

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

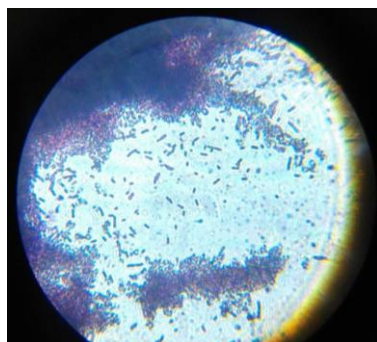
A. Identifikasi dan Karakterisasi *Bacillus thuringiensis*

1. Sifat Koloni dan Sel *Bacillus thuringiensis*

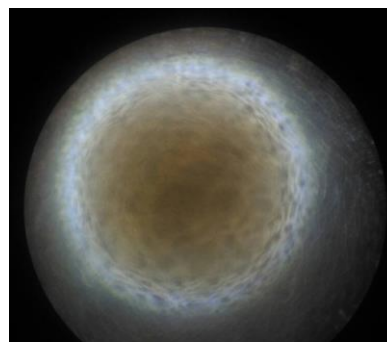
Identifikasi dan karakterisasi bakteri *Bacillus thuringiensis* sebelum digunakan sebagai campuran fermentasi dengan *Lantana camara* untuk membuktikan bahwa inokulum yang digunakan adalah murni inokulum *B. thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis merupakan bakteri gram positif yang berbentuk batang, aerobik dan membentuk spora (Bahagiawati 2002). Ciri-ciri morfologi *B. thuringiensis* antara lain : sel vegetatif berbentuk batang dengan ukuran panjang 3-5 mm dan lebar 1,0 – 1,2 mm, mempunyai flagella, spora berbentuk oval, letaknya sub terminal, berwarna hijau kebiruan dan berukuran 1,0 – 1,3 mm. Menurut Rusman (2000) menyatakan bahwa bakteri ini memiliki elevasi timbul serta permukaannya kasar. Koloni-koloni bakteri yang tumbuh pada hari pertama sangat kecil dan hampir rata dengan media, kemudian pada hari kedua bakteri akan membesar dan agak lebar tetapi tidak bersentuhan satu dengan yang lainnya.

Inokulasi *B. thuringiensis* pada petridish dengan media NA yang telah diinkubasi selama 48 jam menunjukkan ciri morfologi sesuai dengan yang



(a) Bentuk Sel dan Sifat Gram



(b) Struktur Koloni

Gambar 1. Karakterisasi dan Identifikasi

disebutkan di atas oleh Bahagiawato (2002) yaitu ; berwarna putih cream, berelevasi *Low convex*, berstruktur dalam *Finely granular*, bertepi *Entire*, dan berdiameter 5 mm (Gambar 1 dan Tabel 3).

Tabel 3. Karakterisasi Koloni dan Sel

Tingkat	Parameter	Karakter	Karakterisasi*
Koloni	Warna Bentuk koloni Bentuk elevasi Tepi Struktur dalam	<i>Cream</i> <i>Circular</i> <i>Low Convex</i> <i>Entire</i> <i>Finely Granular</i>	<i>Cream</i> <i>Circular</i> <i>Convex rugose</i> <i>Entire</i> <i>Filamentous</i>
Sel	Sifat gram Bentuk sel Aerobisitas	Positif Basil/batang Aerob fakultatif	Positif Basil/batang Aerob fakultatif

Keterangan : * Per. H. Damgaard *et al.* (1997)

Untuk memastikan bahwa koloni yang teridentifikasi tersebut adalah *Bacillus thuringiensis*, maka dilakukan serangkaian pengujian yang bersifat spesifik yaitu dengan uji cat gram dan uji efektivitas. Terdapat perbedaan pada bentuk koloni dari literatur, hal ini disebabkan oleh perbedaan lingkungan tumbuh. Dimana perubahan atau perbedaan lingkungan tumbuh dapat berpengaruh pada perubahan bentuk koloni. Hasil uji cat gram menyatakan positif *B. thuringiensis* setelah dicocokkan dengan hasil penelitian Enviren (2009) Ciri-ciri morfologi *B. thuringiensis* antara lain : sel vegetatif berbentuk batang dengan ukuran panjang 3-5 mm dan lebar 1,0 – 1,2 mm, mempunyai flagella, spora berbentuk oval, letaknya sub terminal, berwarna hijau kebiruan dan berukuran 1,0 – 1,3 mm (Lampiran 5 a).

2. Uji virulensi *Bacillus thuringiensis* terhadap *Plutella xylostella*

Tingkat keefektifitasan bakteri *Bacillus thuringiensis* dapat diketahui dengan melakukan pengamatan aplikasi *Bacillus thuringiensis* ke bunga kol



Gambar 2. Uji Efektifitas pada *Plutella xylostella* sebagai pakan dari *Plutella xylostella*. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu dengan pengulangan sebanyak 3 kali, adapun dokumentasi hasil pengamatan yang dilakukan pada Gambar 2.

Pengujian dilakukan dengan cara merendam bunga kol dalam 5 menit, setelah itu ditiriskan agar larutan *B. thuringiensis* dapat menyerap pada bunga kol dan juga agar bunga kol tidak dalam keadaan yang terlalu basah sehingga dapat menyebabkan kematian pada ulat karena terendam larutan.

