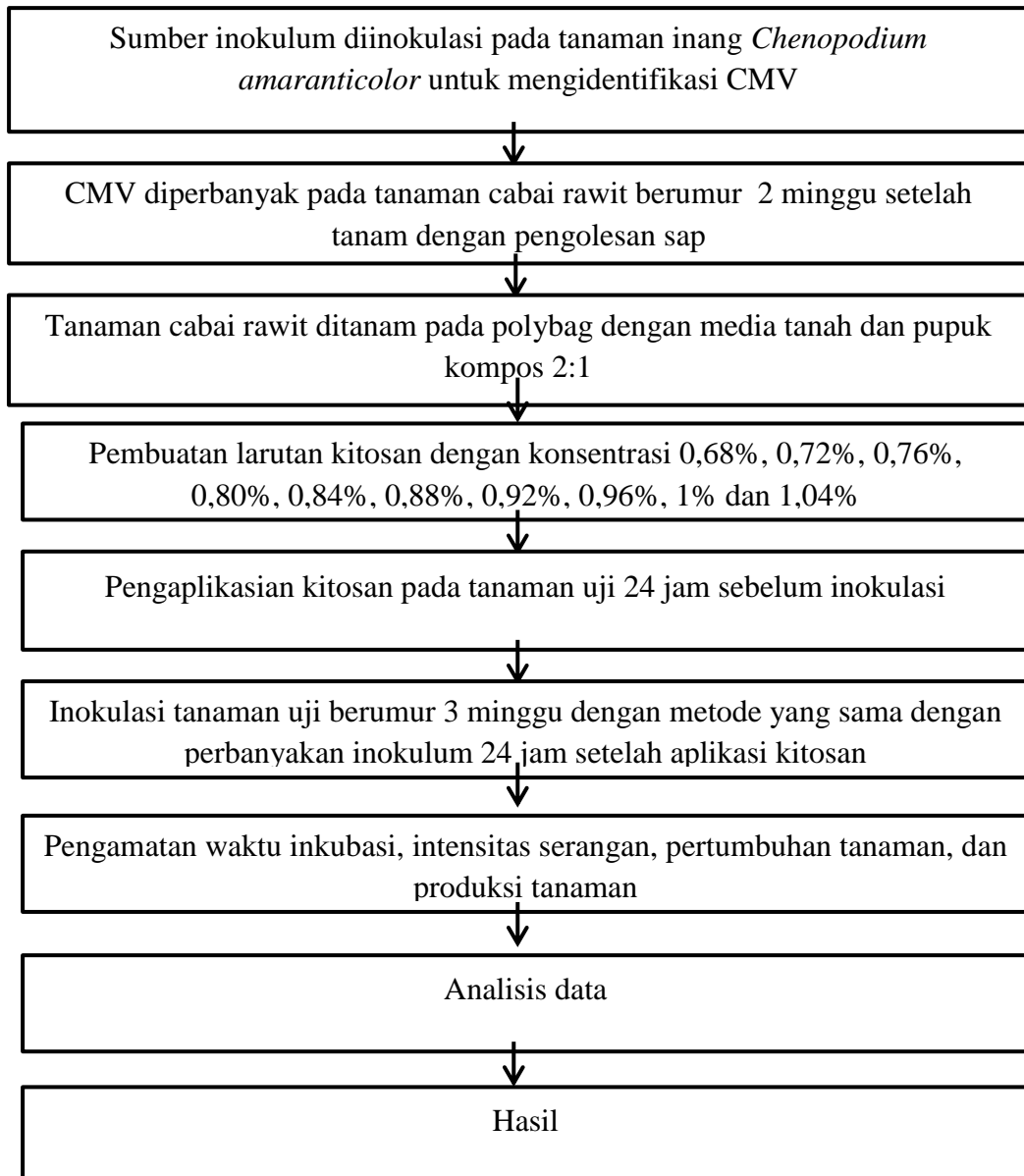


III. METODOLOGI

3.1 Kerangka Operasional

Kerangka operasional ditunjukkan sebagai langkah-langkah teknis yang digunakan dalam penelitian sehingga dalam pelaksanaannya dapat dilakukan secara sistematis dan bertahap (Gambar 4).



Gambar 3. Kerangka Operasional Penelitian

3.2 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Virologi dan Bakteriologi Penyakit Tumbuhan Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, dan Rumah Kaca Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya dimulai pada bulan Maret sampai dengan Agustus 2017.

