	U2	Rerata	U1	U2	Rerata	U1	U2	Rerata	
1	SP Maxima	0.713	0.743	0.727	1.593	1.721	1.657	2.486	2.750	2.618	Positif
2	SP Champion	0.138	0.168	0.153	0.177	0.204	0.191	0.219	0.225	0.222	Positif
3	SP Goldy	0.085	0.088	0.087	0.110	0.118	0.114	0.138	0.151	0.145	Negatif
4	Kontrol Negatif	0.084	0.080	0.082	0.093	0.088	0.090	0.107	0.100	0.103	Berfungsi
5	Kontrol Positif	0.089	0.082	0.085	1.684	1.446	1.565	2.708	2.150	2.429	Berfungsi
6	Buffer	0.784	0.720	0.752	0.105	0.093	0.099	0.123	0.107	0.115	Berfungsi

Berdasarkan hasil pengamatan dari nilai absorbansi menggunakan *Elisa Reader,* diperoleh hasil bahwa pada benih SP Maxima memiliki nilai absorbansi tertinggi. Pada menit ke 15 rerata nilai absorbansi SP Maxima yaitu 0.727, kemudian pada menit ke 30 rerata nilai absorbansi yaitu 1.657, dan pada menit 45 rerata nilai absorbansi yaitu 2.618, dibandingkan dengan benih SP Champion nilai absorbansi nya lebih rendah. Pada menit ke 15 rerata nilai absorbansi SP Champion yaitu 0.153, kemudian pada menit ke 30 rerata nilai absorbansi yaitu 0.191, dan pada menit 45 rerata nilai absorbansi yaitu 0.222.

Berdasarkan hasil tersebut perlakuan eliminasi virus pada benih menggunakan varietas SP Maxima karena pada benih tersebut memiliki nilai absorbansi virus tertinggi dibandingkan dengan varietas SP Champion.

4.1.2. Efektivitas eliminasi fisik, kimia, dan senyawa nabati untuk pengendalian penyakit pada benih paprika (C. *annum*. L. *var. grossum*).

Berdasarkan hasil uji serologi, perlakuan yang efektif untuk mengeleminasi PMMoV (*Pepper Mild Mootle Virus*) pada benih yaitu perlakuan perendaman menggunakan ekstrak daun cengkeh dengan konsentrasi 4% selama 20 menit dan perendaman menggunakan larutan TSP (*Trisodium phosphate*) dengan konsentrasi 9,6 % selama 2 jam. Hasil uji ELISA setelah perlakuan eliminasi PMMoV pada benih cabai paprika disajikan pada Tabel 3.

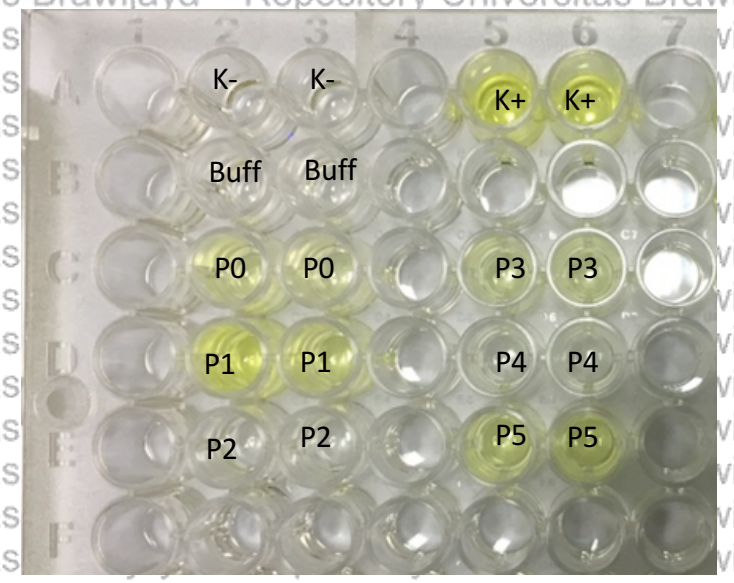
Tabel 3. Hasil uji ELISA setelah perlakuan eliminasi PMMoV pada benih cabai paprika varietas SP Maxima.

No	Perlakuan	Rata- rata Nilai Absorbansi Elisa- reader pada						Keterangan
		15 menit		30 menit		45 menit		
		U1	U2	U1	U2	U1	U2	
1	Kontrol tanpa perlakuan	0.152	0.144	0.278	0.188	0.410	0.273	Positif
2	*Dry heat treatment* 50^0C selama 48 jam	0.443	0.188	1.011	0.384	1.528	0.558	Positif
3	Ekstrak minyak daun cengkeh 4% selama 20 menit	0.081	0.089	0.097	0.099	0.096	0.101	Negatif
4	Ekstrak minyak bunga cengkeh 4% selama 20 menit	0.134	0.145	0.247	0.252	0.337	0.341	Positif
5	*Trisodium Phosphate* (TSP) 9.6 % selama 2 jam	0.091	0.096	0.104	0.113	0.117	0.129	Negatif
6	Asam Klorida (HCL) 0,25 N selama 30 menit	0.203	0.209	0.369	0.444	0.555	0.633	Positif
7	Kontrol -	0.071	0.076	0.074	0.080	0.078	0.084	Berfungsi
8	Kontrol +	0.756	0.488	1.584	1.010	2.359	1.566	Berfungsi
9	Buffer	0.076	0.079	0.082	0.081	0.087	0.086	Berfungsi

Keterangan: Diukur menggunakan ELISA reader 405 nm, ambang batas untuk reaksi negatif pada plate <2x kontrol negatif. Negatif (-) tidak mengandung PMMoV dan Positif (+) mengandung PMMoV.

Berdasarkan hasil pengamatan dari nilai absorbansi menggunakan *Elisa Reader,* diperoleh hasil pada menit ke 15 rerata nilai absorbansi perlakuan perendaman dengan ekstrak minyak daun cengkeh 4% selama 20 menit yaitu 0.085, kemudian pada menit ke 30 rerata nilai absorbansi yaitu 0.099, dan pada menit ke 45 rerata nilai absorbansi yaitu 0.098. Selain itu, rerata nilai absorbansi perlakuan perendaman dengan TSP 9.6 % selama 2 jam pada menit 15 yaitu

0.0935, kemudian pada menit ke 30 rerata nilai absorbansi yaitu 0.108 dan pada menit ke 45 yaitu 0.123. Kedua perlakuan tersebut efektif untuk mengeleminasi PMMoV (*Pepper Mild Mootle Virus*) pada benih dikarenakan nilai absorbansi lebih kecil dibandingkan dengan nilai 2 kali kontrol negatif yaitu sebesar 0,162. Berikut adalah hasil plate uji serologi ELISA PMMoV pada benih cabai paprika disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Plate uji serologi ELISA, eliminasi PMMoV pada benih cabai paprika varietas SP Maxima.

Keterangan: (P0) Kontrol tanpa perlakuan, (P1) *Dry heat treatment* 50^0 C selama 48 jam, (P2) Perendaman dengan ekstrak minyak daun cengkeh 4% selama 20 menit, (P3) Perendaman dengan ekstrak minyak bunga cengkeh 4% selama 20 menit, (P4) Perendaman dengan TSP 9.6 % selama 2 jam, (P5) Perendaman dengan larutan HCL 0,25 N selama 30 menit.

Menurut pendapat Nurjannah (2004), kandungan utama dari minyak cengkeh yaitu eugenol, eugenol asetat dan caryophyllen, sehingga kandungan tersebut diduga dapat merusak susunan protein atau RNA (*Ribonucleic acid*) virus pada benih. Hal ini juga sesuai dengan pendapat Hartati. S. Y (2012) bahwa kandungan senyawa kimia dalam berbagai minyak atsiri mempunyai aktivitas yang berspektrum sangat luas baik terhadap mikroba (bakteri, jamur, virus, nematoda). Selain itu, penggunaan perlakuan benih dengan TSP (*Trisodium phosphate*) sudah pernah dilakukan pada penelitian sebelumnya oleh (Jarret *et al*., 2008). Perlakuan benih dengan TSP dapat mengurangi virus tetapi tidak dapat menghilangkan virus seluruhnya dan perlakuan benih dengan 10% TSP selama 2,5 jam pada suhu ruang dapat menurunkan infektivitas tetapi tidak

dapat untuk menghilangkan virus tersebut serta dapat mengurangi perkecambahan secara signifikan, sehingga dapat meningkatan jumlah bibit yang abnormal dari 11 menjadi 50 aksesi yang diuji. Perlakuan benih yang banyak dianjurkan yaitu dengan 10% TSP selama 2,5 jam, Meskipun hal ini dapat mengakibatkan beberapa kerugian perkecambahan.