Hasil uji virulensi menunjukkan bahwa inokulum *Bacillus thuringiensis* yang telah *dishaker* selama 48 jam dan diaplikasikan pada *Plutella xylostella* dengan dosis 100 ml + 100 ml aquades terbukti dapat membunuh 80% larva *Plutella xylostella* dalam waktu 4 hari. Hal tersebut membuktikan inokulum yang digunakan memiliki daya bunuh yang efektif dan dapat digunakan sebagai inokulum Biopestisida.

B. Perubahan Fisik Setelah Fermentasi *Lantana camara* dengan *Bacillus thuringiensis* dalam Media Alami

Formula Biopestisida merupakan kultur mikroba yang diinokulasikan ke dalam medium pembawa (*carrier*), pada saat kultur mikroba tersebut pada fase pertumbuhan dan berdaya bunuh. Formulasi bahan pembawa bertujuan untuk mendapatkan inokulum dengan komposisi yang sesuai bagi pertumbuhan

mikroorganisme selama masa penyimpanan dan tetap memiliki efektivitas yang baik saat diaplikasikan sebagai Biopestisida. Bahan pembawa Biopestisida yang lazim disebut sebagai *carrier* pada dasarnya merupakan suatu bahan yang dapat digunakan sebagai tempat hidup mikroba sebelum diaplikasikan, sehingga harus dapat mengaktifkan kegiatan mikroba agar mampu tumbuh dan berkembang pada saat digunakan sebagai Biopestisida (Putrina dan Fardedi, 2007).

Bacillus spp. digolongkan ke dalam kelas bakteri heterotropik, yaitu protista bersifat uniseluler, termasuk dalam golongan mikroorganisme redusen atau yang lazim disebut sebagai dekomposer. Sebagian besar bakteri laut termasuk dalam kelompok (Rheinheimer, 1980).

Menurut Gandjar dan Syamsurizal (2006), ada tiga faktor penting dalam proses fermentasi yaitu :

1. Inokulum, yaitu bahan (padat atau cair) yang mengandung spora atau konidia, atau sel khamir yang sengaja ditambahkan pada substrat.
2. Substrat atau bahan yang akan didegradasi oleh fungi atau bakteri yang ditambahkan.
3. Bioreaktor, yaitu tempat berlangsungnya proses – proses penguraian substrat oleh mikroorganisme.

Menurut Fardiaz (1992) faktor – faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri adalah zat makanan, pH, air, oksigen dan senyawa penghambat pertumbuhan. Sedangkan menurut Buckle (1987) selain zat makanan, suhu, pH dan aktivitas air, pertumbuhan bakteri juga dipengaruhi oleh waktu. Data hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 4.

1. Suhu

Menurut Buckle (1987), suhu dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme dengan dua cara yang berlawanan yaitu (1) apabila suhu mengalami kenaikan sekitar suhu optimalnya, kecepatan metabolisme naik dan pertumbuhan dipercepat sedangkan bila suhu turun sekitar suhu optimalnya, kecepatan metabolisme akan menurun dan pertumbuhan juga diperlambat.

Tabel 4 menunjukkan bahwa ada beda nyata antar perlakuan pada hari ke-0 dan hari ke-6. Suhu tertinggi terdapat pada perlakuan perbandingan media alami LCPKS dan Air Kelapa (0:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*. Suhu terendah terdapat pada perlakuan perbandingan media alami LCPKS dan Air Kelapa (1:0) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*. Pada hari ke – 0 suhu pada perlakuan dengan perbandingan LCPKS dan air kelapa (1:0) menunjukkan hasil terendah, apabila dikaitkan dengan parameter pH yang menunjukkan kebalikannya yaitu pH yang dimiliki perlakuan dengan perbandingan LCPKS dan air kelapa (1:0) dengan pH paling tinggi. Diduga nilai pH dan suhu memiliki keterkaitan dimana semakin asam maka semakin rendah suhunya. Hal ini pun ditunjukkan oleh perlakuan dengan perbandingan LCPKS dan air kelapa (0:1) memiliki pH terendah dan suhu tertinggi. Kenaikan pH yang dialami juga dipengaruhi oleh kandungan air kelapa yang membusuk.

Tabel 4. Hasil Perubahan Fisik Media Alami LCPKS dan Air Kelapa Selama Fermentasi dengan *B. thuringiensis* dan *L. camara*

