

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Lapangan Terpadu Fakultas Pertanian, Universitas Lampung dari bulan September 2013 sampai dengan Januari 2014, sedangkan perbanyakan virus juga akan dilakukan di Laboratorium Lapangan Terpadu Fakultas Pertanian. Pengamatan kemudian dilanjutkan di Laboratorium Benih dan Pemuliaan Tanaman Universitas Lampung.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan yaitu alkohol 70%, zeolit, air, Furadan 3G, fungisida berbahan aktif *mancozeb* 80%, insektisida berbahan aktif *delhtametrin* 25 g/l aquades, buffer fosfat, Urea 50 kg/ha, SP 36 100 kg/ha, KCl 100 kg/ha dan pupuk kandang 10 ton/ha. Benih yang digunakan yaitu 100 butir dari satu populasi F₂ hasil persilangan Tanggamus dan B₃₅₇₀ genotipe nomor satu dan 20 tetua kedelai yang terdiri atas varietas Tanggamus dan B₃₅₇₀.

Alat yang digunakan yaitu mortal, korek api, alu, *hand sprayer*, mistar, gunting, benang, kamera, cangkul, sabit, koret, golok, *knapsack sprayer*, *polybag*, *cotton bud*, kertas label, botol aqua, gelas ukur, timbangan analitik, cangkul, patok, meteran, sabit, jaring, bambu, gembor, kantung, tali rafia, dan alat tulis.

Tanggamus dan B₃₅₇₀ merupakan hasil persilangan dengan metode dialel setengah yang dilakukan oleh Maimun Barmawi dengan menggunakan lima tetua yaitu B₃₅₇₀, Tanggamus, Orba, Taichung, dan Yellow Bean yang kemudian penelitian tersebut dilanjutkan oleh Putri dan Jamil (2013) untuk mengetahui tingkat ketahanan populasi F₁ terhadap infeksi *soybean mosaic virus*. Dari 10 kombinasi persilangan, dipilih satu kombinasi persilangan Tanggamus dan B₃₅₇₀ dengan genotipe nomor satu. Persilangan ini memiliki persentase keparahan penyakit rendah sebesar 22,5%, jumlah biji sehat sebanyak 778 butir, dan jumlah biji sakit 83 butir. Selanjutnya dari total keseluruhan biji, diambil 100 butir biji secara acak. Pada generasi F₂ rancangan percobaan yang digunakan tanpa ulangan karena benih yang digunakan adalah benih F₂ yang masih mengalami segregasi (Baihaki, 2000) dan benih belum homozigot secara genetik.

3.3 Metode Penelitian

Untuk menjawab pertanyaan dalam perumusan masalah dan untuk menguji hipotesis maka rancangan perlakuan yang digunakan yaitu rancangan perlakuan tunggal terstruktur bersarang, sedangkan rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan percobaan tanpa ulangan. Dalam penelitian ini seluruh tanaman yang diuji diamati.

3.4 Analisis Data

Menurut Suharsono *et al.* (2006), ragam fenotipe (σ_f^2) ditentukan dengan rumus:

$$\sigma_f^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \mu)^2}{N}$$

Keterangan:

- σ_f^2 = ragam fenotipe
- X_i = nilai pengamatan tanaman ke -i
- μ = nilai tengah populasi
- N = jumlah tanaman yang diamati

Ragam lingkungan (σ_e^2) ditentukan dengan rumus:

$$\sigma_e^2 = \frac{n_1 \sigma_{p1} + n_2 \sigma_{p2}}{n_1 + n_2}$$

Keterangan:

- σ_{p1} = simpangan baku tetua 1
- σ_{p2} = simpangan baku tetua 2
- n_1+n_2 = jumlah tanaman tetua

Populasi tetua secara genetik adalah seragam sehingga ragam genotipe nol. Oleh karena itu, ragam fenotipe yang diamati pada populasi tetua sama dengan ragam lingkungan. Tetua dan populasi keturunannya ditanam pada lingkungan yang sama, sehingga ragam lingkungan tetua sama dengan ragam lingkungan populasi keturunan.

Dengan demikian ragam genetik (σ_g^2) dapat dihitung dengan rumus:

$$\sigma_g^2 = \sigma_p^2 - \sigma_e^2$$

Keterangan :

- σ_p^2 = ragam fenotipe
- σ_e^2 = ragam lingkungan

Menurut Anderson dan Bancroft, 1952 dikutip Wahdah 1996, ragam fenotipe dikatakan luas apabila ragam fenotipe lebih besar dua kali standar deviasi, sedangkan ragam fenotipe dikatakan sempit apabila ragam fenotipe lebih kecil dua kali standar deviasi.