Berdasarkan hasil uji serologi, perlakuan yang tidak efektif untuk mengeleminasi PMMoV (*Pepper Mild Mootle Virus*) pada benih yaitu perlakuan *dry heat treatment* pada suhu 50^0C selama 48 jam, perlakuan perendaman dengan ekstrak minyak bunga cengkeh 4% selama 20 menit, dan perlakuan perendaman dengan larutan HCL (Asam klorida) 0,25 N selama 30 menit.

Berdasarkan hasil pengamatan nilai absorbansi menggunakan *Elisa Reader,* pada menit ke 15 rerata nilai absorbansi perlakuan *dry heat treatment* 50^0C selama 48 jam yaitu 0.315, kemudian pada menit ke 30 rerata nilai absorbansi yaitu 0.6975, dan pada menit ke 45 rerata nilai absorbansi yaitu 1.043. Selain itu, rerata nilai absorbansi perlakuan perendaman dengan ekstrak minyak bunga cengkeh 4% selama 20 menit pada menit ke 15 yaitu 0.1395, kemudian pada menit ke 30 rerata nilai absorbansi yaitu 0.2495, dan pada menit ke 45 rerata nilai absorbansi yaitu 0.339. Selanjutnya, pada menit ke 15 rerata nilai absorbansi perlakuan perendaman dengan larutan HCL 0,25 N selama 30 menit yaitu 0.206, kemudian pada menit ke 30 rerata nilai absorbansi yaitu 0.4065, dan pada menit ke 45 rerata nilai absorbansi yaitu 0.594. Ketiga perlakuan tersebut tidak efektif untuk mengeleminasi PMMoV pada benih dikarenakan nilai absorbansi lebih besar dibanding nilai 2 kali kontrol negatif yaitu sebesar 0,162.

4.1.3. Pengaruh perlakuan fisik, kimia dan senyawa nabati terhadap daya tumbuh benih paprika varietas SP Maxima.

Hasil analisis ragam menunjukan beberapa perlakuan eliminasi PMMoV pada benih paprika berpengaruh nyata terhadap daya kecambah benih, Berdasarkan data hasil pengamatan semua perlakuan *dry heat treatment* 50^0C selama 48 jam (93.6 %), perendaman dengan ekstrak minyak daun cengkeh 4% selama 20 menit (79.3 %), perendaman dengan ekstrak minyak bunga cengkeh 4% selama 20 menit (91.6 %), perendaman dengan TSP 9.6 % selama 2 jam (88.3%), perendaman dengan larutan HCL 0,25 N selama 30 menit. (80.3%) lebih rendah dibanding tanpa perlakuan (97.6) sebagai kontrol. Hal tersebut dapat diartikan bahwa, pada semua perlakuan dapat menurunkan daya

kecambah benih. Standart dari daya kecambah yang tergolong tinggi pada keseluruhan benih yaitu ≥80%, sehingga pada perlakuan P1, P3, P4 dan P5 masih lebih baik daripada batas standart daya kecambah benih meskipun jika dibandingkan dengan kontrol P0 mengalami penurunan perkecambahan. Pengaruh perlakuan eliminasi PMMoV (*Pepper Mild Mottle Virus*) pada benih cabai paprika varietas SP Maxima terhadap daya tumbuh bibit disajikan.Tabel 4.

Tabel 4. Pengaruh perlakuan eliminasi PMMoV (*Pepper Mild Mottle Virus*) pada benih cabai paprika varietas SP Maxima terhadap daya tumbuh bibit.

No	Perlakuan	vigor (%)	Daya kecambah (%)
1	Kontrol (Tanpa perlakuan)	26 b	97.6 d
2	Dry heat treatment 50^{0}C selama 48 jam	19,3 b	93.6 cd
3	Perendaman ekstrak daun cengkeh 4 % selama 20 menit	0.6 a	79.3 a
4	Perendaman ekstrak bunga cengkeh 4 % selama 20 menit	6 a	91.6 cd
5	Perendaman dengan TSP 9,6 % selama 2 jam	21.6 b	88.3 bc
6	Perendaman dengan HCL 0,25 N selama 30 menit	26.6 b	80.3 ab

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom pengamatan yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji BNT taraf kesalahan 5%.

Daya kecambah terendah yaitu pada perlakuan perendaman ekstrak daun cengkeh 4 % selama 20 menit, hal tersebut dikarenakan pada daun cengkeh kadar minyak berkisar antara 1-4 % dengan kandungan eugenol antara 80-88 % dengan kadar *eugenol* rendah tetapi kadar *coryophyllene* yang tinggi Nurjannah (2004), diduga kadar *coryophyllene* yang tinggi dapat mengakibatkan penurunan daya perkecambahan yang signifikan.

4.1.4. Masa Inkubasi dan Gejala Serangan *Pepper Mild Mottle Virus* (PMMoV) pada tanaman Paprika varietas SP Maxima.

Berdasarkan hasil pengamatan masa inkubasi PMMoV (*Pepper Mild Mootle Virus*) pada tanaman paprika yaitu bervariasi sehingga terjadi perbedaan masa inkubasi virus. Berdasarkan pendapat yang dikemukakan oleh L. Bos (1990), waktu yang diperlukan virus untuk menimbulkan gejala serangan adalah 5-14 hari setelah inokulasi (HSI) atau bahkan beberapa minggu setelah virus masuk kedalam sel tanaman. Dikarenakan virus PMMoV terdeteksi pada benih maka tidak dilakukan inokulasi akan tetapi masa inkubasi yang dihitung yaitu waktu yang diperlukan virus untuk mengekspresikan gejalanya pada tanaman yang berasal dari benih terinfeksi virus PMMoV sehingga dapat mengetahui respon gejala serangan pada tanaman uji yang berasal dari benih terkonfimasi

positif virus PMMoV berdasarkan deteksi DAS-ELISA (*Double Anti body Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

Berdasarkan hasil pengamatan yang dilakukan, diketahui bahwa pada perlakuan berpengaruh tidak nyata terhadap masa inkubasi pada tanaman. Masa inkubasi gejala serangan pada perendaman dengan TSP 9,6 % selama 2 jam (39 Hst), perendaman ekstrak daun cengkeh 4 % selama 20 menit (38 Hst), perendaman ekstrak bunga cengkeh 4 % selama 20 menit (37,75 Hst) lebih rendah dibandingkan dengan kontrol (tanpa perlakuan) (37,5 Hst), sehingga perlakuan tersebut mempengaruhi masa inkubasi virus pada tanaman dan terjadi perbedaan masa inkubasi. Pada perlakuan Dry heat treatment 50^{0}C selama 48 jam (37 Hst) dan perendaman dengan HCL 0,25 N selama 30 menit (37 Hst) menunjukkan hasil yang sama, dibandingkan dengan P0 (kontrol) masa inkubasi pada tanaman menunjukkan hasil lebih cepat sehingga pengaruh perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda-beda pada masa inkubasi gejala pada tanaman. Hasil perbandingan masa inkubasi dan gejala PMMoV (*Pepper Mild Mootle Virus*) disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5 . Perbandingan Masa Inkubasi dan Gejala PMMoV pada tanaman paprika varietas SP Maxima.