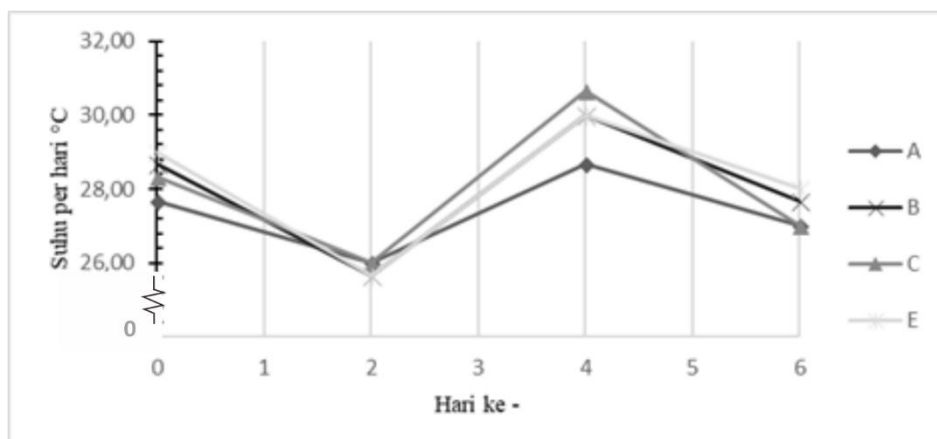
Perlakuan	Suhu (°C)		pH		Warna		Aroma		Perubahan TDS (ppm)
	Hari ke 2	Hari ke 6	Hari ke 2	Hari ke 6	Hari ke 2	Hari ke 6	Sebelum fermentasi	Setelah fermentasi	
A	27,67c	28,00b	7,10a	4,00b	3/3 2.5 Y (Dark Olive Brown)	3/3 10 YR (Dark Brown)	Daun Segar	Menyengat	1020
B	28,00bc	29,00ab	6,33c	3,77c	5/6 2.5 Y (Light Olive Brown)	3/3 10 YR (Dark Brown)	Daun Segar	Menyengat	830
C	28,33abc	29,33a	6,70ab	4,07ab	3/3 2.5 Y (Dark Olive Brown)	2/2 10 YR (Very Dark Brown)	Daun Segar	Menyengat	1360
D	28,67ab	28,00b	6,73b	4,10a	3/3 2.5 Y (Dark Olive Brown)	3/3 10 YR (Dark Brown)	Daun Segar	Menyengat	740
E	29,00a	29,33a	6,17d	3,73c	4/4 2.5 Y (Olive Brown)	2/2 10 YR (Very Dark Brown)	Daun Segar	Menyengat	660

Keterangan:

Angka yang diikuti huruf yang sama pada setiap kolom, menunjukkan tidak ada beda nyata pada jenjang 5% berdasarkan uji DMRT.

- A. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:0) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- B. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (3:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- C. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- D. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:3) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- E. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (0:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*

Adapun fluktuasi suhu selama proses fermentasi disajikan dalam bentuk grafik pada Gambar 3.



Gambar 3. Perubahan suhu selama fermentasi *Lantana camara* dan *Bacillus thuringiensis*

Keterangan:

- A. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:0) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- B. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (3:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- C. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- D. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:3) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- E. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (0:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*

Gambar 3 menunjukkan selama proses fermentasi *B. thuringiensis* dan *L. camara* dengan berbagai media alami mengalami perubahan suhu. Hari ke-6 pada perlakuan media alami LCPKS dan Air Kelapa (1:1) dengan *B. thuringiensis* dan perbandingan media alami LCPKS dan Air Kelapa (0:1) dengan *B. thuringiensis* memiliki suhu tertinggi dibandingkan dengan perlakuan lain. Pada suhu minimum dan suhu lebih tinggi dari maksimum dapat merusak maupun memperlambat pertumbuhan bakteri. Didukung dengan hasil penelitian Wianmo (1993) menyebutkan bahwa setiap penurunan suhu 8°C akan membuat kecepatan reaksi berkurang menjadi setengahnya. (2) bila suhu naik hingga di atas suhu maksimal

atau turun di bawah suhu minimal, maka pertumbuhan mungkin akan terhenti, komponen sel menjadi tidak aktif dan sel – sel mengalami kematian. Fermentasi dilakukan pada ruangan yang bersih dengan suhu ruang selama 6 hari (Tabel 4). Menurut Enviren (2009) *B. thuringiensis* bersifat gram positif, aerob, tetapi umumnya anaerob fakultatif, dapat tumbuh pada media buatan, suhu untuk pertumbuhan berkisar antara 15°-40°C maka dari itu fermentasi dilakukan pada suhu ruang. Tujuannya agar bakteri dapat tumbuh dengan baik pada media buatan selama fermentasi.

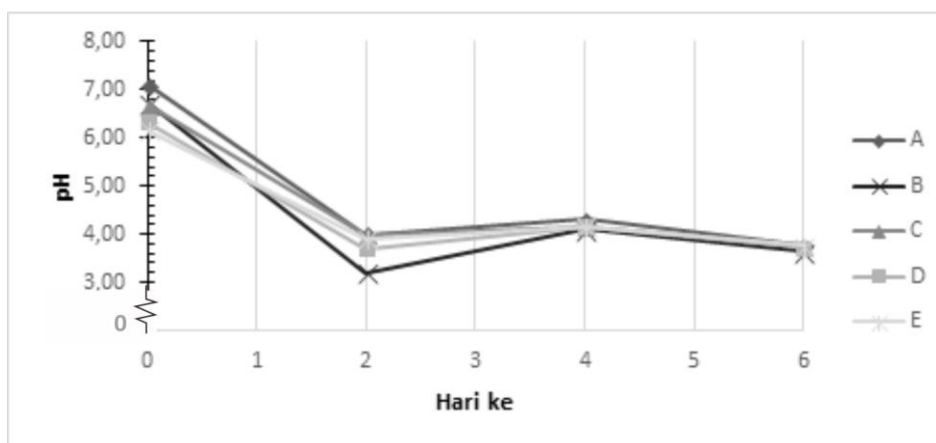
2. pH

Nilai pH sangat berpengaruh dalam pertumbuhan suatu organisme, khususnya mikroorganisme. Pertumbuhan sebagian organisme sangat peka terhadap perubahan pH karena setiap kelompok organisme mempunyai pH optimal sendiri yang tertentu. pH diperkirakan berpengaruh pada permeabilitas dinding sel dan laju pada reaksi enzim yang menempel pada dinding luar sel.

