

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian (BALITKABI) yang bertempat di Jl. Raya Kendalpayak km 8, Kabupaten Malang.

3.2 Alat dan Bahan

Adapun bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain isolat *S/NPV* 97c dari laboratorium HPT Balitkabi, larva *S.litura* instar 3, daun kedelai, aquades, buffer fosfat 1%, kertas tissue, kertas merang, kaolin.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah lampu UV, haemocytometer, wadah pembiakan *S.litura*, vial plastik, kain saring, sendok, pinset, pipet mikro, tabung reaksi, sentrifuse, mortar, cawan petri, mikroskop digital, kulkas, timbangan analitik, kuas mini, alat tulis, kertas label, buku agenda, dan kalkulator.

3.3 Rancangan Percobaan

Metode yang digunakan pada percobaan ini adalah Rancangan Acak Lengkap Faktorial (2×4) dengan tiga ulangan. Faktor pertama adalah bahan pembawa kaolin. Faktor kedua adalah lama penyinaran sinar ultraviolet.

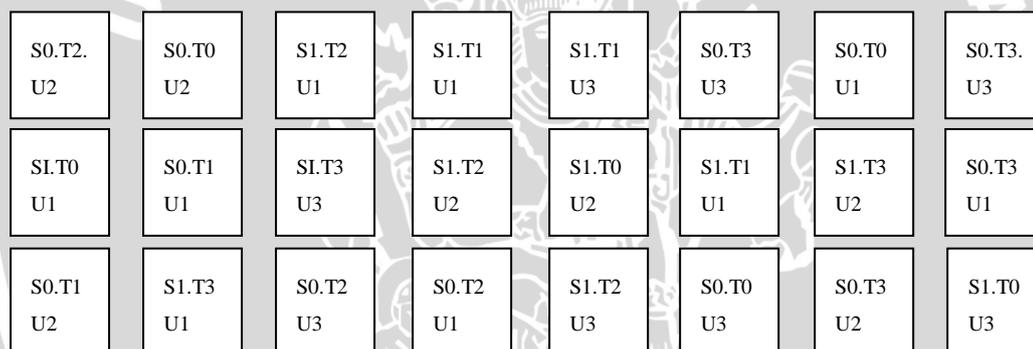
1. Bahan Pembawa kaolin
 - S_0 = *S/NPV* tanpa dicampur kaolin
 - S_1 = *S/NPV* dicampur kaolin konsentrasi 5%
2. Lama penyinaran
 - T_0 = tanpa penyinaran UV
 - T_1 = lama penyinaran UV 1 jam
 - T_2 = lama penyinaran UV 3 jam
 - T_3 = lama penyinaran UV 4 jam

Tabel 1. Kombinasi Rancangan Percobaan

Lama penyinaran (T)	Bahan Pembawa Kaolin	
	Tanpa Kaolin (S0)	Dicampur Kaolin 5% (S1)
0 jam (T0)	S0.T0	S1.T0
1 jam (T1)	S0.T1	S1.T1
3 jam (T2)	S0.T2	S1.T2
4 jam (T3)	S0.T3	S1.T3

Keterangan: S0= S/NPV tidak dicampur kaolin, S1= S/NPV dicampur kaolin, T0= tanpa disinari UV, T1= disinari UV selama 1 jam, T2= disinari UV selama 3 jam, T3= disinari UV selama 4 jam.

Setiap kombinasi perlakuan diulang tiga kali sehingga seluruh percobaan menjadi 24 kombinasi perlakuan. Setiap unit percobaan memerlukan 10 larva yang masing-masing larva diletakkan dalam vial plastik yang berbeda untuk mempermudah dalam pengamatan. Penempatan perlakuan dapat dilihat pada gambar dibawah ini:



Gambar 3. Penempatan perlakuan

3.4 Pelaksanaan

3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan.

Sterilisasi adalah suatu proses perlakuan terhadap alat atau bahan agar tidak terdapat mikroorganisme yang dapat mengganggu hasil percobaan. Sterilisasi alat dapat dilakukan dengan menggunakan sinar UVC. Alat yang mendapat perhatian khusus dalam sterilisasi yaitu vial plastik. Vial plastik harus terhindar dari mikroorganisme agar tidak mempengaruhi hasil data. Vial plastik terlebih dahulu direndam dengan larutan NaOCl bercampur air selama 25-30 menit. Setelah itu permukaan bagian dalam dan luar vial plastik digosok-gosong dengan busa sampai bersih. Vial kemudian dijemur di bawah sinar matahari

sampai kering. Memastikan bahwa vial plastik telah terhindar dari mikroorganisme, maka vial tersebut disinari di bawah lampu sinar UVC selama 20-25 menit.