No	Perlakuan	Masa inkubasi (Hst)	Gejala pada daun
1	Kontrol (Tanpa perlakuan)	37.5	cLL, M, Mal
2	Dry heat treatment 50^{0}C selama 48 jam	37	cLL, M, Mal
3	Perendaman ekstrak daun cengkeh 4 % selama 20 menit	38	cLL, M, Mo, Dist, Stunt
4	Perendaman ekstrak bunga cengkeh 4 % selama 20 menit	37.75	cLL, M, Mo, Mal
5	Perendaman dengan TSP 9,6 % selama 2 jam	39	cLL, M, Mal
6	Perendaman dengan HCL 0,25 N selama 30 menit	37	cLL, M, Mal

Keterangan: cLL = Klorotik Lesio Lokal, M = Mosaic, Mo = Belang, Mal = Perubahan bentuk , Stunt = Stunting (kerdil)

Berdasarkan pendapat Sastrahidayat (2011), menyatakan bahwa penyebaran virus pada tanaman bervariasi tergantung pada jenis virus, tanaman, dan interaksi antar keduanya. Hal itu menyebabkan terjadinya perbedaan masa inkubasi virus. Masa inkubasi adalah perhitungan waktu yang dibutuhkan virus untuk menimbulkan gejala serangan yang dihitung mulai dari penularan virus,

tujuan dari mengamati masa inkubasi yaitu untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan virus untuk menimbulkan gejala serangan. Menurut pendapat Hadiastono (2012), bahwa pada kondisi lingkungan tertentu gejala penyakit tidak menampakkan gejala sebenarnya, meskipun sebenarnya virus telah menginfeksi dan telah berada di dalam inangnya. Hal ini disebabkan oleh infeksi virus bersifat laten. Hasil gejala PMMoV (*Pepper Mild Mootle Virus*) disajikan pada Gambar 6.

Gambar 6. Gejala PMMoV pada tanaman paprika (A. Gejala klorotik Mosaic local, Mosaic, B. Daun tanaman paprika mengalami perubahan bentuk, C. Gejala belang dan stunting (kerdil) pada tanaman paprika)

4.1.5. Presentase Kejadian Penyakit Pada Tanaman Paprika Varietas SP Maxima.

Berdasarkan hasil analisis ragam diperoleh hasil bahwa pada insiden penyakit tidak berbeda nyata antar perlakuan dengan kontrol. Presentase insiden penyakit pada pengamatan 7 hst menunjukkan bahwa perlakuan *dry heat treatment* 50^0 C selama 48 jam, perendaman ekstrak bunga cengkeh 4 % selama 20 menit dan perendaman dengan HCL 0,25 N selama 30 menit menunjukkan presentase lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol, akan tetapi pada perlakuan perendaman ekstrak daun cengkeh 4 % selama 20 menit, perendaman dengan TSP 9,6 % selama 2 jam menunjukkan presentase lebih rendah dibandingkan kontrol.

Berdasarkan hasil analisis ragam diperoleh hasil bahwa presentase insiden penyakit pada 14 hst semua perlakuan menunjukkan presentase lebih tinggi dibandingkan kontrol, hal tersebut berpengaruh karena adanya infeksi virus pada benih yang akan menginfeksi pada tanaman uji sehingga apabila virus terinfeksi pada masa vegetatif maka akan menunjukkan gejala lebih awal pada tanaman paprika varietas SP Maxima, hal ini dipengaruhi oleh beberapa faktor (fisik, kimia dan biologi) terhadap reaksi inang.

Berdasarkan pendapat Hadiastono (2012), faktor yang berpengaruh terhadap reaksi inang terhadap infeksi virus antara lain yaitu: a. Faktor fisik, intensitas cahaya, temperatur dan kelembapan udara. b. Faktor kimia meliputi senyawa-senyawa *klorine*, nitrogen yang tergabung pada senyawa kimia organik maupun anorganik, antibiotik (*citovirin, naramycin, dan mitomycin C*). c. Faktor biologi meliputi interaksi strain virus yang terlibat pada reaksi perlindungan silang, interaksi antar jenis virus yang terlibat pada reaksi antagonistik, maupun sinergistik. Insiden penyakit pada tanaman paprika varietas SP Maxima disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. *Disease Incidence* pada tanaman paprika varietas SP Maxima.

No	Perlakuan	*Disease Incidence* (%)	
		7 Hst	14 Hst
1	Kontrol (Tanpa perlakuan)	25.0	31.7
2	Dry heat treatment 50^{0}C selama 48 jam	25.0	48.3
3	Perendaman ekstrak daun cengkeh 4 % selama 20 menit	16.7	41.7
4	Perendaman ekstrak bunga cengkeh 4 % selama 20 menit	21.7	53.3
5	Perendaman dengan TSP 9,6 % selama 2 jam	3.3	30.0
6	Perendaman dengan HCL 0,25 N selama 30 menit	26.7	53.3

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom pengamatan yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji BNT taraf kesalahan 5%. Data ditransformasikan ke (Arcsin√x) untuk keperluan analisis statistika.

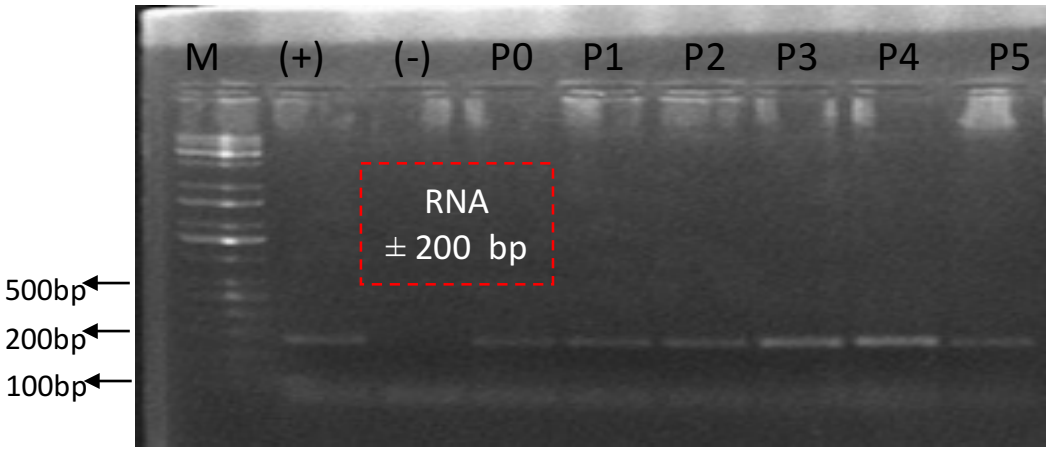
4.1.6. Identifikasi Secara Molekuler

a. Isolasi RNA Tanaman

Pada pengujian identifikasi tanaman yang memiliki gejala virus dilakukan dengan cara mengisolasi RNA tanaman dengan metode Trizol®. Tujuan dari isolasi yaitu untuk memperolah RNA murni dari tanaman. Isolasi dilakukan dengan mengambil daun tanaman yang menunjukkan gejala virus dan kemudian diisolasi dengan tujuan untuk melihat pita RNA tanaman pada masing-masing perlakuan.

Berdasarkan visualisasi menggunakan elektroforesis menunjukkan bahwa terdapat pita RNA pada semua tanaman yang memiliki gejala virus dari masing-masing perlakuan, elektroforegram tersebut menunjukkan bahwa RNA tanaman teramplifikasi pada pita Marker berukuran 200 bp, tujuan dilakukan visualisasi untuk mengetahui kuantitas konsentrasi RNA pada masing-masing tanaman

sehingga dapat dilakukan amplifikasi PCR, Visualisasi RNA dilakukan menggunakan elektroforesis gel agarose 2%. Hasil visualisasi disajikan pada Gambar 8.



Gambar 8. Bandpita RNA pada tanaman paprika

Keterangan: (M) Marker Kappa DNA Lader 1kb, (+) RNA tanaman paprika, (-) ddH20 (P0) Kontrol tanpa perlakuan, (P1) *Dry heat treatment* 50^0C selama 48 jam, (P2) Perendaman dengan ekstrak minyak daun cengkeh 4% selama 20 menit, (P3) Perendaman dengan ekstrak minyak bunga cengkeh 4% selama 20 menit, (P4) Perendaman dengan TSP 9.6 % selama 2 jam, (P5) Perendaman dengan larutan HCL 0,25 N selama 30 menit.