Berdasarkan hasil sidik ragam pada Tabel 4 menunjukkan bahwa ada beda nyata antar perlakuan pada hari ke-0 (Lampiran 4 a). Perlakuan dengan pH tertinggi yaitu pada perlakuan dengan perbandingan media alami LCPKS dan air kelapa (1:0) dengan fermentasi *Lantana camara* dengan *Bacillus thuringiensis*. Sedangkan pH terendah didapat pada perlakuan dengan perbandingan media alami LCPKS dan air kelapa (0:1) dengan fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*. Perubahan pH selama proses fermentasi disajikan dalam bentuk grafik pada Gambar 4.

Nilai optimal pH untuk pembentukan produk biasanya berbeda dengan yang dibutuhkan untuk pertumbuhan. pH diperkirakan berpengaruh pada permeabilitas

dinding sel dan laju pada reaksi enzim yang menempel pada dinding luar sel. Menurut Benoit *et al.* (1990) Selama kultivasi *Bacillus thuringiensis* dapat menghasilkan asam laktat, asam piruvat, asam asetat dan poli- β -hidroksi butirat. Selain enzim amilase, menurut Lin *et al.* (2012) *B. thuringiensis* ada juga yang menghasilkan selulosa sehingga menghidrolisis komponen selulosa menjadi gula yang dapat difermentasi, selanjutnya glukosa diubah menjadi asam. Perubahan nilai pH selama fermentasi *Lantana camara* dan *Bacillus thuringiensis* tertera dalam bentuk grafik pada Gambar 4.



Gambar 4. Perubahan nilai pH selama fermentasi *Lantana camara* dan *Bacillus thuringiensis*

Keterangan:

- A. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:0) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- B. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (3:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- C. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- D. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:3) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- E. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (0:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*

Hasil pengukuran pH media alami pada Gambar 4 menunjukkan bahwa adanya penurunan nilai pH selama proses fermentasi yang disebabkan adanya aktivitas mikroorganisme. Pada hari terakhir fermentasi pH bersifat asam dengan kisaran pH minimum 3,6. Perubahan pH disebabkan oleh adanya asam-asam organik yang terbentuk selama proses fermentasi (Said, 1987). Aktivitas mikroorganisme pendegradasi memungkinkan terjadinya penurunan pH karena senyawa organik telah diuraikan menjadi asam organik. Hidrolisis senyawa organik terjadi dimana ion hidrogen berfungsi untuk mengkatalisis reaksi pemutusan ikatan pada polisakarida, lipid dan protein. Dengan demikian, melalui proses hidrolisis, senyawa organik makromolekul dalam LCPKS dan Air Kelapa dapat diuraikan menjadi senyawa yang lebih sederhana oleh bantuan mikroorganisme. Hasil hidrolisis senyawa organik selanjutnya akan mengalami proses asidogenesis dan asetogenesis. Proses asidogenesis dan asetogenesis terjadi penurunan pH yang disebabkan oleh adanya asam organik yang dihasilkan. Degradasi dilakukan oleh enzim amilase yang dihasilkan oleh sel *B. thuringiensis* selama masa pertumbuhannya. Menurut Bernhard dan Utz (1993), semua galur *B. thuringiensis* mampu menghasilkan enzim amilase, sehingga bahan baku yang mengandung pati dapat digunakan langsung sebagai media kultivasi. Glukosa yang dihasilkan dari proses hidrolisis kemudian digunakan oleh sel untuk menghasilkan produk bioinsektisida.

Setiap organisme memiliki kisaran pH tertentu yang masih memungkinkan bagi pertumbuhannya dan juga mempunyai pH optimum. Pada umumnya, mikroorganisme dapat tumbuh pada kisaran suhu 6,6 – 8,0 dan nilai pH luar pada

kisaran 2,0 – 1,0 sudah bersifat merusak (Buckle, 1987). Mikroorganisme juga memerlukan pH tertentu untuk pertumbuhannya, namun pada umumnya bakteri memiliki kisaran pH yang sempit, yaitu sekitar pH 6,5 – 7,5 atau pada pH netral (Tarigan, 1988).

3. Warna

Dalam proses fermentasi perubahan warna merupakan salah satu indikator adanya aktivitas mikroorganisme yang terjadi dan tampak pada perubahan fisik. Hasil pengamatan perubahan warna terlampir pada Tabel 4.