3.4.2 Pemeliharaan larva *S.litura* (*Mass Rearing*).

Larva *S.litura* yang dijadikan bahan penelitian adalah larva instar 3. Larva instar 3 merupakan stadia yang aktif dalam memakan daun sehingga banyak menyebabkan kerusakan. Pemilihan larva instar 3 dianggap efektif untuk menekan populasi dan kerusakan yang berakibat pada penurunan kualitas dan kuantitas. Langkah awal sebelum melakukan pemeliharaan larva yaitu menyediakan ruang hidup buatan yang bersih bagi larva tersebut. Ruang hidup terbuat dari toples plastik berukuran diameter 10 cm dengan tinggi 15 cm. Setelah siap, langkah berikutnya yaitu mencari telur *S.litura* di alam yang terdapat pada permukaan daun kedelai. Setelah telur ditemukan, maka dikumpulkan dan diletakkan dalam toples.

Pengamatan telur dilakukan setiap pagi dan sore hingga telur menetas dan larva *S.litura* aktif beraktifitas dan memakan daun kedelai. Pemberian daun kedelai sebagai makanan dilakukan pergantian setiap dua hari. Larva instar 1 terhitung sejak menetasnya telur hingga hari ke-3, larva instar 2 terhitung hari ke-4 hingga hari ke-6. Instar 3 yaitu pada hari ke-7 hingga hari ke-9. Pada hari ke-7, maka larva *S.litura* siap untuk diaplikasikan sebagai bahan penelitian.