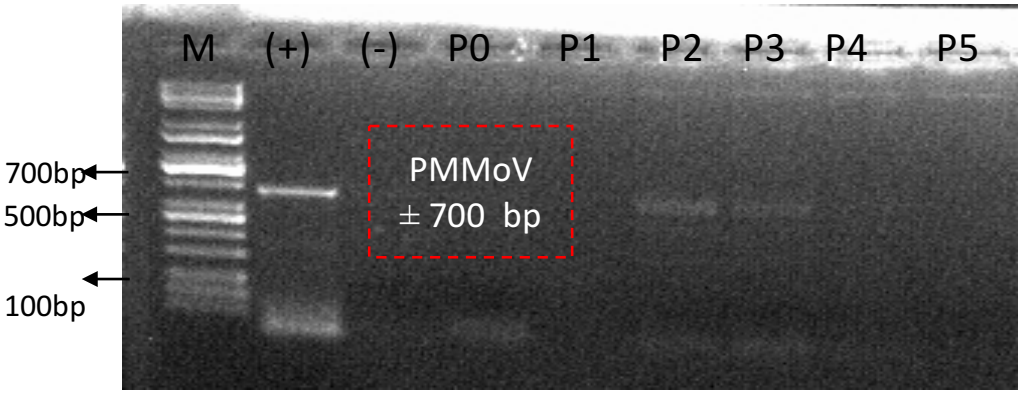
Selain itu visualisasi elektroforesis juga bertujuan untuk melihat pola mobilitas elektroforetik dan ukuran fragmennya. Dengan medan elektroforetik positif dan negatif yang mengalir melalui buffer elektroforesis, fragmen asam nukleat akan terpisah melalui pori-pori gel.

b. Deteksi RT-PCR (Reverse Transciptase Polymerase Chain *Reaction*) Pada Tanaman Yang Bergejala Virus Menggunakan Primer Spesifik PMMoV (*Pepper Mild Mottle Virus*).

Dikarenakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) tidak dapat berkerja pada RNA (*Ribonucleid Acid*) karena konsentrasinya sangat sedikit dalam tumbuhan sehingga perlunya untuk mensintesis DNA dari RNA maka dilakukan *reverse transciptase* (RTase) untuk memperoleh DNA komplementer (cDNA) dengan bantuan Kit *Revertaid H Minus M-Mulv reverse transciptase.*

Berdasarkan hasil RT-PCR menunjukkan bahwa terdapat bandpita cDNA tanaman pada perlakuan Perendaman ekstrak daun cengkeh 4 % selama 20 menit, Perendaman ekstrak bunga cengkeh 4 % selama 20 menit yang teramplifikasi pada gelombang ±700bp. Sedangkan pada perlakuan kontrol (P0),

dry heat treatment 50^0C selama 48 jam, perendaman dengan TSP 9,6 % selama 2 jam, perendaman dengan HCL 0,25 N selama 30 menit tidak menunjukkan hasil. Ukuran pita cDNA yang teramplifikasi tersebut mendekati ukuran pita target virus PMMoV yaitu 730 bp (Nindi Rialch *et al*., 2015). Hasil visualisasi disajikan pada Gambar 9.



Gambar 9. Amplifikasi cDNA menggunakan primer spesifik PMMoV

Keterangan: (M) marker kappa DNA lader 1kb, (+) kontrol positif PMMoV, (-) kontrol negatif (P0) kontrol tanpa perlakuan, (P1) *dry heat treatment* 50^0C selama 48 jam, (P2) perendaman dengan ekstrak minyak daun cengkeh 4% selama 20 menit, (P3) perendaman dengan ekstrak minyak bunga cengkeh 4% selama 20 menit, (P4) perendaman dengan TSP 9.6 % selama 2 jam, (P5) perendaman dengan larutan HCL 0,25 N selama 30 menit.

Berdasarkan pendapat L.Bos (1990), derajat homologi antara asam nukleat strain atau virus yang berbeda sekarang dapat secara langsung dikaji dengan penggunaan DNA komplementer. DNA yang demikian dapat disiapkan secara *in vitro* pada RNA virus sebagai pola cetak menggunakan enzim transkiptase terbalik (*reverse transciptase*). DNA komplementer yang diperoleh dilakukan amplifikasi untuk melihat konsentrasi pasang basa virus PMMoV dengan menggunakan Primer spesifik PMMoV yang memiliki sekuensi (*Foward* F 5'- CCA ATG GCT GAC AGA TTA CG-3'dan *Reverse* R 5'-CAA CGA CAA CCC TTC GAT TT -3'). Menurut pendapat Wahyuni. W. S (2005), primer yaitu sekuensi DNA/RNA yang pendek (20-30bp), digunakan untuk inisiasi proses replikasi DNA gen target, Primer f*oreward* (*up stream*) 5'-3', primer *backward* (*down stream*) 3'-5', primer ini digunakan dalam proses amplifikasi DNA melalui PCR/RT- PCR, atau sintesis cDNA (15-100bp).

Diduga pada hasil ini terdapat infeksi gabungan atau ganda pada tanaman uji sehingga pada tanaman uji menunjukkan gejala akan tetapi bukan

virus target PMMoV. Menurut Hadiastono (2012), disebutkan bahwa gejala infeksi virus dapat bervariasi dikarenakan adanya infeksi ganda dari dua atau lebih virus di dalam satu tanaman inang, sifat infeksi ini dapat terjadi secara antagonis atau sinergis. Infeksi ganda disebut juga sebagai reaksi perlindungan silang (*cross protection*) dari kombinasi virus strain lemah dan strain virus yang lebih kuat. Selain itu disebutkan bahwa penularan virus juga dapat dikarenakan penularan secara mekanis, Penularan secara mekanis dapat dilakukan melalui kontak cairan perasan (ekstrak) tanaman yang mengandung virus tertular pada permukaan tanaman sehat sehingga partikel virus dapat berpenetrasi melalui lapisan kutikula dan epidermis daun tanaman sehat.

Selain itu menurut Avgelis (1986), disebutkan bahwa tingkat transmisi virus PMMoV pada benih cabai yaitu 36%, sehingga penularan pada tanaman sangat kecil. Dan berdasarkan pendapat Genda *et al.* (2005), dilaporkan bahwa PMMoV terinfeksi pada epidermis dan parenkim benih akan tetapi tidak ditularkan pada endosperm atau embrio. Sehingga virus yang berada pada epidermis benih diduga tidak menular pada tanaman dikarenakan tidak terinfeksi pada embrio benih.

4.2. Pembahasan Umum

Efektivitas perlakuan dinilai dari hasil uji serologi DAS-ELISA (*Double Anti body Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), dibuktikan dengan melihat jika nilai absorbansi bernilai negatif atau pada mikrotiter tidak mengalami perubahan warna maka dapat dikatakan virus yang ada pada benih dapat tereleminasi oleh perlakuan.

Berdasarkan hasil uji serologi ada 2 perlakuan yang efektif mengeleminasi virus pada benih, perlakuan yang efektif untuk mengeleminasi PMMoV pada benih yaitu perlakuan perendaman menggunakan ekstrak daun cengkeh dengan konsentrasi 4% selama 20 menit dan perendaman menggunakan larutan TSP (*trisodium phosphate*) dengan konsentrasi 9,6% selama 2 jam. Diduga pada perlakuan perendaman menggunakan ekstrak daun cengkeh dengan konsentrasi 4% selama 20 menit kadar daun cengkeh yaitu eugenol dan coryophyllene yang sangat tinggi dapat merusak susunan protein atau asam nukleat virus, sehingga berdasarkan uji serologi didapatkan hasil yang negatif atau dapat dikatakan bahwa virus yang menginfeksi benih dapat dihilangkan, perlakuan mengunakan senyawa nabati belum banyak membuktikan dapat mengendalikan virus akan tetapi sudah dibuktikan dapat mengendalikan

cendawan. Minyak cengkeh dengan konsentrasi 300 ppm dapat menghambat pertumbuhan *Phytophthora* 83-95% dan *Sclerotium sp.* (Manohara *et al*. 1994).

Berdasarkan pendapat Dijkstra (1998), salah satu keuntungan mengunakan pengujian DAS-ELISA yaitu dapat membaca konsentrasi virus yang sangat rendah (1-10 ng/ml) dan pengukuran kuantitatif dapat dilakukan. Sehingga pengunaan metode ini dapat membantu dalam menyimpulkan keefektifan perlakuan untuk mengeleminasi virus. Selain itu pada perlakuan P4 diduga kandungan Na3P04 tersebut dapat merusak susunan protein dan asam nukleat sehingga virus yang berada dalam benih dapat dihilangkan dengan perlakuan tersebut. Perlakuan mengunakan TSP sebelumnya sudah pernah dilakukan akan tetapi tidak efektif untuk menghilangkan virus pada benih. Berdasarkan pendapat Jarret *al et*. (2008), Perlakuan benih dengan TSP dilaporkan bahwa virus dapat berkurang akan tetapi tidak dapat hilang, dan perlakuan benih dengan 10% TSP selama 2,5 jam pada suhu ruang dapat menurunkan infektivitas tetapi tidak dapat untuk menghilangkan, dan tidak dapat untuk mengurangi perkecambahan secara signifikan. Sehingga hipotesis peneliti mencoba mengunakan konsentrasi lain agar tidak menurunkan mutu fisiologis dan patologis benih.