Berdasarkan hasil pengamatan yang telah dilakukan yang terlampir pada Tabel 4 menunjukkan bahwa perubahan warna selama fermentasi terjadi terhadap semua perlakuan. Pada awal fermentasi memiliki warna *Dark Olive Brown* hingga berubah warna pada akhir fermentasi yaitu menjadi *Dark Brown*. Perubahan warna yang terjadi selama proses fermentasi dikarenakan adanya perubahan dari daun *L. camara* dan adanya pengaruh perbandingan limbah cair pabrik kelapa sawit (LCPKS) dan Air Kelapa. Daun *L. camara* mengandung klorofil yang berwarna hijau (Lampiran 5) akan tetapi selama proses fermentasi daun *L. camara* telah mengalami degradasi yang mengakibatkan klorofil menjadi rusak dan kehilangan zat berwarna hijau yang menyebabkan terjadinya perubahan warna selama fermentasi (Lampiran 7) hal ini disebabkan oleh rusaknya sel pada daun yang teroksidasi sehingga terjadi proses *browning* atau pencokelatan. Selain itu proses degradasi juga dipercepat oleh *B. thuringiensis* yang didukung oleh hasil penelitian Norris *et al.* (1981) dalam Claus and Barkeley (1986) menyatakan bahwa marga *Bacillus* mempunyai sifat fisiologis yang menarik karena tiap-tiap jenis mempunyai

kemampuan yang berbeda-beda, diantaranya : (1) mampu mendegradasi senyawa organik seperti protein, pati, selulosa, hidrokarbon dan agar, (2) mampu menghasilkan antibiotik; (3) berperan dalam nitrifikasi dan denitrifikasi; (4) pengikat nitro-gen; (5) pengoksidasi selenium; (6) pengoksidasi dan pereduksi mangan (Mn); (7) bersifat khemolitotrof, aerob atau fakultatif anaerob, asidofilik atau alkalifilik, psikoprifilik, atau termofilik. Menurut Astuti dan Trisnawati (2017) menunjukkan bahwa pada saat fermentasi telah terjadi reaksi pencokelatan (*browning*) yang melibatkan perubahan senyawa dalam jaringan dari bentuk kuinol menjadi kuinon melalui oksidasi.

4. Aroma

Sebutan tembelean pada tanaman *Lantana camara* didapat karena memang aromanya yang tidak sedap. Begitu pun pada saat setelah difermentasi. Aroma *L. camara* ditambah larutan LCPKS dan air kelapa yang mulai membusuk menghasilkan aroma yang kuat. Hasil pengamatan perubahan aroma terlampir pada Tabel 4.

Berdasarkan hasil pengamatan yang terlampir pada Tabel 4 menunjukkan bahwa terjadi perubahan aroma selama proses fermentasi. Pada awal pengamatan aroma menunjukkan bahwa aroma seperti daun segar. Akan tetapi setelah difermentasi selama 6 hari telah mengalami perubahan aroma menjadi lebih menyengat. Hal ini disebabkan oleh adanya proses pembusukan yang terjadi pada air kelapa. Air kelapa yang busuk akan menimbulkan bau yang tidak sedap. Menurut Norris *et al.* (1981) dalam Claus and Barkeley (1986) menyatakan bahwa Marga *Bacillus* mempunyai sifat fisiologis yang menarik karena tiap-tiap jenis

mempunyai kemampuan yang berbeda-beda, yang diantaranya mampu mendegradasi senyawa organik seperti protein, pati, selulosa, hidrokarbon dan agar. Bakteri *Bacillus thuringiensis* membantu pendegradasian senyawa – senyawa organik yang terkandung dalam *L. camara* terutama pada senyawa – senyawa protein yang memiliki bau busuk seperti halnya alkaloid dan senyawa lainnya, kemudian ditambah dengan air kelapa yang basi yang mengakibatkan bau busuk semakin menyengat.

C. Dinamika Populasi *Bacillus thuringiensis* pada Media Alami LCPKS dan Air Kelapa Selama Fermentasi

Penghitungan dinamika populasi dilakukan bertujuan untuk mengetahui dinamika pertumbuhan *B. thuringiensis* selama proses fermentasi yang dilakukan dengan metode *Total Plat Count* yang dilakukan pada fermentasi hari ke dua, empat, dan enam. Perhitungan ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh penggunaan media alternatif LCPKS dan air kelapa dengan *L. camara* pada ke pertumbuhan bakteri *B. thuringiensis*. Penghitungan populasi koloni dilakukan dengan mengisolasi bakteri pada petridish dengan media *Nutrient Agar* dengan metode dekomposit. Setelah itu di inkubasi selama 48 jam (Lampiran 5). Adapun hasil sidik ragam dinamika populasi pada Tabel 5.

Pada Tabel 5 berdasarkan hasil sidik ragam pertumbuhan *B. thuringiensis* menunjukkan bahwa ada beda nyata pada pertumbuhan hari ke 4 dengan perlakuan perbandingan media alami LCPKS dan air kelapa (0:1) mendapatkan pertumbuhan populasi terbaik (Lampiran 4 d).

Tabel 5. Hasil sidik ragam pertumbuhan *B. thuringiensis* pada media alami selama proses fermentasi