3.3 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan selama penelitian yaitu mortar, pistil, polybag berukuran 35x35cm, timbangan digital, timbangan analitik, gembor, tissue, kapas, botol semprot, sprayer, gelas ukur (100 ml), cawan petri (9 cm), penggaris, plastik, sekop, oven, tabung Erlenmeyer (1 l), kertas label, gunting, pH meter, tabung reaksi, spektrofotometer, dan kamera.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain inokulum CMV yang diperoleh dari Desa Selorejo, Kecamatan Dau, Kabupaten Malang, Jawa Timur sebagai sumber inokulum, benih cabai rawit varietas Sonar, tanaman indikator *Chenopodium amaranticolor* dan *Gomphrena globosa*, saringan (kain kassa) steril, formalin 4%, aquades, karborundum 600 mesh, asam asetat 2%, buffer fosfat 0,01 M pH 7, alkohol 70%, kitosan Oligo saccharin dengan konsentrasi 2.0% yang diperoleh dari Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Pertanian Bogor, pupuk urea, KCl, TSP, NaOH 2% dan aseton 80%. Media tanam yang digunakan adalah tanah yang dicampur dengan kompos dengan perbandingan 2:1.

3.4 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan di rumah kaca menggunakan polybag berukuran 35cmx35 cm. Rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap dengan 12 perlakuan dan setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali, sehingga diperoleh 36 unit percobaan.

Faktor konsentrasi larutan kitosan

K1: konsentrasi kitosan 0,68 %

K2: konsentrasi kitosan 0,72 %

K3: konsentrasi kitosan 0,76 %

K4: konsentrasi kitosan 0,80 %

K5: konsentrasi kitosan 0,84 %

K6: konsentrasi kitosan 0,88 %

K7: konsentrasi kitosan 0,92 %

K8: konsentrasi kitosan 0,96 %

K9: konsentrasi kitosan 1 %

K10: konsentrasi kitosan 1,04 %

K-: tanpa perlakuan kitosan, tanaman diinokulasi virus

K+: tanpa inokulasi virus/tanaman sehat

3.5 Persiapan Penelitian

3.5.1 Persiapan inokulum dan identifikasi CMV

Inokulum CMV diperoleh dari Desa Selorejo, Kecamatan Dau, Kabupaten Malang, Jawa Timur yang digunakan sebagai petunjuk gejala mosaik berat, malformasi, serta perubahan bentuk pada tanaman uji dan tanaman indikator.

Sebelum inokulum digunakan pada penelitian, dilakukan perbanyakan dan identifikasi menggunakan tanaman indikator *Chenopodium amaranticolor* dan *Gomphrena globosa* L. Perbanyakan inokulum dan pengujian terhadap tanaman indikator dilakukan dengan pembuatan sap lalu ditularkan secara mekanik pada tanaman cabai rawit yang masih sehat dan pada tanaman indikator yang sudah disiapkan sebelumnya. Tanaman indikator merupakan tanaman yang sangat rentan terhadap virus tertentu dan menunjukkan gejala yang khas sehingga dapat dimanfaatkan sebagai metode untuk mendeteksi dan mengidentifikasi virus tertentu.

Setelah melewati masa inkubasi, akan muncul gejala pada tanaman cabai rawit, tanaman *C. amaranticolor* dan tanaman *G. globosa* yang akan diidentifikasi sesuai standar pada penelitian sebelumnya mengenai penyakit mosaik yang disebabkan oleh *Cucumber Mosaic Virus*, sehingga sumber inokulum dapat dipakai dalam proses penelitian.

3.5.2 Persiapan media tanam

Tanah yang digunakan dalam penelitian ini merupakan tanah yang telah disterilkan menggunakan cairan formalin 4%. Teknik yang digunakan untuk memperoleh tanah steril yaitu dengan mencampurkan tanah dengan formalin lalu tanah dibolak-balik menggunakan sekop hingga tanah dan formalin tercampur rata. Setelah tanah tercampur rata tanah disungkup menggunakan plastik agar formalin masuk kedalam pori-pori tanah. Setiap dua hari sekali selama 7 hari tanah kembali dibolak-balik bertujuan agar formalin merata keseluruhan tanah. Plastik dibuka setelah penyungkupan selama 7 hari dan dikeringanginkan selama 3 hari sampai tidak tercium bau formalin.

Tanah yang telah steril dicampur dengan pupuk kompos dengan perbandingan 2:1 lalu dimasukkan kedalam polybag.