Berdasarkan kriteria keragaman tersebut, untuk menghitung ragam lingkungan maka diperlukan rumus penghitungan simpangan baku ($\sqrt{\sigma^2}$), berdasarkan Walpole (1992) yaitu sebagai berikut:

$$\sqrt{\sigma^2} = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (\mathbf{X}_i - \mu)^2}}{N}$$

Keterangan:

- $\sqrt{\sigma^2}$ = simpangan baku
 X_i = nilai pengamatan ke -i
 μ = nilai tengah populasi
 N = jumlah tanaman yang diamati

Menurut Suharsono *et al.*, 2006, pendugaan heritabilitas dalam arti luas (H_L) dengan menggunakan rumus:

$$H_L = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_f^2}$$

Keterangan :

- H_L = heritabilitas arti luas
 σ_g^2 = ragam genotipe
 σ_f^2 = ragam fenotipe

Penduga nilai heritabilitas menurut Mendez-Natera *et al.*, 2012 yaitu

1. Heritabilitas tinggi apabila $H \geq 0,5$
2. Heritabilitas sedang apabila $0,2 < H < 0,5$
3. Heritabilitas rendah apabila $H \leq 0,2$

Menurut Suharsono *et al.* (2006), nilai duga kemajuan seleksi dapat dihitung berdasarkan rumus:

$$R = i \sigma_x H_L$$

Keterangan:

R = Respons terhadap seleksi

i = Intensitas seleksi yang diterapkan

H_L = Pendugaan heritabilitas dalam arti luas suatu karakter

σ_x = Simpangan baku suatu karakter

Intensitas seleksi yang diterapkan yaitu sebesar 20%, sehingga nilai i yang digunakan yaitu 1,40.

Tabel 1. Nilai intensitas seleksi (i) pada kemajuan genetik

Terpilih(%)	Nilai i	Terpilih (%)	Nilai i
5	2,06	40	0,97
10	1,76	50	0,80
15	1,55	60	0,64
20	1,40	70	0,50
25	1,27	80	0,35
30	1,66	90	0,20

$$\text{KGH (\%)} = \frac{R}{\text{Nilai tengah}} \times 100\%$$

Kriteria nilai duga kemajuan genetik harapan berdasarkan Begun dan Sobhan (1991) dikutip Hadiati *et al.* (2003) adalah

- a. Tinggi apabila nilai $\text{KGH} > 14\%$;
- b. Sedang apabila nilai $7\% \leq \text{KGH} \leq 14\%$
- c. Rendah apabila $\text{KGH} < 7\%$

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1. Pembuatan larutan buffer fosfat

Bahan pembuatan larutan buffer fosfat terdiri atas KH_2PO_4 (larutan A: 1,36 g), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (larutan B: 1,78 g) dan akuades sebanyak dua liter. Alat yang digunakan adalah timbangan elektrik, dua buah gelas ukur berukuran 1000 ml dan satu buah berukuran 500 ml, pengaduk, dan botol berukuran dua liter. Pembuatan buffer fosfat dapat dilakukan dengan menimbang 1,36 g KH_2PO_4 dan 1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Pembuatan larutan A dilakukan dengan menimbang 1,36 g KH_2PO_4 dan dilarutkan ke dalam satu liter akuades. Pembuatan larutan B dilakukan dengan menimbang 1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, kemudian dilarutkan ke dalam satu liter akuades. Satu liter buffer fosfat diperoleh dengan cara mencampur 510 ml larutan A dan 490 ml larutan B, kemudian dimasukkan ke dalam botol dan ditutup rapat.

3.5.2. Perbanyakan inokulum soybean mosaic virus

Benih kedelai yang digunakan untuk perbanyakan SMV yaitu benih varietas Orba karena merupakan benih yang rentan terhadap infeksi virus. Kegiatan pertama yang dilakukan untuk perbanyakan inokulum SMV yaitu pembuatan sap/ekstrak daun. Sap dibuat dengan cara menggerus daun kedelai yang telah terinfeksi sebanyak 5 g dengan menggunakan mortal dan alu yang diencerkan dengan buffer fosfat pH 7 sebanyak 5 ml. Inokulasi secara mekanik (*mechanical inoculation*) dilakukan sesuai dengan prosedur Akin (2006) yaitu setelah daun berjumlah lebih dari 4 helai atau berumur 10 hari. Langkah pertama yaitu taburkan zeolit ke bagian permukaan daun. Zeolit ini berfungsi sebagai agen abrasi agar permukaan