Berdasarkan pendapat Ilyas. (2007), disebutkan bahwa minyak cengkeh dengan konsentrasi 0,2%, 0,5%, 0,8%, 1% dan 2% tidak menimbulkan toksik, akan tetapi pada konsentrasi 3%, 4% dan 5% mengakibatkan toksik pada benih. Sehingga pada uji daya kecambah perlakuan *dry heat treatment* 50^0 C selama 48 jam (93.6%), perendaman ekstrak daun cengkeh 4% selama 20 menit (79.3%), perendaman ekstrak bunga cengkeh 4 % selama 20 menit (91.6%), perendaman dengan TSP (*Trisodium phosphate*) 9,6 % selama 2 jam (88.3%), dan perendaman dengan HCL (Asam klorida) 0,25 N selama 30 menit (80.3%) lebih rendah dibanding perlakuan Kontrol (97.6) sebagai kontrol, Hal tersebut dapat diartikan bahwa pada semua perlakuan dapat menurunkan daya kecambah benih. Standart daya kecambah yang tergolong tinggi hampir seluruh benih yaitu ≥80%, sehingga pada perlakuan *dry heat treatment* 50^0 C selama 48 jam, perendaman ekstrak bunga cengkeh 4 % selama 20 menit, perendaman dengan TSP (*Trisodium phosphate*) 9,6 % selama 2 jam dan perendaman dengan HCL (Asam klorida) 0,25 N selama 30 menit masih lebih baik daripada batas standart daya kecambah benih meskipun dibandingkan dengan kontrol (P0) yang mengalami penurunan perkecambahan.

Pengamatan Masa inkubasi yang dilakukan, diketahui bahwa masa inkubasi pada tanaman adalah berbeda-beda, Masa inkubasi gejala serangan pada perendaman dengan TSP (*Trisodium phosphate*) 9,6 % selama 2 jam (9 Hst), perendaman ekstrak daun cengkeh 4% selama 20 menit (8 Hst), perendaman ekstrak bunga cengkeh 4% selama 20 menit (7,75 Hst) lebih rendah dibandingkan dengan kontrol (7,5 Hst), sehingga perlakuan tersebut mempengaruhi masa inkubasi virus pada tanaman sehingga terjadi perbedaan masa inkubasi. Pada perlakuan perlakuan *dry heat treatment* 50^0 C selama 48 jam (7 Hst) dan perendaman dengan HCL (Asam klorida) 0,25 N selama 30 menit (7 Hst) menunjukkan hasil yang sama, dibandingkan dengan kontrol (P0) masa inkubasi pada tanaman menunjukkan hasil lebih cepat sehingga pengaruh perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda-beda pada masa inkubasi gejala pada tanaman, gejala pada tanaman antar perlakuan menunjukkan gejala yang berbeda-beda adapun gejala yang ditemukan yaitu klorotik lesio lokal, mosaik, mottle (belang), malformasi (perubahan bentuk) dan stunting (kerdil). Terkadang pada tanaman menunjukkan gejala dan serangan yang berbeda-beda dikarenakan terjadinya infeksi ganda dari beberapa virus bukan target. Berdasarkan pendapat Hadiastono (2012), disebutkan bahwa gejala infeksi virus dapat bervariasi dikarenakan adanya infeksi ganda dari dua atau lebih virus di dalam satu tanaman inang, sifat infeksi ini dapat terjadi secara antagonis atau sinergis. Infeksi ganda disebut juga sebagai reaksi perlindungan silang (*cross protection*) dari kombinasi virus strain lemah dan strain virus yang lebih kuat.

Berdasarkan pengujian masing-masing gejala pada perlakuan, didapatkan bahwa hasil amplifikasi RT-PCR ada dua perlakuan (P2) perendaman dengan ekstrak minyak daun cengkeh 4% selama 20 menit dan (P3) perendaman dengan ekstrak minyak bunga cengkeh 4% selama 20 menit yang teramplifikasi pada panjang gelombang ±700bp mengunakan primer spesifik PMMoV, sehingga diduga pada tanaman perlakuan lain yang menunjukkan gejala terdapat infeksi ganda dari strain virus lain, sehingga perlu dilakukan deteksi menggunakan primer lain.

Pengujian mengunakan primer TYLCV (*Tomato Yellow Leafcurl Virus*), MYMV (*Mungbean Yellow Mosaic Virus*) dan PepYLCV (*Pepper Yellow Leaf curl Virus*) (Lampiran. 11) sudah dilakukan akan tetapi bernilai negatif, perlunya deteksi menggunakan primer lain. Berdasarkan pendapat Gracia *et al.,* 1968 dalam Nindhi Rialch *et al*., 2015) Didapatkan bahwa ada 13 virus yang

menginfeksi tanaman paprika; *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Potato virus Y* (PVY), *Pepper mottle virus* (PepMoV), *Pepper severe mosaic virus* (PeSMV), *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), *Tomato yellow leafcurl virus* (TYLCV), *Pepper veinal mottle virus* (PVMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) dan *Pepper ring spot virus* (PepRSV).

5 . KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilaksanakan bahwa:

1. Perlakuan perendaman benih cabai paprika varietas SP Maxima dengan ekstrak minyak daun cengkeh 4% selama 20 menit dan perendaman dengan TSP (*Trisodium phosphate*) 9.6% selama 2 jam efektif untuk menghilangkan virus PMMoV (*Pepper Mild Mottle Virus*) pada benih cabai paprika varietas SP Maxima.
2. Semua perlakuan menurunkan daya perkecambahan dibandingkan dengan kontrol (97.6%), Perlakuan dengan perendaman ekstrak bunga cengkeh 4 % selama 20 menit memiliki daya kecambah paling tinggi (91.6 %) dibandingkan dengan perlakuan lainya.
3. Perlakuan perendaman dengan TSP 9.6% selama 2 jam memiliki presentase insiden penyakit terkecil 30.0 % dibandingkan dengan perlakuan lainya.

5.2. Saran

Perlu dilakukan kajian lebih lanjut mengenai konsentrasi pada masing- masing perlakuan agar tidak menurunkan mutu fisiologis benih serta kemampuan perlakuan dalam menekan gejala virus pada tanaman paprika varietas SP Maxima.

DAFTAR PUSTAKA

Admiranto, A. dan Gunawan. 2009. Menjelajah Tata Surya. Kanisius. Yogyakarta.

Agustiansyah. 2011. Perlakuan Benih untuk Perbaikan Pertumbuhan Tanaman Hasil dan Mutu Benih Padi serta Pengendalian Penyakit Hawar Daun Bakteri dan pengurangan Penggunaan Pupuk Fosfat. IPB PRESS. Bogor.

Aguilar, M.I., Guirado, M.L., Melero-Vara, J.M., dan Gómez, J. 2010. Efficacy of composting infected plant residues in reducing the viability of Pepper mild mottle virus, Melon necrotic spot virus and its vector, the soil-borne fungus Olpidium bornovanus. Crop Protection, 29(4):342-348. http://www.sciencedirect.com/science/journal/02612194.

Anwar, A., Sudarsono., dan Ilyas, S. 2005. Perbenihan sayuran di Indonesia: Kondisi terkini dan prospek bisnis benih sayuran.Bul. Agronom. (33) (1) 38-47.

Aris, M., Sukenda, E., Harris, M.F., Sukardi, dan M. Yuhana. 2013. Identifikasi molekuler bakteri patogen dan desain primer PCR. Jurnal Budidaya Perairan. 3: 43-50.

Avgelis, A.D. 1986. A pepper strain of TMV who is new create (Greece). J. Phy. 25: 33-38.

Bos, L. 1990. Pengantar Virologi Tumbuhan. Gadjah Mada University Press.:Yogyakarta. 226 pp.

Cahyono., dan Bambang. 2003. Cabai Paprika Teknik Budi Daya dan Analisis Usaha Tani. Kanisius. Yogyakarta.

Conti, M., dan Marte, M. 1983. Virus, virosi e micoplasmosi del peperone. Italiano Agriculture, 120:132-152.