3.5.3 Persiapan benih tanaman uji

Tanaman cabai rawit yang digunakan adalah varietas Sonar. Sebelum dilakukan penyemaian dilakukan penyortiran sebelum penyemaian benih. Hal ini bertujuan untuk pemilihan benih yang tidak berkeriput, tidak cacat, fisiknya utuh ataupun terdapat luka. Perlakuan pada benih yaitu dengan merendam benih pada air bersuhu 40° C untuk menghentikan masa dormansi benih.

Persemaian dilakukan pada polybag berukuran kecil. Polybag diisi dengan tanah steril lalu benih ditaburkan diatas polybag. Benih disiram dan diletakkan di tempat yang tidak terkena sinar matahari langsung. Setelah bibit berumur tiga minggu dan tinggi bibit mencapai 12-15 cm bibit dipindahkan ke polybag yang berukuran lebih besar.

3.6 Pelaksanaan Penelitian

3.6.1 Pemupukan

Pupuk yang digunakan ialah pupuk kompos yang berasal dari kotoran sapi, pupuk urea, KCl, dan TSP. Penambahan pupuk kompos diberikan pada saat awal tanam yaitu pada saat persiapan media tanam karena pupuk kompos dicampur dengan tanah steril. Pupuk kompos dan tanah steril yang telah tercampur merata dengan perbandingan 2:1 dimasukkan kedalam polybag berukuran 5 kg (25cmx30cm) lalu diberi label sesuai perlakuan dan ulangan. Untuk pupuk urea, KCl, dan TSP diberikan sesuai dosis rekomendasi yaitu 150 kg/Ha urea atau 3,75 g/tanaman, 100 kg/Ha TSP atau 2,5 g/tanaman dan 100 kg/Ha KCl atau 2,5 g/tanaman. Pupuk TSP dan KCl diberikan satu hari sebelum tanam, sedangkan urea diberikan dengan dua tahap, yaitu pada saat tanaman berumur 14 hari dan 28 hari.

3.6.2 Penanaman benih tanaman uji

Benih hasil persemaian ditanam kedalam polybag berukuran 5 kg dan setiap lubang tanam diisi dengan satu benih. Pencabutan bibit dari polybag kecil dilakukan secara perlahan untuk meminimalisir terjadinya kerusakan pada bibit seperti patahnya akar atau batang tanaman cabai rawit.

3.6.3 Pembuatan Larutan Kitosan

Kitosan Oligo saccharin (BM \leq 3kDa) dengan konsentrasi 2.0% diperoleh dari Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Pertanian Bogor. Konsentrasi larutan kitosan yang digunakan dalam larutan ini yaitu 0,68%, 0,72%, 0,76%, 0,80%, 0,84%, 0,88%, 0,92%, 0,96%, 1% dan 1,04% yang diperoleh dengan cara mengencerkan

kitosan dengan asam asetat konsentrasi 2% dan aquades. Untuk memperoleh larutan kitosan misal dengan konsentrasi 0,68% yaitu dengan mencampurkan 10 g kitosan dengan 20 ml asam asetat lalu dilakukan penambahan aquades untuk memperoleh pengenceran dengan volume akhir larutan 1000 ml. Larutan kitosan dimasukkan ke dalam botol sprayer dan diaplikasikan 24 jam sebelum inokulasi CMV dengan cara foliar pada daun cabai (gambar lampiran 1).

3.7.2 Pembuatan SAP untuk Inokulum CMV

Sebelum membuat sap tangan dan meja kerja disemprot menggunakan alkohol 70% bertujuan menciptakan kondisi yang steril. Daun cabai yang terinfeksi CMV diperoleh dari Desa Selorejo, Kecamatan Dau, Kabupaten Malang, Jawa Timur dibersihkan menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran setelah itu daun dipotong dan dipisahkan dari tulang daunnya dan ditimbang sebanyak 5 g.

Setelah daun ditimbang, daun digerus menggunakan mortar dengan tujuan untuk memecah sel yang membantu keluarnya virus menjadi sumber inokulum atau sap. Selanjutnya diberi buffer fosfat 0,01 M pH 7 sebanyak 10 ml yang berfungsi untuk menstabilkan virus yang didapat. Lalu digerus lagi dan disaring menggunakan kain kassa steril untuk memisahkan ampas daun dengan cairan perasan.