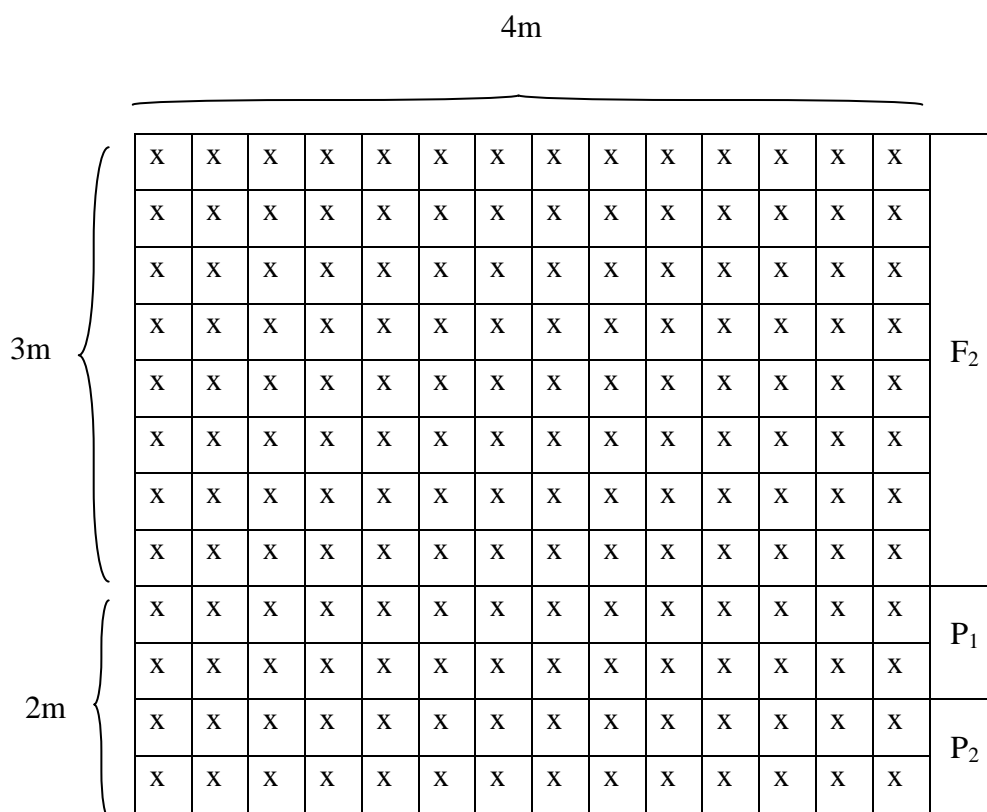
daun mengalami luka mikro (*sublethal wounding or abrasi*) sehingga virus dapat masuk. Kemudian sap (ekstrak daun) dioleskan pada permukaan daun tanaman dengan menggunakan *cotton bud*. Setelah sap dioleskan, dilakukan pencucian menggunakan aquades dengan cara disemprot menggunakan *hand sprayer*.

3.5.3. *Persiapan lahan*

Lahan diolah dengan menggunakan cangkul sedalam 20—25 cm. Tujuan pengolahan lahan yaitu untuk memperbaiki sifat fisik tanah dan untuk membersihkan gulma. Kemudian tanah tersebut dicampur dengan pupuk kandang dengan dosis 10 ton/ha secara merata untuk meningkatkan kesuburan tanah.

3.5.4. *Penanaman*

Penelitian ini dilakukan dengan menanam 100 benih F₂ hasil persilangan Tanggamus dan B₃₅₇₀ pada petak percobaan berukuran 3 m x 4 m. Benih tersebut ditanam pada petak percobaan dengan jarak tanam 20 cm x 50 cm. Jarak antarbaris 50 cm dan jarak tanam dalam baris 20 cm. Pada setiap baris ditanam 15 benih yang sama yang dipilih secara acak, sedangkan tetua ditanam pada baris terluar. Tata letak penanaman kedelai F₂ hasil persilangan Tanggamus dan B₃₅₇₀ dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Tata letak penanaman benih kedelai hasil persilangan Tanggamus x B₃₅₇₀ dan kedua tetuanya.

Keterangan:

P1 = Tetua Tanggamus

P2 = Tetua B₃₅₇₀

F2 = Persilangan Tanggamus x B₃₅₇₀

3.5.5. Pemupukan

Pemupukan dilakukan dua kali yaitu pada awal tanam dan pada fase generatif.

