

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Kebun Percobaan Fakultas Pertanian, Universitas Lampung dari bulan September 2013 sampai dengan Januari 2014, sedangkan perbanyakan virus dilakukan di Kampung Baru, Bandar Lampung. Pengamatan kemudian dilanjutkan di Laboratorium Benih dan Pemuliaan Tanaman Universitas Lampung.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan- bahan yang digunakan dalam penelitian ini 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, SP36 100 kg/ha, KCl 100 kg/ha dan pupuk organik (kompos) 10 g/tanaman dan pupuk kandang 10 ton/ha. Benih yang digunakan yaitu 100 benih tanaman dari 1 populasi F₂ hasil persilangan Tanggamus x Taichung dengan nomor genotipe 5, hasil pemuliaan Ria Putri dan Risa Jamil dan 20 tetua kedelai yang terdiri atas Varietas Tanggamus dan Taichung. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mortal, alu, *hand sprayer*, mistar, gunting, sungkup, cangkul, sabit, koret, golok, *knapsack sprayer*, polybag, *cotton bud*, botol aqua, gelas ukur, timbangan analitik, sabit, jaring, bambu, gembor, kantung, dan tali rafia

3.3 Metode Penelitian

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

3.4 Analisis Data

3.4.1 Analisis segregasi karakter agronomi tanaman kedelai

Karakter agronomi setiap tanaman dari populasi F_2 dikelompokkan ke dalam fenotipe/kelas tertentu dan jumlahnya dihitung. Uji yang digunakan dalam analisis segregasi kesesuaian distribusi normal karakter agronomi tanaman kedelai dari populasi F_2 yaitu uji khi-kuadrat.

Uji khi-kuadrat digunakan untuk menguji kesesuaian antara nilai pengamatan dan nilai harapan (Gomez dan Gomez, 1984) yang dinyatakan sebagai berikut.

1. Banyaknya data pengamatan (n) dinyatakan ke dalam tabel frekuensi.

Kemudian ditentukan wilayah data sebagai perbedaan antara pengamatan terbesar dan terkecil, dan wilayah tersebut dibagi ke dalam kelas (p). Untuk setiap kelas, ditentukan nilai kelas (titik tengah wilayah kelas) dengan membuat rata-rata dari nilai batas terendah dan tertinggi

2. Dari tabel frekuensi yang telah dibuat, dihitung rata-rata (\bar{X}) dan ragam (s^2) sebagai berikut:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^p (f_i)(X_i)}{\sum_{i=1}^p f_i}$$

$$s^2 = \frac{1}{\sum_{i=1}^p f_i - 1} \left\{ \sum_{i=1}^p (f_i)(X_i^2) - \frac{\left[\sum_{i=1}^p (f_i)(X_i) \right]^2}{\sum_{i=1}^p f_i} \right\}$$

Keterangan : X_i = nilai kelas ke- i

f_i = frekuensi kelas ke- i

p = banyaknya kelas

3. Frekuensi harapan dari setiap kelas dihitung berdasarkan hipotesis sebaran peluangnya.

- Untuk setiap kelas, dihitung nilai Z baku, satu untuk batas terendah (Z_l) dan lainnya batas tertinggi (Z_h)

$$Z_l = \frac{L_l - \bar{X}}{s} \quad \text{dan} \quad Z_h = \frac{L_h - \bar{X}}{s}$$

Keterangan : L_l = batas kelas terendah;

L_h = batas kelas tertinggi

- Peluang setiap selang kelas ditentukan berdasarkan hipotesis sebaran peluang sebagai berikut:

$$P = P(Z_l < X < Z_h)$$

$P = P(Z_l < X < Z_h)$ menunjukkan peluang bahwa X berada di antara Z_l

dan Z_h

- Frekuensi harapan untuk kelas ke- i (F_i) dihitung sebagai hasil kali peluang kelas ke- i (P_i) yang ditentukan pada langkah sebelumnya dan banyaknya pengamatan (n):

$$F_i = (n)(P_i)$$

4. Rumus χ^2 -hitung sebagai berikut:

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (f_i - F_i)^2}{F_i}$$

Keterangan : f_i = frekuensi pengamatan

F_i = frekuensi harapan bagi kelas ke- i

5. Nilai hitung χ^2 dibandingkan dengan nilai tabel χ^2 dengan derajat kebebasan ($p-3$), dan hipotesis sebaran peluang ditolak apabila nilai hitung χ^2 melebihi nilai tabel χ^2 pada taraf nyata 0,01.

