

III. METODOLOGI

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini telah dilaksanakan di laboratorium Entomologi, Hama dan Penyakit Tumbuhan Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian (BALITKABI) Kendalpayak, Kabupaten Malang. Pelaksanaan penelitian dimulai bulan Maret 2010 sampai Juni 2010.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan Petri, mikroskop, gelas ukur, tabung reaksi, haemocytometer, handcounter, kamera, gunting, botol kaca, vial plastik berdiameter 5 cm dan tinggi 5 cm (tempat larva uji *S. litura*), nampan, kuas, toples bulat dengan diameter 20 cm dan tinggi 25 cm untuk pembiakan larva *S. litura*, dan toples plastik berdiameter 20 cm dan tinggi 25 cm untuk pemeliharaan ngengat/imago.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat *S/NPV* (hasil koleksi Drs. Bedjo, MS. dari berbagai daerah di NTB dan JATIM, kedelai varietas Wilis, telur dan larva *S. litura*, madu, kapas, tissue, kuas kecil, kain kasa, hand sprayer, dan daun tanaman kedelai untuk pakan larva *S. litura*).

3.3 Persiapan Penelitian

3.3.1 Pembiakan Massal *S. litura* (Rearing)

Pemeliharaan massal *S. litura* dengan mengumpulkan kelompok telur *S. litura* dari lapang kemudian diberi pakan daun kedelai, dipelihara sampai menjadi larva instar 2 - 3 yang seragam untuk serangga uji. Sebagai bahan perbanyakan dapat dilakukan dengan mengumpulkan telur *S. litura* dari tanaman kedelai dilapang, selanjutnya dipelihara pada toples bulat berdiameter 20 cm dan tinggi 25 cm kemudian diberi pakan daun kedelai segar sampai menjadi pupa dan imago. Imago jantan dan betina yang muncul dimasukkan dalam toples berdiameter 20 cm dan tinggi 25 cm yang bagian dalam dindingnya dilapisi dengan kertas untuk tempat meletakkan telur, kemudian ditutup dengan kain kasa pada bagian atasnya. Selanjutnya imago tersebut diberi pakan berupa larutan madu 10%. Telur-telur yang dihasilkan dipelihara sampai menjadi larva, pupa, imago, telur dan

seterusnya sampai populasi larva cukup dan siap digunakan sebagai serangga uji. Sebagian populasi larva instar 3 - 4 digunakan sebagai bahan perbanyakan berbagai isolat *S/NPV* yang akan di uji.

3.3.2 Persiapan Isolat *S/NPV*

Isolat *S/NPV* yang digunakan adalah hasil koleksi Drs. Bedjo, MS. yang diperoleh dari berbagai daerah di NTB dan JATIM yang saat ini merupakan koleksi di Balai Penelitian Tanaman Kacang–Kacangan Dan Umbi – Umbian (BALITKABI) Kabupaten Malang. Perbanyakan virus *S/NPV* dapat dilakukan dengan menginfeksi atau menginokulasikan virus tersebut pada pakan segar kemudian diberikan pada larva hasil biakan massal di laboratorium. Untuk mendapatkan jumlah PIB yang lebih banyak, digunakan larva *S. litura* instar 3 - 4, hal ini diharapkan larva akan mati pada instar 5 atau instar 6 dan pengambilan larva mati dilakukan sebelum tubuh larva hancur. Selanjutnya larva yang mati dikumpulkan dan ditumbuk dengan menggunakan mortar, bila terlalu pekat ditambahkan aquades ± 1-2 ml dan disaring dengan kertas saring atau kain halus. Proses selanjutnya adalah suspensi yang terkumpul dimurnikan dengan menggunakan sentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 3500 putaran per menit. Endapan yang diperoleh digunakan sebagai “suspensi polyhedral stock”. Pada proses pemurnian tidak dilakukan penambahan bahan kimia karena dapat berpengaruh terhadap efektifitas dan virulensi isolat (Ignoffo, 1967). Standarisasi konsentrasi *S/NPV* dilakukan berdasarkan satuan PIBs/ml dengan menghitung jumlah PIBs pada suspensi yang diperoleh dari larva yang mati, selanjutnya digunakan sebagai suspensi *polyhedral stock* dan siap digunakan untuk perlakuan.

Konsentrasi polyhedral menurut (Hadieoetomo, 1993 dalam Bedjo, 2008) dapat dihitung dengan menggunakan haemocytometer dengan rumus sebagai berikut :

$$r = \frac{t \times d}{n \times 0,25} \times 10^6$$

Keterangan :

r : Kerapatan PIB (PIB/ml)

d : Faktor pengenceran

t : Jumlah PIB pada kotak yang dihitung

n : Jumlah kotak kecil

3.3.3 Persiapan Penanaman Kedelai Wilis

Tanaman kedelai digunakan sebagai pakan *S. litura* serta untuk perlakuan di laboratorium. Tanaman yang digunakan adalah kedelai varietas Wilis yang diperoleh dari Balitkabi, Malang. Kedelai ditanam di lahan percobaan Balitkabi seluas 180 m². Penanaman kedelai dilakukan seperti praktek budidaya kedelai yang dilakukan oleh petani, tetapi tidak dilakukan pengendalian hama daun dan polong secara kimia, hanya secara mekanis yaitu dengan mengambil dan membuang daun yang terserang hama atau patogen, sehingga didapatkan daun yang sehat (utuh) yang nantinya akan digunakan untuk perlakuan *S/NPV*.