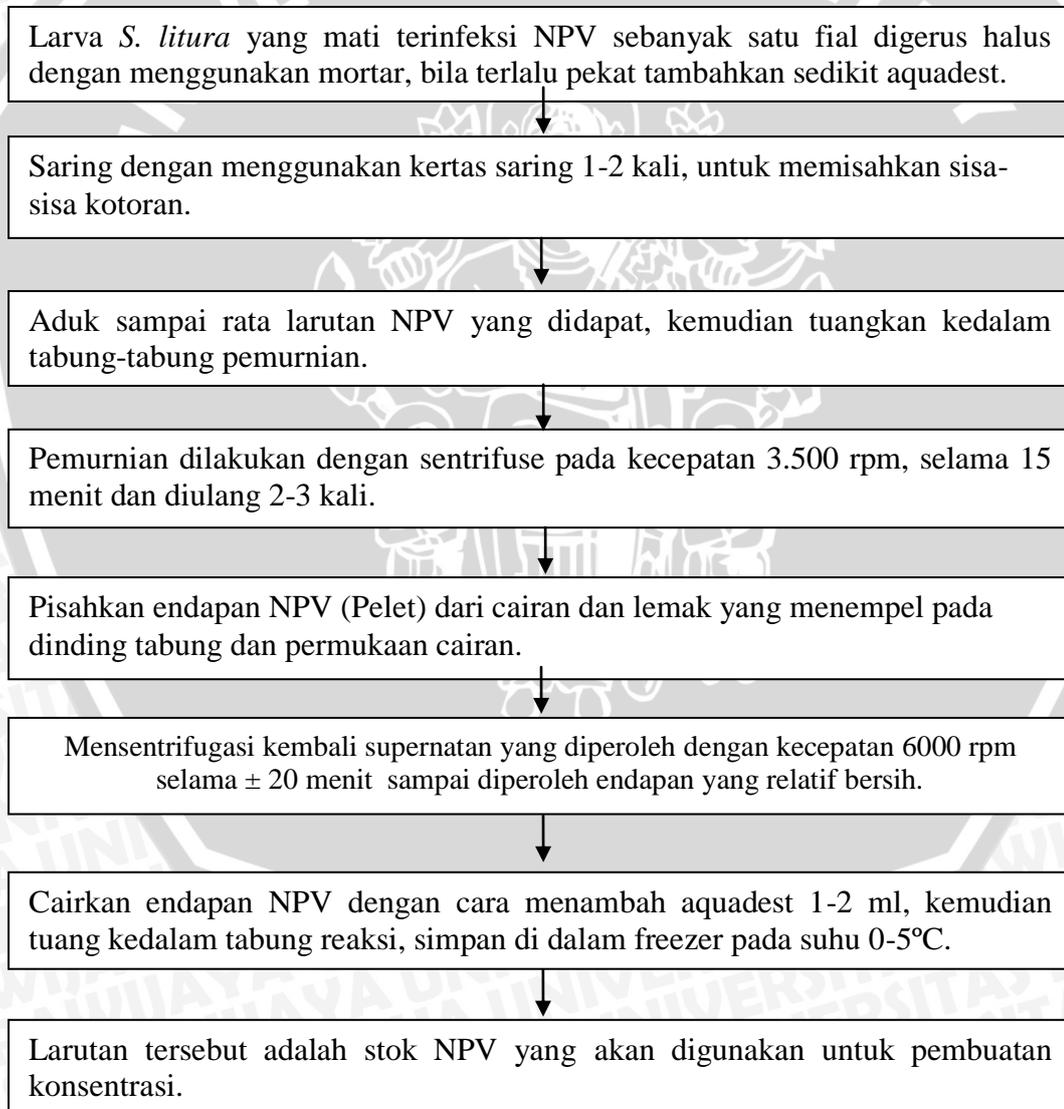
3.4.3 Perbanyak Isolat SINPV

Larva *S.litura* yang mati terinfeksi NPV sebanyak satu fial plastik digerus halus dengan menggunakan mortar, bila terlalu pekat perlu ditambahkan tambahkan sedikit aquadest. Saring dengan menggunakan kertas saring 1-2 kali untuk memisahkan sisa-sisa kotoran. Aduk sampai rata dan tuang ke dalam tabung pemurnian. Suspensi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 15 menit dan diulang 2-3 kali.

Endapan NPV dipisahkan dari cairan lemak pada dinding tabung dan permukaan cairan. Endapan NPV tersebut ditambahkan aquadest sebanyak 1-2 ml, kemudian dituangkan kedalam tabung reaksi, lalu simpan di dalam kulkas.

Suspensi yang disimpan di dalam kulkas kemudian diencerkan 4 kali untuk mempermudah perhitungan *Polyhidra Inclusion Bodies* (PIBs). Perhitungan PIB dilakukan dengan menggunakan mikroskop. Suspensi diambil dengan mikro pipet 0,01 ml dan diencerkan dengan akuades 0,99 ml. Hasil suspensi yaitu 1,00 ml diambil dan diamati dan dihitung dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali.

Hasil penelitian oleh Arifin dan Bedjo (2007) menunjukkan bahwa *S/NPV* yang diaplikasikan dengan konsentrasi 3×10^9 PIBs/ml dicampur dengan bahan pembawa kaolin hingga mencapai berat 100 gram, efektif terhadap ulat grayak instar 3 dengan tingkat kematian 58-100% pada 6 HSA dan 86-100% pada 12 HSA.



Gambar 4. Diagram isolasi *S/NPV* JTM 97C

3.4.4 Pengaruh Sinar UV terhadap Efektifitas *SINPV*

Kendala penurunan infektivitas *SINPV* yang dialami di lapangan adalah efek radiasi matahari yang mengandung sinar ultra violet yang dapat menurunkan infektivitas polihedral *SINPV*. Pada percobaan ini PIB yang sudah diperlakukan disinari dengan lampu ultraviolet buatan dengan lama waktu penyinaran yang berbeda. T0 merupakan aplikasi tanpa penyinaran UV. T1 merupakan aplikasi penyinaran UV selama 1 jam. T2 merupakan aplikasi penyinaran UV selama 3 jam. T3 merupakan aplikasi penyinaran UV selama 4 jam.

3.4.5. Parameter Pengamatan

Parameter pengamatan terbagi menjadi 4, diantaranya:

1. *Stop feeding* (berhenti makan).

Parameter ini dilakukan untuk mengetahui lama waktu *SINPV* mempengaruhi larva *S.litura* dalam berhenti makan. Semakin cepat larva berhenti makan maka kemungkinan kematian larva semakin cepat. *Stop feeding* dilakukan pengamatan pada 1 JSI, 2 JSI, 3 JSI, 4 JSI, 6 JSI, 8 JSI, 12 JSI, 14 JSI, 16 JSI, 18 JSI, 20 JSI, 22 JSI, 24 JSI. (JSI=jam setelah inokulasi)

2. Mortalitas (kematian larva).

Pengamatan kematian larva dilakukan dengan cara menghitung jumlah larva yang mati setelah aplikasi. Pengamatan dilakukan setiap hari sekali sampai larva mengalami kematian atau mengalami perubahan metamorphosis berupa pupa.

Persentase larva yang mati dihitung dengan rumus:

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

Keterangan:

n : jumlah larva yang mati tiap perlakuan.

N : jumlah larva keseluruhan tiap perlakuan.

3. Perubahan metamorfosis menjadi pupa.

Pengamatan ini dilakukan dengan menghitung jumlah larva yang masih dapat hidup bertahan hingga menjadi pupa. Pengamatan dilakukan setiap hari sekali. Normalitas dan abnormalitas pada pupa juga dicatat.

4. Perubahan metamorfosis menjadi imago.

Pengamatan ini dilakukan dengan menghitung jumlah pupa yang masih dapat bertahan hingga menjadi imago. Pengamatan dilakukan setiap hari sekali. Adanya ciri khusus pada bentuk tubuh imago juga dicatat.

3.4.6. Analisis Data.

Data dianalisis dengan uji F, jika terdapat pengaruh nyata maka dilanjutkan dengan menggunakan BNT dengan taraf 5%.