Demski, J.W, 1981. Tobacco mosaic virus in seedborne in pimiento peppers. Plant Disease, 65(9):723-724.

Dijkstra, J. dan C. P. de Jager. 1998. *Practical Plant Virology Protocol and Exercises*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. Department of Virology. Wageningen Agricultural University. Wageningen. The Netherland. Hlm 348- 349.

Genda, Y., Sato, K., Nunomura, O., Hirabayashi, T., dan Tsuda, S. 2011. Immunolocalization of Pepper mild mottle virus in developing seeds and

seedlings of Capsicum annuum. Journal of General Plant Pathology, 77(3):201-208. http://www.springerlink.com/content/5655v8236n75u730/.

Gunawan, V. 2009. Formulasi dan aplikasi edible coating berbasis pati sagu dengan penambahan vitamin C pada paprika. (Skripsi). Fakultas Teknologi Pertanian IPB. Bogor. 50 Hlm.

Hadiastono, T. 2012. Virologi Tumbuhan. Fakultas Pertanian. Universitas Brawijaya Press. Malang.10- 69 pp.

Hare, H.W., dan Lucas, G.B. 1959. Control of contact transmission of tobacco mosaic virus with milk. Plant Disease Reporter, 43:152-156.

Hartati.S.Y, 2012. Prospek Pengembangan Minyak Atsiri Sebagai Pestisida Nabati. Balai besar Tanaman Rempah dan Obat. Perspektif.11(1): 45-58.

Ilyas. S., Kadir. T.S., Yukti, A.M., Fiana. S., Fadhilah. S., Nugraha. U.S., dan Sudarsono, 2007. Efektivitas pestisida nabati dan agen hayati dalam mengendalikan patogen terbawa benih padi secara In- Vitro. Apresiasi hasil penelitihan padi 2007. hal 468.

Ikegashira, Y., Noguchi, K., Hamada, H., dan Tsuda, S, 2010. Isolation of the microbes inactivating Pepper mild mottle virus (PMMoV), as naturally occurring beneficial bacteria in soil, and suppresive effect of soil-borne PMMoV diseases. Soil Microorganisms, 64(1):11-17.

International Commitee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2015. Pepper Mild Mottle Virus (Online). http:// http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?msl_id=30//. Diunduh pada 12 Oktober 2016.

Jarret, R.L., Gillespie, A.G., Barkley, N.A., dan Pinnow, D.L. 2008. The occurrence and control of Pepper mild mottle virus (PMMoV) in the USDA/ARS Capsicum germplasm collection, 30(1):26-36.

Klag, N.G. 1997. Seed quarantine system in the United States. In: McGee D.C. (ed). Plant Pathogens and the Worldwide Movements of Seeds. APS Press, Minnesota.p. 55-66.

Lazarovits, G. 1990. *The dot immunobinding assay (DIA)-Bacteria.* nHampton, R., E. Ball, and S. De Boer (Eds.). *Serological Methods for Detection and Identification of Viral and bacterial Plant Patogens*. APS Press, St Paul, Minn. p. 248-261.

Lamb, E.M., Atkins, S., Schuler, K.D., dan Roberts, P.D. 2001. University of Florida Extension Bulletin.

Manohara, D., Wahyuno, D., dan Sukamto. 1994. Pengaruh Tepung dan Minyak Cengkeh terhadap Phytophthora, Rigdoporus dan Sclerotium. Dalam Prosiding Seminar Hasil Penelitian Dalam Rangka Pemanfaatan Pestisida Nabati. Bogor, 1-2 Desember. Balittro, Bogor. Hlm. 19-27.

M. Marte, 1986. Descriptions of Plant Viruses. Diunduh dari http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=330. Pada tanggal 9 Januari 2017.

Miller, D. C. 2006. *Mechanism(s) of enhanced vascular cell response to polymeric biomaterials with nano-structured surface features*. ProQuest Information and Learning Company, Ann Arbor: p. 84.

Nindhi, R., Vivek, S., Anuradha, S., dan Prem, S. 2015. Characterization and complete nucleotide sequencing of Pepper Mild Mottle Virus infecting Bell Pepper in India.Phytoparasitica. 43: 327-337.

Nurdjannah. 2004. Diversifikasi Penggunaan Cengkeh. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pasca Panen Pertanian. Perspektif, 3(2): 61-70

Pares, R.D. 1985. A tobamovirus infecting capsicum in Australia. Annals of Applied Biology, 106(3):469-474.

Pares, R.D. 1988. Serological comparison of an Australian isolate of Capsicum mosaic virus with Capsicum tobamovirus isolates from Europe and America. Annals of Applied Biology, 112(3):609-612.

Pares, R.D., dan Gunn, L.V. Cresswell, G.C. 1992. Tomato mosaic virus infection in a recirculating nutrient solution. Journal of Phytopathology, 135(3):192-198.

Pares, R.D., dan Gunn, L.V. 1989. The role of non-vectored soil transmission as a primary source of infection by pepper mild mottle and cucumber mosaic viruses in glasshouse-grown Capsicum in Australia. Journal of Phytopathology, 126(4):353-360.

Pares, R.D., dan Gunn, L.V. Cresswell, G.C. 1992. Tomato mosaic virus infection in a recirculating nutrient solution. Journal of Phytopathology, 135(3):192-198.

Prihmantoro, Y.H., dan Indriani, 1995. *Hidroponik Sayuran Semusim Untuk Bisnis dan Hobi*. Penebar Swadaya, Cimanggis Bogor.

Ranson., dan Lois. 2005. *Pengelolaan Koleksi Patogen Tanaman.* Australian Goverment Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. Australian.

Rojas, M.R., Gilbertson, R.L., Russel,D.R., dan Maxwell, D.P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminivirus. Plant Dis. 77: 340-347.

Saleh, N. 2008. Penggunaan benih sehat sebagai sarana utama optimasi pencapaian produktivitas kedelai. Iptek Tanaman Pangan. Vol.3 No.2.

Sastrahidayat, I.R. 1990. Ilmu Penyakit Tumbuhan. Usaha Nasional : Surabaya. 366 pp.

Situmeang, M., Purwantoro, A., dan Sulandari, S. 2014. Pengaruh pemanasan terhadap perkecambahan dan kesehatan benih kedelai (Glycine max (L.) Merrill).Vegetalika. Vol.3 No 3,2014: 27-34.

Stijger, C.C.M.M. 1993. The effectiveness of disinfectants against pepper mild mottle virus in organic material. Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Universiteit Gent, 58(3a):1097-1101.

Sudjadi, 2008. Bioteknologi Kesehatan. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. Hal. 94 – 99 dan hal. 131-43 .

Suena, W., G.N Raka, A.A.M. Astiningsih, 2005.Ilmu dan Teknologi Benih.Diktat.Denpasar. Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Udayana.

Suranto, 2014. Virologi Tumbuhan;Panduan Kerja Laboratorium Edisi 2. Graha Ilmu. Yogyakarta.

Sutopo, L. 2002. Teknologi Benih edisi revisi. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. PT. Raja Grafindo Persada. Malang.

Sylvest, L. 2010. An Introduction to ELISA: 1 hlm. http://www.abdserotec.com/resources/elisa-technical-resources-and troubleshooting/an-introduction-to-elisa.html.

Tosic, M., Sutic, D., dan Pesic, Z. 1980. Transmission of tobacco mosaic virus through pepper (Capsicum annuum L.) seed. Phytopathologische Zeitschrift, 97(1):10-13.

Toyoda, K.Y., Hikichi, S., Takeuchi, A., Okumura, S., Nasu, T., Okuno dan K. Suzuki. 2004. Efficient Inactivation of Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) in Harvested Seed in Green Pepper (*Capsium annum*.L) Assessed by a Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Based Amplification. Scientific Reports of The Faculty of Agriculture. Okayama University. 93 : 29- 32.

Wahyuni.W.S, 2005. Dasar- Dasar Virologi Tumbuhan. Gadjah Mada University Press.

Wetter, C. 1984. Serological identification of four tobamoviruses infecting pepper. Plant Disease, 68(7):597-599.

Wetter, C., Conti, M., Altschuh, D., Tabillion, R., dan Regenmortel, M. 1984. Pepper mild mottle virus, a tobamovirus infecting pepper cultivars in Sicily. Phytopathology, 74(4):405-410.