3.4 Metode Penelitian

3.4.1 Rancangan Percobaan

Metode penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang disusun dengan pola faktorial terdiri dari dua faktor peubah yaitu isolat *S/NPV* dan interval waktu infestasi *S.litura* pada daun kedelai yang telah diinokulasi dengan isolat *S/NPV*. Isolat *S/NPV* yang digunakan yaitu Lombok Barat (LB06 a), Lombok Timur (LT06 b), dan Jawa Timur (JTM05 h).

Dan interval waktu infestasi *S. litura* yang digunakan terdiri dari tujuh yaitu :

1. Kontrol tanpa aplikasi isolat *S/NPV*.
2. 5 jam setelah aplikasi isolat *S/NPV*.
3. 10 jam setelah aplikasi isolat *S/NPV*.
4. 24 jam setelah aplikasi isolat *S/NPV*.
5. 48 jam setelah aplikasi isolat *S/NPV*.
6. 72 jam setelah aplikasi isolat *S/NPV*.

3.4.2 Perlakuan

Perlakuan disusun dengan mengkombinasikan tiga isolat *S/NPV* (LB06 a, LT06 b, JTM05 h) dengan konsentrasi ($1,5 \times 10^{12}$ PIBs/ha) dan interval waktu infestasi *S. litura* pada daun kedelai sehingga didapatkan 3 x 5 kombinasi perlakuan.

Susunan kombinasi perlakuan disajikan dalam Tabel 1. sebagai berikut :

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan antara Isolat *SINPV* dengan Interval Waktu Infestasi *S. litura*.

Interval Waktu Infestasi <i>S. litura</i> (jam)	Isolat <i>SINPV</i>		
	LB06 a	LT06 b	JTM05 h
5	LB06 a 5	LT06 b 5	JTM05 h 5
10	LB06 a 10	LT06 b 10	JTM05 h 10
24	LB06 a 24	LT06 b 24	JTM05 h 24
48	LB06 a 48	LT06 b 48	JTM05 h 48
72	LB06 a 72	LT06 b 72	JTM05 h 72

Terdapat 15 kombinasi perlakuan. Tiap kombinasi perlakuan diinfestasi dengan menggunakan 20 ekor ulat *S. litura* instar 2-3. Masing-masing perlakuan diulang 3 kali. Setiap perlakuan menggunakan konsentrasi $1,5 \times 10^5$ PIB/ml.

3.4.3 Analisis Percobaan

Analisis percobaan dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan dengan menggunakan uji F dan apabila terdapat pengaruh yang nyata dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf kesalahan 5 %.

Untuk setiap perlakuan, persentase berhenti makan dan kematian larva *S. litura* dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$P = \frac{a}{b} \times 100\%$$

Keterangan :

P : Persentase berhenti makan / kematian larva *S. litura*

a : Jumlah larva uji yang mati

b : Jumlah larva uji (Bedjo, 2008).

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Aplikasi Isolat *SINPV* pada Tanaman Kedelai

Tanaman kedelai di lahan yang telah berumur antara 35-45 HST diaplikasikan *SINPV* dengan cara disemprot dengan menggunakan hand sprayer dengan konsentrasi $1,5 \times 10^{12}$ PIBs/ha sesuai interval waktu infestasi *S. litura*.

Penyemprotan dilakukan pada pagi hari jam 06.00 WIB dan disemprot pada permukaan bawah daun.

3.5.2 Pengambilan Daun

Tanaman kedelai yang telah dilakukan aplikasi *SINPV* sesuai perlakuan yaitu 5, 10, 24, 48 dan 72 jam setelah aplikasi, daun tanaman kedelai dipetik pada bagian yang masih muda untuk diberikan ke *S. litura* sebagai pakan (di laboratorium).

3.5.3 Infestasi *S. litura*

Masing – masing kombinasi perlakuan dibutuhkan 20 ekor ulat yang masing-masing vial plastik berisi 1 ekor ulat. Ulat yang dibutuhkan adalah ulat instar-3. Setelah daun diaplikasi *SINPV*, daun diberikan ke *S. litura* sebagai pakan sesuai interval waktu 5, 10, 24, 48, dan 72 jam. Vial yang berisi larva uji diberi pakan satu helai daun kedelai yang telah diinokulasi. Setiap harinya pakan diganti dengan pakan segar yaitu daun kedelai tanpa NPV. Diamati sesuai dengan parameter pengamatan.

3.6 Parameter Pengamatan

Parameter pengamatan yang diamati dalam penelitian ini antara lain:

1. Persentase larva *S. litura* yang berhenti makan diamati pada 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 dan 24 jam setelah inokulasi (JSI).
2. Persentase kematian larva *S. litura* diamati pada 24, 48, 72, 96, 120, 144, dan 168 JSI.
3. Persentase larva *S. litura* yang menjadi pupa dan imago.