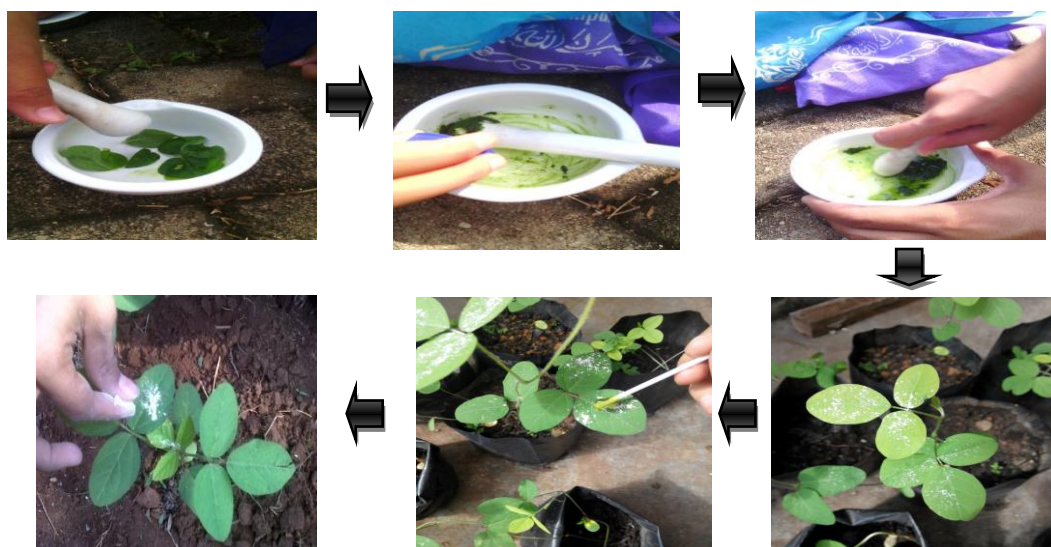
Pupuk yang diaplikasikan yaitu KCl 100 kg/ha, SP-36 100 kg/ha, dan Urea 50

kg/ha. Pupuk diaplikasikan dengan jarak 5 cm dari lubang tanam tanaman

kedelai.

3.5.6. *Inokulasi soybean mosaic virus di lapangan*

Tanaman kedelai yang sudah memiliki daun terbuka sempurna (7—10 HST) dapat diinokulasi dengan sap SMV yang sebelumnya telah ditaburi zeolit. Setelah daun diinokulasi, daun tersebut dicuci kembali dengan aquades secukupnya menggunakan *hand sprayer*. Tahapan inokulasi *soybean mosaic virus* di lapangan dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Tahap-tahap inokulasi *soybean mosaic virus* di lapangan.

3.5.7 *Pelabelan*

Setiap tanaman yang telah diinokulasi masing-masing diberi label seperti waktu penanaman dan tanggal inokulasi untuk mempermudah dalam pengamatan.

3.5.8 *Perawatan dan pemeliharaan tanaman*

Perawatan dan pemeliharaan tanaman meliputi penyulaman tanaman yang mati, penyiangan gulma, penyiraman, pengendalian hama dan penyakit, perbaikan label dan paranet yang rusak. Penyiangan gulma dilakukan secara mekanis yaitu

menggunakan koret. Penyemprotan dengan insektisida dan fungisida dilakukan sesuai dengan kebutuhan. Insektisida yang digunakan yaitu *Decis* (Delmetrin) dan fungisida yang digunakan yaitu *Dithane* (Mankozeb). Penyiraman dilakukan setiap hari pada sore hari dengan menggunakan gembor dan selang.

3.5.9 Pemanenan

Ciri-ciri umum tanaman kedelai yang siap panen yaitu polong berwarna kuning kecoklatan secara merata dan matang serta adanya degradasi klorofil pada daun tanaman yang menyebabkan daun tanaman kedelai menguning. Pemanenan dilakukan dengan memanen tanaman kedelai secara utuh dengan mencabut satu per satu tanaman, kemudian dimasukkan ke dalam kantong panen yang telah diberi label.