Xiang, B.C., Xie, H., Cui, X.M., Li, C., Liu, S.P., Xi, D.H., dan Yi, Y.Q. 1994. Isolation and identification of pepper mild mottle tobamovirus in Xinjiang. Chinese Journal of Virology, 10:240-245.

McKinney, H.H. 1952. Two strains of tobacco mosaic virus, one of which is seed-borne in an etch-immune pungent pepper. Plant Disease Reporter, 36:184-187.

Yoneyama, S. 1998. Control of the P strain of tobacco mosaic virus in sweet pepper. 2. Effects of soil fumigation with methyl bromide in the spring season. Control of the P strain of tobacco mosaic virus in sweet pepper, 35:53-55.

Zuhriana, K.Y, 2010. Polymerase Chain Reaction (PCR). Saintek, Vol 5. No 6. Tahun 2010.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Tabel pengacakan pada greenhouse.

P3U4	P4U3	P3U1	P1U3
P0U3	P5U1	P1U2	P0U2
P2U2	P1U1	P2U1	P2U4
P4U2	P0U1	P4U1	P5U3
P5U4	P4U4	P5U2	P3U3
P3U2	P2U3	P0U4	P1U4

Lampiran 2. Uji pendahuluan presentase vigor daya kecambah benih perlakuan *Dry Heat Treatment*

No	SUHU	24 JAM		48 JAM		72 JAM	
		Vigor (%)	Daya kecambah (%)	Vigor (%)	Daya kecambah (%)	vigor (%)	Daya kecambah (%)
1	40^0 C U1	70	70	80	80	70	70
2	40^0 C U2	80	75	75	75	85	80
3	50^0 C U1	85	85	65	90	75	75
4	50^0 C U2	90	85	80	95	95	95
5	60^0 C U1	65	85	75	75	75	70
6	60^0 C U2	60	85	75	75	85	85
7	70^0 C U1	70	80	80	80	75	70
8	70^0 C U2	90	70	85	90	90	85
9	80^0 C U1	15	10	35	15	15	5
10	80^0 C U2	25	15	35	25	20	15
11	Kontrol	75	75	-	-	-	-

Keterangan: Kontrol (Tanpa perlakuan *Dry Heat Treatment*)

Lampiran 3. Hasil analisis sidik ragam vigor benih paprika

SK	JK	DB	KT	F- hitung	F- Tabel 5 %	
Perlakuan	1766.944	5	353.3888	8.678035	3.11	**
Galat	488.66667	12	40.72222			
Total	2255.611	17	132.6830			

Lampiran 4. Hasil analisis sidik ragam uji daya kecambah benih paprika.

SK	JK	DB	KT	F- hitung	F- Tabel 5 %	
Perlakuan	814.5	5	162.9	6.430263	3.11	**
Galat	304	12	25.33333			
Total	1118.5	17	65.79411			

Lampiran 5. Uji pendahuluan pengaruh perlakuan ekstrak bunga cengkeh dan ekstrak daun cengkeh terhadap perkecambahan Benih cabai

No	Kode	Vigor (%)			Daya Kecambah (%)		
		U1	U2	Rata-rata	U1	U2	Rata-rata
1	NT	7	4	5,5	56	61	58,5
2	PRKM	10	11	10,5	53	50	51,5
3	PRBC 2 %	4	3	3,5	90	72	81
4	PRBC 4 %	0	0	0	36	84	60
5	PRBC 6 %	0	0	0	35	33	34
6	PRDC 2 %	1	2	1,5	91	90	90,5
7	PRDC 4 %	1	1	1	87	86	86,5
8	PRDC 6 %	2	1	1,5	63	56	59,5

Keterangan: NT : Tanpa perlakuan
PRKM: Priming kontrol metode
PRBC : Priming bunga cengkeh
PRDC : Priming daun cengkeh

Lampiran 6. Hasil analisis sidik ragam Masa Inkubasi dan Gejala PMMoV pada tanaman paprika varietas SP Maxima.

SK	JK	DB	KT	F- hitung	F- Tabel 5 %
Perlakuan	0.026112633	5	0.005222527	0.828226996	2.77
Galat	0.113502072	18	0.006305671		
Total	0.139614705	23	0.006070205		

Lampiran 7. Hasil analisis sidik ragam presentase *Disease Incidence* pada tanaman paprika varietas SP Maxima pada 7 hst.

SK	JK	DB	KT	F-hitung	F- Tabel 5 %
Perlakuan	0.305	5	0.061	0.897	3.11
Galat	0.817	12	0.068		
Total	1.122	17	0.066		

Lampiran 8. Hasil analisis sidik ragam presentase *Disease Incidence* pada tanaman paprika varietas SP Maxima. pada 14 hst.

SK	JK	DB	KT	F-hitung	F- Tabel 5 %
Perlakuan	0.270	5	0.054	0.685	3.11
Galat	0.947	12	0.079		
Total	1.218	17	0.072		

Lampiran 9. Dokumentasi uji daya kecambah benih paprika.

P0U1

P0U2

P0U3

P0U4

P1U1

P1U2

P1U3

P1U4

P2U1

P2U2

P2U3

P2U4

P3U1

P3U2

P3U3

P3U4

P4U1

P4U2

P4U3

P4U4

P5U1

P5U2

P5U3

P5U4

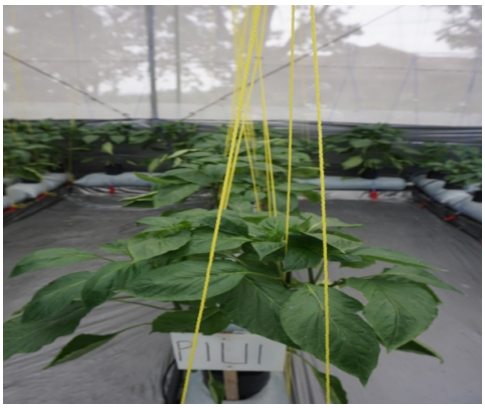
Lampiran 10. Dokumentasi Insiden penyakit tanaman paprika.