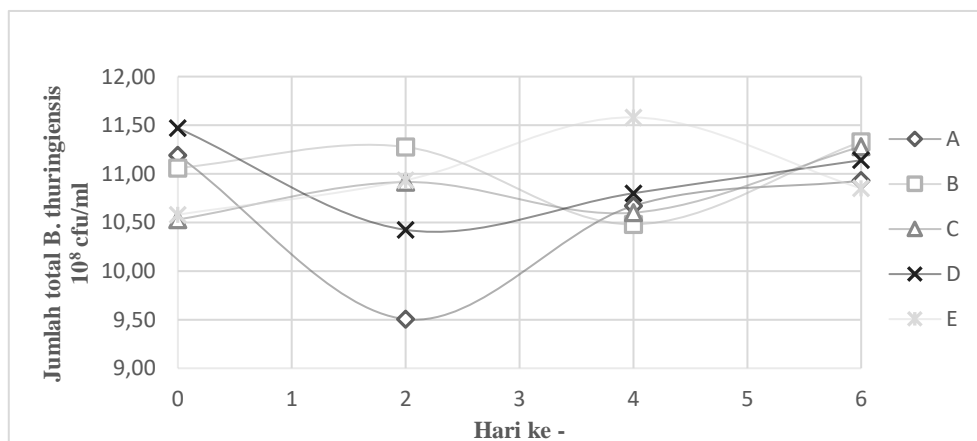
Perlakuan	Jumlah total <i>B. thuringiensis</i> 10 ⁸ cfu/ml			
	Hari ke-0	Hari ke-2	Hari ke-4	Hari ke-6
A	11,19a	9,505a	10,67b	10,93a
B	11,47a	10,424a	10,80b	11,14a
C	10,53a	10,915a	10,60b	11,28a
D	11,06a	11,276a	10,48c	11,33a
E	10,58a	10,934a	11,58a	10,85a

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada setiap kolom, menunjukkan tidak ada beda nyata pada jenjang 5% berdasarkan uji DMRT.

- A. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:0) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- B. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (3:1) dengan Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- C. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- D. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:3) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- E. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (0:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*

Pertumbuhan *B. thuringiensis* pada hari kedua tidak ada beda nyata. Hal ini dikarenakan ada beberapa sampel yang mengalami *spreader* (Lampiran 5 b). *Spreader* terjadi karena terlalu rapatnya koloni bakteri yang terdapat dalam satu petri dan mengakibatkan koloni tidak dapat dihitung dengan baik, dapat dikatakan *spreader* atau tidak bisa dihitung apabila terdapatnya koloni dengan ukuran menutupi hingga 50% dari petridish. Selain itu seri pengenceran yang digunakan pada hari ke dua yaitu 10⁸, 10⁹, dan 10¹⁰ diduga masih belum cukup tinggi. Terdapat juga bakteri lain yang tumbuh pada petridish, bakteri lain selain bakteri *Bacillus thuringiensis* tidak dapat dimasukkan dalam perhitungan. Bakteri lain ini diduga berasal dari simplisia *L. camara* yang memang sejak awal dalam keadaan *asteril*. Berdasarkan penelitian Astuti dan Trisnawati (2017) menunjukkan pertumbuhan *B.*

thuringiensis paling baik adalah pada *L. camara* 10% dengan 6 hari fermentasi. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan senyawa yang terdapat pada *L. camara* yaitu *alkaloidslantanine*, *flavonoids* dan juga *triperroids* diduga dapat memberikan nutrisi terhadap pertumbuhan *B. thuringiensis*. Menurut Setiawan dkk. (2010) diperoleh hasil bahwa formulasi dengan campuran ekstrak gulma *Tithonia* 10% merupakan formulasi terbaik untuk mengembangkan bakteri *Bacillus thuringiensis*. Menurut Alavie dkk. (2017) menunjukkan bahwa formulasi media *Nutrient Agar* dengan konsentrasi 10% daun *L. camara* yang di fermentasi selama 6 hari merupakan formulasi terbaik untuk mengembangkan *B. thuringiensis*. Berikut data pertumbuhan *B. thuringiensis* dalam bentuk grafik pada Gambar 5.



Gambar 5. Dinamika populasi *B. thuringiensis* pada media LCPKS

Keterangan:

- A. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:0) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- B. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (3:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- C. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- D. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:3) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- E. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (0:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*

Berdasarkan Gambar 5 menunjukkan adanya peningkatan dan penurunan populasi pada saat proses fermentasi, di hari ke 4 peningkatan dinamika populasi terbaik didapat dari perlakuan dengan perbandingan media alami LCPKS dan air kelapa (0:1). Menurut Kusnadi, dkk. (2011) Kurva pertumbuhan bakteri dapat dipisahkan menjadi empat fase utama : fase *lag* (fase lamban atau *lag phase*), fase pertumbuhan eksponensial (fase pertumbuhan cepat atau *log phase*), fase *stasioner* (fase statis atau *stationary phase*) dan fase penurunan populasi (*decline*). Fase-fase tersebut mencerminkan keadaan bakteri dalam kultur pada waktu tertentu. Diantara setiap fase terdapat suatu periode peralihan dimana waktu dapat berlalu sebelum semua sel memasuki fase yang baru. Pertumbuhan pada hari ke empat dapat digolongkan dalam fase eksponensial. Selama fase ini, masa dan volume sel meningkat oleh faktor yang sama dalam arti rata-rata komposisi sel dan konsentrasi relatif metabolit tetap konstan. Selama periode ini pertumbuhan seimbang, kecepatan peningkatan dapat diekspresikan dengan fungsi eksponensial alami. Sel membelah dengan kecepatan konstan yang ditentukan oleh sifat intrinsik bakteri dan kondisi lingkungan. Dalam hal ini terdapat keragaman kecepatan pertumbuhan berbagai mikroorganisme (Kusnadi, dkk., 2011). Hal ini ditunjukkan pada grafik dimana pada semua perlakuan terjadi peningkatan pertumbuhan dibandingkan pada hari ke dua.