3.5.10 Pengamatan

Pengamatan yang dilakukan pada penelitian ini terdiri atas pengamatan sebelum panen dan pengamatan setelah panen. Pengamatan sebelum panen meliputi:

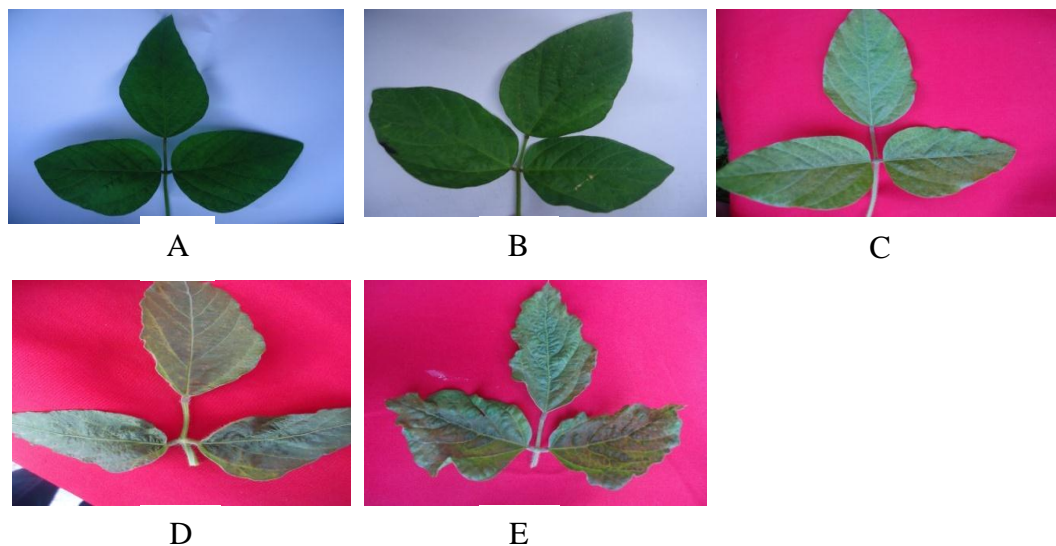
1. Periode inkubasi, dihitung dari waktu inokulasi sampai dengan timbulnya gejala (Mulia, 2008).
2. Keparahan penyakit, diamati minggu ke enam setelah tanam dan dilakukan terhadap 10 daun tanaman *trifoliolate*, serta dihitung menurut Campbell dan Madden yang dikutip Mulia (2008). Pengamatan dilakukan pada 10 daun *trifoliolate* pada batang utama. Hal ini dilakukan karena 6 MST dianggap dapat mewakili seluruh daun di batang utama tanaman kedelai.

$$KP = \frac{\sum (ix^2)}{N \times Z} \times 100\%$$

Keterangan:

- KP =Keparahan penyakit
 n =Jumlah sampel yang diamati
 Z =Nilai skor tertinggi
 N =Jumlah sampel untuk kategori serangan
 V =Nilai skor untuk kategori serangan

Menurut Akin (2006), gejala serangan setiap jenis virus yang muncul memiliki rincian sebagai berikut:



Gambar 3. Skor gejala penyakit

Keterangan:

Tidak bergejala = 0 (A), klorosis dan tulang daun memucat = 1 (B), mosaik dengan klorosis pada tulang daun dan permukaan daun = 2 (C), mosaik berat, klorosis dan terjadi pembengkokan pada permukaan daun, daun melengkung ke bawah atau ke atas = 3 (D), dan malformasi daun = 4 (E).

Kategori keparahan penyakit (%):

1—10	= Sangat tahan
11—25	= Tahan
26—35	= Agak tahan
36—50	= Agak rentan
51—75	= Rentan
76—100	= Sangat rentan

Pengamatan yang dilakukan setelah panen meliputi:

1. Tinggi tanaman, diukur dari pangkal batang sampai titik tumbuh tanaman.
Pengukuran dilakukan setelah panen dalam satuan cm;
2. Jumlah cabang produktif, dihitung berdasarkan jumlah cabang yang dapat menghasilkan polong;
3. Total jumlah polong, dihitung berdasarkan jumlah polong yang muncul pada setiap tanaman;
4. Jumlah polong bernas, dihitung berdasarkan jumlah polong bernas per tanaman;
5. Jumlah polong hampa, dihitung berdasarkan jumlah polong hampa per tanaman;
6. Total jumlah biji, dihitung berdasarkan jumlah biji per tanaman;
7. Persentase biji sehat, (jumlah biji sehat : total biji) x 100%;
8. Persentase biji sakit, (jumlah biji sakit : total biji) x 100%;
9. Bobot 10 butir biji sehat per tanaman, diamati setelah dikeringanginkan sekitar 3 minggu setelah panen (g) sampai bobot konstan;
10. Bobot biji per tanaman, dengan cara menimbang biji setiap tanaman;
11. Umur berbunga, dihitung sejak tanam sampai munculnya bunga;
12. Umur panen, dihitung sejak tanam sampai tanaman siap untuk dipanen.