Hipotesis pertama (H_0) menduga bahwa uji kesesuaian distribusi normal karakter agronomi tanaman kedelai dan gen ketahanan terhadap SMV generasi F_2 hasil persilangan Tanggamus x Taichung berdistribusi normal sesuai dengan nisbah Mendel atau modifikasinya; dengan demikian H_0 diterima bila $X^2_{hitung} < X^2_{tabel}$. Sebaliknya, H_0 ditolak jika $X^2_{hitung} > X^2_{tabel}$.

3.4.2 Uji signifikansi untuk berbagai nisbah teoretis generasi F_2

Kesesuaian pola segregasi dari masing-masing karakter dengan tipe segregasi yang diharapkan diuji dengan χ^2 untuk *goodness of fit*.

a. Dua kelas

$$\chi^2 = \sum_{j=1}^c \frac{(O_j - E_j)^2}{E_j}$$

b. Lebih dari dua kelas

$$\chi^2 = \sum_{j=1}^c \frac{(O_j - E_j)^2}{E_j}$$

Keterangan:

O_j = nilai pengamatan dalam kelas ke-j

E_j = nilai harapan dalam kelas ke-j

j = 1, 2, 3, ... c

Pewarisan gen yang mengendalikan karakter yang memiliki nisbah kesesuaian antara nilai pengamatan dan harapan, dianggap sebagai jumlah gen yang mengendalikan karakter yang diamati.

Misalkan gen pengendali bersifat sederhana, maka populasi F_2 akan dicocokkan terhadap beberapa nisbah, tergantung dari bentuk grafik yang diperoleh (Snyder dan David, 1957 dikutip oleh Barmawi, 1998), sebagai berikut:

1. Jika grafik penyebaran populasi F_2 menunjukkan dua puncak, kemungkinan nisbah yang terjadi adalah 3:1 (satu gen dominan penuh), 9:7 (dua gen epistatis resesif duplikat), 13:3 (dua gen epistatis dominan resesif), atau 15:1 (dua gen dominan duplikat).
2. Jika grafik penyebaran populasi F_2 menunjukkan tiga puncak, kemungkinan nisbah yang terjadi adalah 1:2:1 (satu gen dominan tidak sempurna), 9:3:4

(dua gen epistasis resesif), 9:6:1 (dua gen duplikat dengan efek kumulatif) dan 12:3:1 (dua gen epistasis dominan).

3. Jika grafik penyebaran populasi F_2 menunjukkan lebih dari tiga puncak, kemungkinan nisbah yang terjadi adalah 9:3:3:1 (dua gen dominan penuh) atau 6:3:3:4 (satu pasang gen dominan sempurna dan satu pasang gen dominan sebagian) ;apabila salah satu pasang gen homozigos resesif, pasangan gen yang satu akan epistasis terhadap gen lainnya, sedangkan bila kedua gen homozigos resesif, pasangan gen yang kedua epistasis terhadap pasangan gen yang pertama.
4. Jika grafik penyebaran populasi F_2 menunjukkan satu puncak dan distribusinya menyebar normal, karena itu karakter ditelaah dikendalikan oleh banyak gen. Uji normalitas menggunakan uji Khi-kuadrat (Gomez dan Gomez, 1984).

3.5. Pelaksanaan Penelitian

3.5.1. Pembuatan larutan bufer fosfat

Bahan pembuatan larutan bufer 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 berukuran 1000 ml dan satu buah berukuran 500 ml, pengaduk, dan botol berukuran 2 liter. Pembuatan bufer fosfat dapat dilakukan dengan menimbang 1,36 g KH_2PO_4 dan 1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Untuk pembuatan larutan A, 1,36 g KH_2PO_4 yang telah ditimbang dilarutkan ke dalam satu liter akuades. Pembuatan larutan B menggunakan, 1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yang telah ditimbang dilarutkan ke dalam

satu liter akuades pula. Satu liter bufer fosfat diperoleh dengan cara mencampurkan 510 ml larutan A dan 490 ml larutan B, kemudian dimasukkan ke dalam botol yang telah disediakan dan ditutup rapat.