3.7.3 Penularan CMV pada tanaman cabai

Untuk melakukan penularan CMV pada tanaman cabai yaitu dengan menyiapkan tanaman cabai rawit yang telah berumur 3 minggu setelah tanam lalu dilukai dengan karborundum 600 untuk pelukaan minor pada tanaman. Pemberian karborundum ini bertujuan untuk menambah abrasif, yaitu berperan menimbulkan luka mikroskopis pada dinding sel permukaan pada bagian tanaman yang diinokulasi (Hadiastono, 2010) kemudian tanaman cabai rawit diinokulasi dengan suspensi CMV dengan mengoleskan sap secara perlahan ke daun yang telah dilukai. Lalu daun dibilas menggunakan air mengalir setelah 10 menit untuk menghilangkan sisa karborundum yang ada pada daun.

3.7.4 Pemeliharaan tanaman

Pemeliharaan tanaman meliputi penyiraman, penyiangan gulma serta pengendalian hama penyakit lain. Untuk mengendalikan gulma dilakukan secara mekanik yaitu dengan mencabut langsung gulma yang ada di polybag. Sedangkan untuk pengendalian hama dan penyakit yang menyerang yaitu

dengan cara langsung mengambil hama dan penyakit yang ada lalu memusnahkannya.

3.8 Parameter Pengamatan

Parameter pengamatan meliputi masa inkubasi dan intensitas serangan, total klorofil, panjang tanaman, jumlah daun, jumlah buah dan bobot buah.

3.8.1 masa inkubasi

pengamatan masa inkubasi virus dilakukan setiap hari sejak hari pertama setelah diinokulasi CMV sampai muncul gejala pertama meliputi perubahan warna dan bentuk daun yang telah diinokulas CMV.

3.8.2 Intensitas Serangan

Menurut Abadi (2003), untuk perhitungan intensitas serangan dapat dihitung menggunakan rumus:

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

Keterangan:

I = Intensitas serangan

n = Jumlah Daun tiap kategori serangan

v = Skala serangan

N = Jumlah daun yang diamati

Z = Skala kategori serangan tertinggi

Skor intensitas serangan

0 = Daun sehat

1 = gejala mosaik 50% dari luas daun

2 = gejala mosaik 50% dari luas daun

3 = gejala mosaik, ukuran daun mengecil

4 = gejala mosaik, ukuran daun mengecil dan berkerut

5 = gejala mosaik, ukuran daun mengecil, berkerut serta daun menggulung ke bawah

3.8.3 Analisis Kadar Klorofil

Kandungan klorofil total diukur menggunakan metode spektrofotometri. Daun tanaman cabai rawit diambil beratnya sebanyak 1 g. Sampel daun sebanyak 1 g digerus dengan mortar kemudian diekstraksi dengan 100 mL aseton 80% diaduk hingga klorofil daun larut. Hasil ekstrak disaring menggunakan kertas saring whatman. Filtrat yang telah diperoleh diletakkan dalam cuvet untuk diukur kandungan klorofilnya dengan alat bernama

spektrofotometer (gambar lampiran 2) pada panjang gelombang 645 dan 663 nm (Harborne, 1987 dalam Peni *et al.*, 2004).

Berikut rumus yang dapat digunakan untuk perhitungan analisis kadar klorofil menurut Hendry dan Grime (1993) adalah:

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

3.8.4 Pertumbuhan tanaman

Pengamatan terhadap pertumbuhan tanaman meliputi tinggi tanaman dan jumlah daun.

1. Tinggi tanaman

Pengamatan tinggi tanaman yaitu dengan mengukur tinggi tanaman cabai dimulai dari pangkal batang hingga ke ujung titik pertumbuhan tanaman. Pengukuran ini dilakukan menggunakan alat penggaris (satuan ukuran cm). Pengukuran dilakukan seminggu sekali setelah inokulasi virus.

2. Jumlah daun

Pengamatan jumlah daun dilakukan setiap seminggu sekali dengan menghitung helai daun yang terbuka sempurna.

3.8.5 Pengamatan Produksi Tanaman

Pengamatan terhadap produksi tanaman meliputi jumlah buah per tanaman dan bobot buah per tanaman.

- i. Jumlah buah per tanaman

Jumlah buah diketahui setelah dilakukan panen. Untuk data analisa diperoleh dengan menjumlahkan seluruh buah yang di panen.

- ii. Bobot buah per tanaman

Bobot buah pertanaman dilakukan setelah panen. Bobot buah ditimbang dengan satuan ukuran gram.

3.9 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh pemberian konsentrasi larutan kitosan dilakukan analisis data. Analisis data dilakukan untuk mengetahui adakah pengaruh nyata antar perlakuan dengan menggunakan uji F taraf 5%. Apabila berpengaruh nyata maka dilanjutkan dengan uji beda nyata jujur (BNJ) dengan taraf kesalahan 5% untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.