P0U1

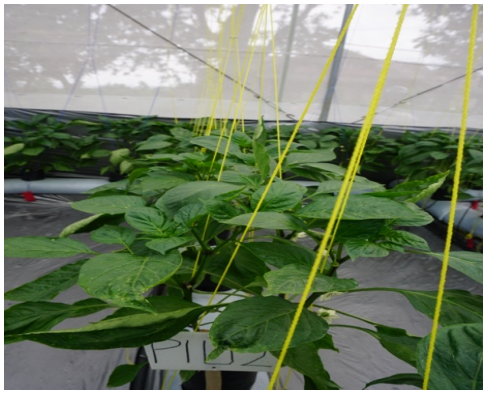
P0U2

P0U3

P0U4



P1U1



P1U2

P1U3

P1U4

P2U1

P2U2

P2U3

P2U4

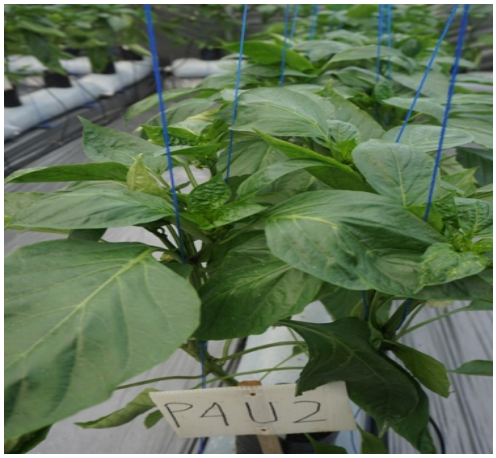
P3U1

P3U2

P3U3

P3U4

P4U1

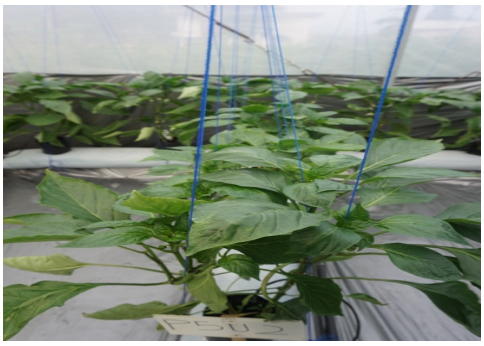


P4U2

P4U3

P4U4

P5U1



P5U2

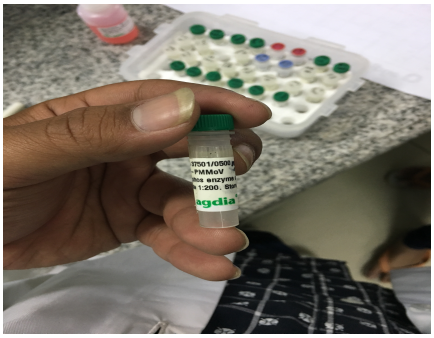
P5U3

P5U4

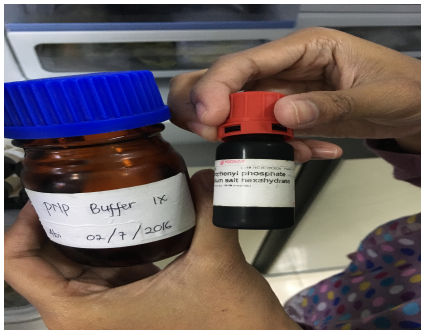
Lampiran 11. Dokumentasi Penelitian

a.Pengujian DAS- ELISA

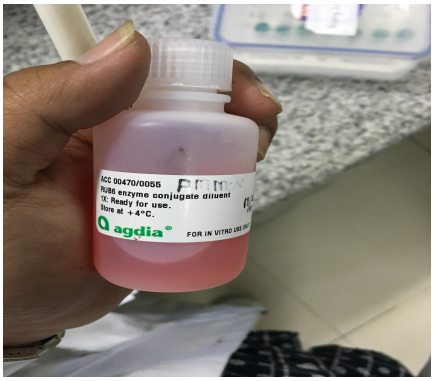
b. Antibodi PMMoV



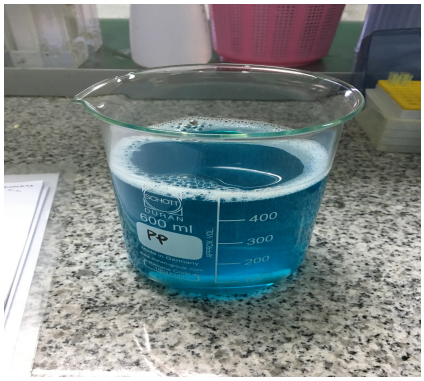
c.Enzyme conyugate PMMoV



d. Substrat (PNP Buffer)



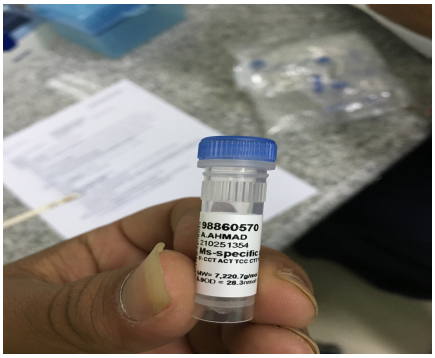
e. *Enzyme conyugate diluent*



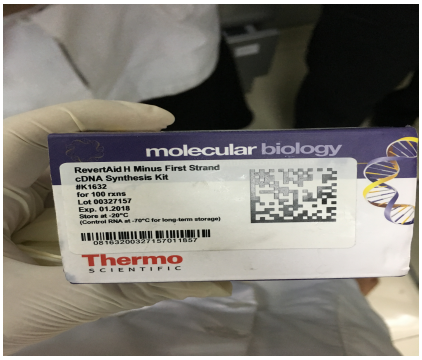
f. Larutan *general extract buffer* 3

g. *Coating buffer*

h. Pembacaan *elisa reader*



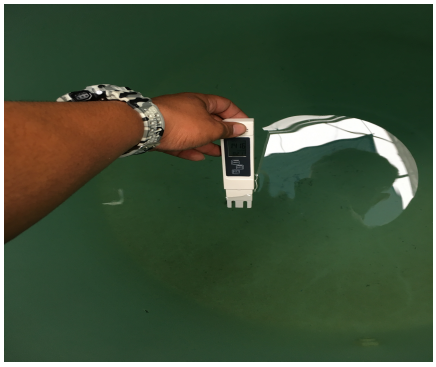
i. Primer spesifik PMMoV



j. Kit *reverse transciptase*

k. Perlakuan benih

l. Pengamatan gejala



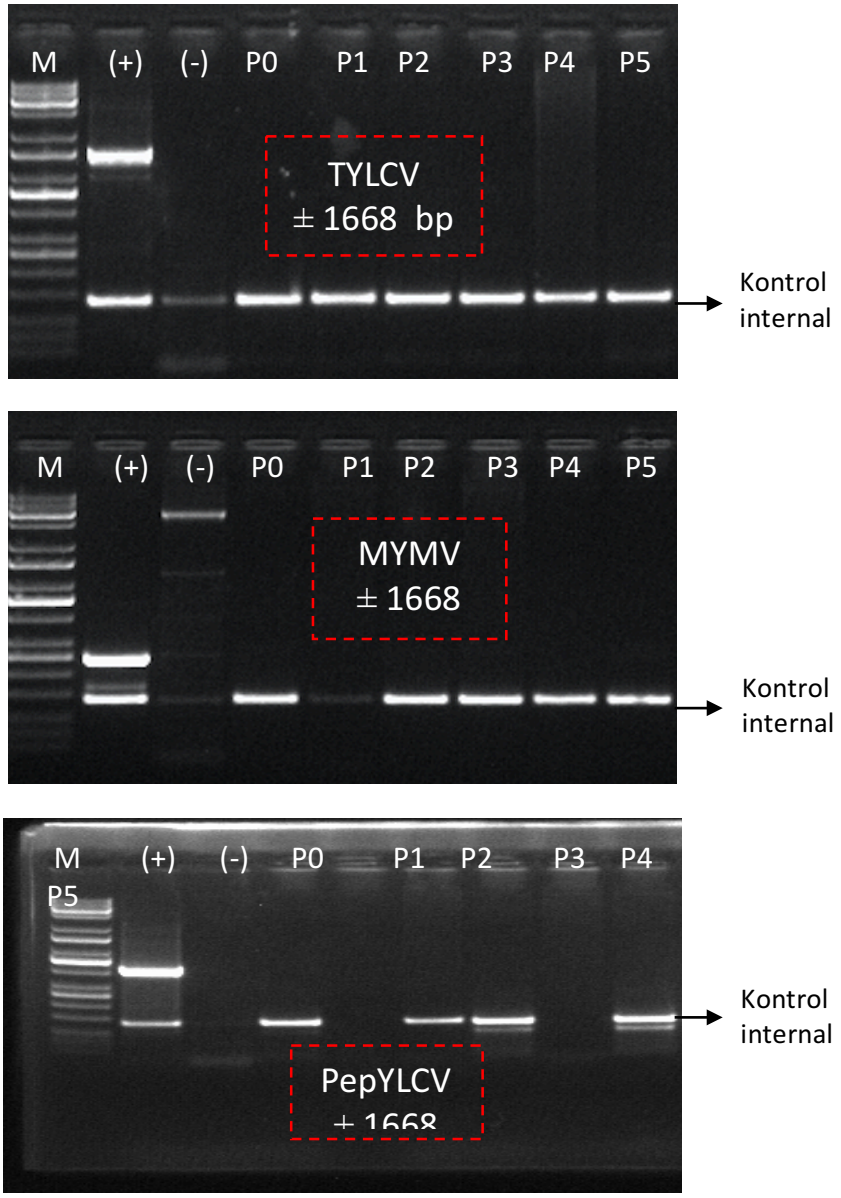
m. Pengukuran kadar EC

n. Pengambilan sampel

o.Nutrisi A

p. Nutrisi B

Lampiran 12. Deteksi PCR Pada Tanaman Uji Yang Bergejala Virus Menggunakan Primer Gemini Virus (Tomato Yellow Leafcurl Virus, Mungbean Yellow Mosaic Virus, Pepper Yellow Leaf Curl Virus).



Keterangan: (M) marker kappa DNA lader 1kb, (+) kontrol positif, (-) kontrol negatif (P0) kontrol tanpa perlakuan, (P1) *dry heat treatment* 50^0C selama 48 jam, (P2) perendaman dengan ekstrak minyak daun cengkeh 4% selama 20 menit, (P3) perendaman dengan ekstrak minyak bunga cengkeh 4% selama 20 menit, (P4) perendaman dengan TSP 9.6% selama 2 jam, (P5) perendaman dengan larutan HCL 0,25 N selama 30 menit.