3.5.2. *Perbanyakan Inokulum soybean mosaic virus (SMV)*

Benih kedelai yang digunakan untuk perbanyakan SMV yaitu benih varietas Orba karena merupakan benih yang rentan terhadap 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 5g dengan menggunakan mortal dan alu yang diencerkan dengan buffer fosfat pH 7 sebanyak 50 ml. Inokulasi secara mekanik dilakukan sesuai dengan prosedur Akin (2006). Setelah daun berjumlah lebih dari 4 helai atau berumur > 10 hari. Caranya yaitu sap (ekstrak daun) dioleskan pada permukaan daun tanaman yang mengalami luka mikro (*sublethal wounding or abrasi*) atau daun yang telah ditaburi zeolit. Setelah sap dioleskan, dilakukan pencucian menggunakan aquades dengan cara disemprot menggunakan *hand sprayer*.

3.5.3. *Persiapan Lahan*

Lahan diolah dengan menggunakan cangkul untuk memperbaiki sifat fisik tanah dan untuk membersihkan gulma. Kemudian tanah tersebut dicampur pupuk kandang secara merata untuk meningkatkan kesuburan tanah.

3.5.4 Penanaman

Pada penelitian ini ditanam 100 benih F₂ hasil persilangan Tanggamus x Taichung dengan genotipe nomor 5. Penelitian ini dilakukan dengan menanam benih pada petak percobaan berukuran 3m x 4m. Tanaman tersebut ditanam dengan jarak tanaman 20cm x 50cm. Jarak antarbaris 50 cm dan jarak tanaman dalam baris 20 cm. Pada setiap baris ditanam 15 benih yang sama dan tetua terdapat pada baris terluar (Gambar 3).

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 dinokulasi, daun tersebut dicuci kembali dengan aquades secukupnya menggunakan *hand sprayer*.

3.5.7 Pelabelan

Setiap tanaman uji masing-masing diberi label seperti 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, memperbaiki label yang rusak, dan paranet yang rusak/bergeser. Penyiangan gulma dilakukan secara mekanis yaitu menggunakan koret. Penyemprotan dengan insektisida dan fungisida dilakukan sesuai dengan kebutuhan. Insektisida yang digunakan yaitu *Decis* sedangkan fungisida yang digunakan yaitu *Dithane*. Penyiraman dilakukan 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. Pemanenan dilakukan dengan memanen tanaman kedelai secara utuh dengan mencabut satu persatu tanaman, kemudian memasukkan pada kantong panen yang telah diberi label.

3.5.10 *Pengamatan*

Pengamatan dilakukan pada setiap tanaman kedelai. Peubah yang diamati sebelum panen pada penelitian ini yaitu

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 uji, serta dihitung menurut Campbell dan Madden yang dikutip Mulia (2008):

$$KP = \frac{\sum(n_x v)}{N \times Z} \times 100\%$$

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

Gejala serangan setiap jenis virus yang muncul menurut Akin (2005) yang dikutip

Mulia (2008) memiliki rincian sebagai berikut:

0 = Tidak bergejala

1 = Klorosis dan tulang daun memucat

2 = Mosaik dengan klorosis pada tulang daun dan permukaan daun

3 = Mosaik berat, klorosis dan terjadi pembengkokan pada permukaan daun,
daun melengkung ke bawah atau ke atas.

4 = Malformasi daun

Kategori ketahanan:

Keparahan penyakit (%):

0 – 10 = Sangat Tahan

11 – 25 = Tahan

26 – 35 = Agak Tahan

36 – 50 = Agak Rentan

51 – 75 = Rentan

76 – 100 = Sangat Rentan

Peubah-peubah yang diamati setelah panen yaitu

1. Tinggi tanaman, diukur dari pangkal batang sampai titik tumbuh tanaman.
Pengukuran dilakukan setelah panen;
2. 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 total biji per tanaman;
7. Bobot kering 10 butir benih per tanaman, diamati setelah dikeringanginkan sekitar 3 minggu setelah panen (g);
8. Bobot biji per tanaman, dengan cara menimbang biji setiap tanaman; dan
9. Umur panen, dihitung sejak tanam sampai tanaman siap untuk dipanen.