Pada Gambar 5 hari ke enam, perlakuan dengan perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (0:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis* mengalami penurunan yang signifikan. Diduga pada perlakuan ini sudah memasuki fase penurunan populasi atau fase kematian. Pada saat medium kehabisan nutrisi

maka populasi bakteri akan menurun jumlahnya, Pada saat ini jumlah sel yang mati lebih banyak daripada sel yang hidup (Kusnadi, dkk., 2011). LCPKS dan Air Kelapa mengandung berbagai senyawa terlarut termasuk serat-serat pendek, hemiselulosa dan turunannya, protein, asam organik dan campuran mineral yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber makanan untuk proses pertumbuhan *B. thuringiensis*. Sedangkan pada perlakuan tersebut yang hanya terdapat Air kelapa dan ekstrak *L. camara* saja meskipun pertumbuhannya pada hari ke empat peningkatannya lebih tinggi di bandingkan perlakuan lain, namun pada hari ke enam terjadi penurunan yang diduga akibat sedikitnya nutrien yang tersisa sebagai sumber makanan bakteri.

5. Perubahan Zat Padat Terlarut (TDS)

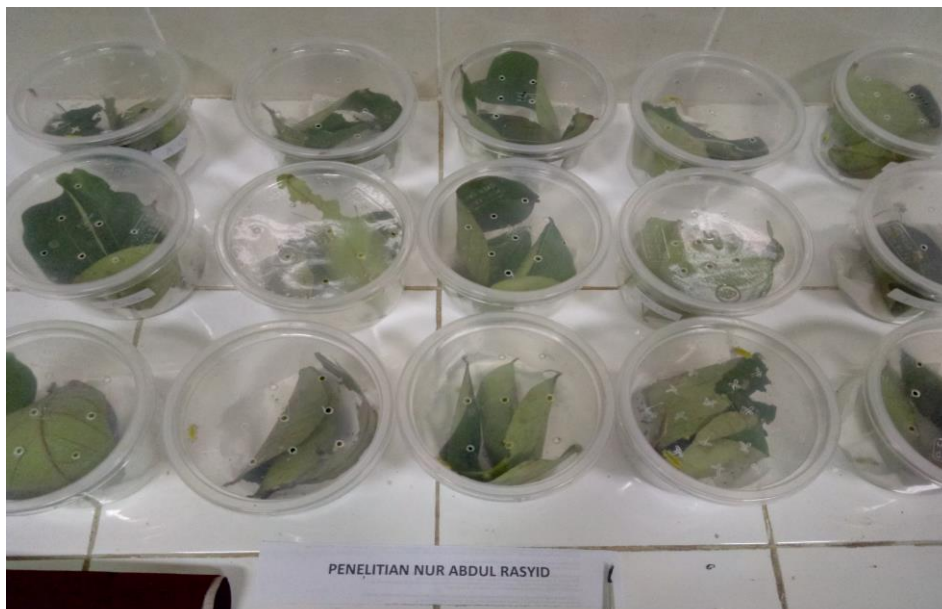
Total Dissolve Solid (TDS) adalah ukuran zat terlarut (baik itu zat organik maupun anorganik, misalnya garam dan sebagainya) yang terdapat pada sebuah larutan. TDS meter menggambarkan jumlah zat terlarut dalam *Part Per Million* (PPM) atau sama dengan miligram per Liter (mg/L).

Berdasarkan data hasil sidik ragam pada Tabel 4 menunjukkan adanya peningkatan nilai TDS yang didapat dengan nilai TDS tertinggi pada perlakuan perbandingan media alami LCPKS dan Air Kelapa (1:3) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*. Perubahan nilai TDS ini menunjukkan bahwa adanya perubahan senyawa – senyawa yang terkandung pada larutan dan terdegradasi selama proses fermentasi. Pada proses fermentasi terjadi pemecahan karbohidrat, asam amino dan lemak dengan bantuan enzim dari mikroba tertentu yang dapat menghasilkan asam organik, karbon dioksida dan zat – zat lainnya.

Proses fermentasi dapat menyebabkan perubahan pada sifat fisika maupun kimia bahan pangan yang meliputi kadar pati, kadar alkohol, total asam dan pH (Winamo, 2002). Menurut Doraja dkk, (2012) menunjukkan bahwa kenaikan nilai TDS menunjukkan bahwa bahan organik yang berukuran kecil belum terdegradasi secara sempurna menjadi gas dan adanya peningkatan mikroorganisme.

D. Uji *Bioassay* pada ulat api (*Setora nitens*)

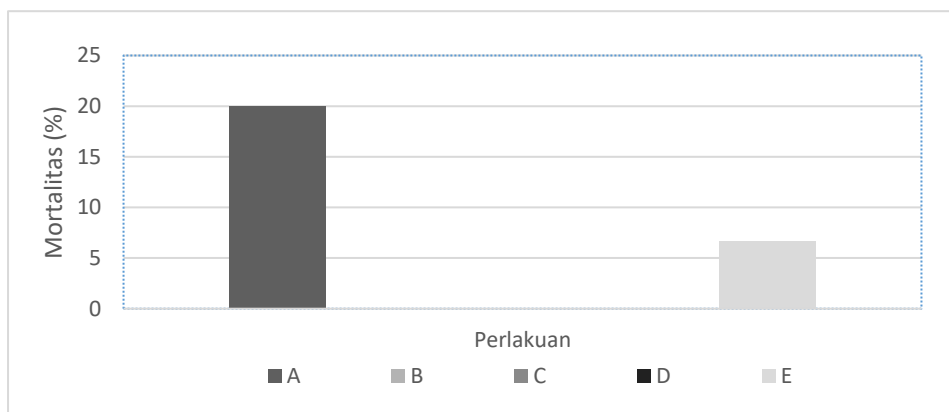
Uji *Bioassay* bertujuan untuk mengetahui toksisitas bioinsektisida terhadap ulat api (*Setora nitens*) instar 3. Parameter yang diamati yaitu tingkat mortalitas, kecepatan kematian hama, dan efikasi. Setiap perlakuan diaplikasikan pada 5 ekor ulat api yang ditempatkan dalam toples plastik berdiameter 10cm dengan masing – masing perlakuan diulang 3 kali (Gambar 6).



Gambar 6. Uji *Bioassay* pada ulat api (*Setora nitens*)

1. Mortalitas

Mortalitas hama *S. nitens* pada pengujian dengan larutan Limbah Cair Pabrik Kelapa Sawit (LCPKS) dengan *Lantana camara* dan *Bacillus thuringiensis* dengan 5 perlakuan : (A) LCPKS : Air Kelapa (1:0), (B) LCPKS dan Air Kelapa (3:1), (C) LCPKS dan Air Kelapa (1:1), (D) LCPKS dan Air Kelapa (1:3), (E) LCPKS dan Air Kelapa (0:1) pada konsentrasi 100% menunjukkan hasil seperti pada Gambar 7.



Gambar 7. Mortalitas hama ulat api (*Setora nitens*) dihari ke empat
Keterangan:

- A. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:0) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- B. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (3:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- C. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- D. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:3) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- E. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (0:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*

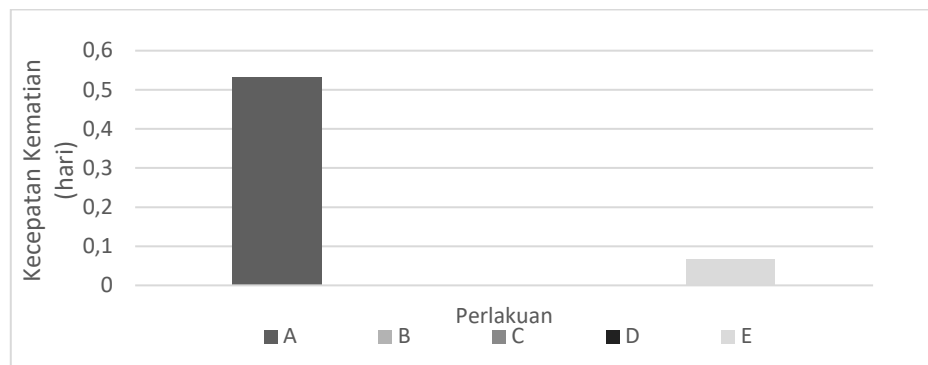
Hasil mortalitas yang dipaparkan pada Gambar 7 menunjukkan bahwa daya bunuh Bioinsektisida larutan LCPKS dengan *L. camara* dan *B. thuringiensis* tidak memiliki daya bunuh seperti yang diinginkan. Namun hasil penelitian Dwi Wahyuono (2015), dengan LCPKS 100 % + 0,4 g gula merah + 30 ml air kelapa + *B. thuringiensis* karena dapat meningkatkan nilai mortalitas lebih tinggi yakni 66,6

%, kecepatan kematian 4,6 (hari) perubahan persentase populasi 66,6 %, hambatan makan 41,1. Sedangkan pada penelitian ini mortalitas hama ulat api hanya 40% saja. Hal ini diduga terjadi karena virulensi atau tingkat keganasan bakteri yang sudah menurun yang disebabkan oleh isolat bakteri *Bacillus thuringiensis* yang digunakan merupakan stok lama dan sudah mengalami beberapa kali peremajaan sebelumnya.

2. Kecepatan kematian

Kecepatan kematian menunjukkan jumlah ulat yang mati dalam satuan waktu tertentu. Kematian ulat api berlangsung relatif lambat, dan kematian paling banyak terjadi pada hari ke enam. Sama seperti halnya pada hasil uji mortalitas, kecepatan kematian hama ulat api yang didapatkan tidak sesuai seperti apa yang diharapkan selain itu kecepatan kematian juga sangat dipengaruhi oleh tingkat mortalitas yang didapat, sehingga kedua parameter ini cenderung berbanding lurus. Pada Gambar 8 dari kelima perlakuan hanya perlakuan dengan perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:0) yang menunjukkan adanya pengaruh pemberian formula LCPKS dan Air Kelapa dengan Fermentasi *B. thuringiensis* + *L. camara* .

Adapun data kecepatan kematian hama ulat api yang diperoleh dalam bentuk grafik batang terdapat pada Gambar 8.



Gambar 8. Kecepatan kematian hama ulat api (*Setora nitens*)

Keterangan:

- A. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:0) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- B. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (3:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- C. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- D. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:3) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- E. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (0:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*

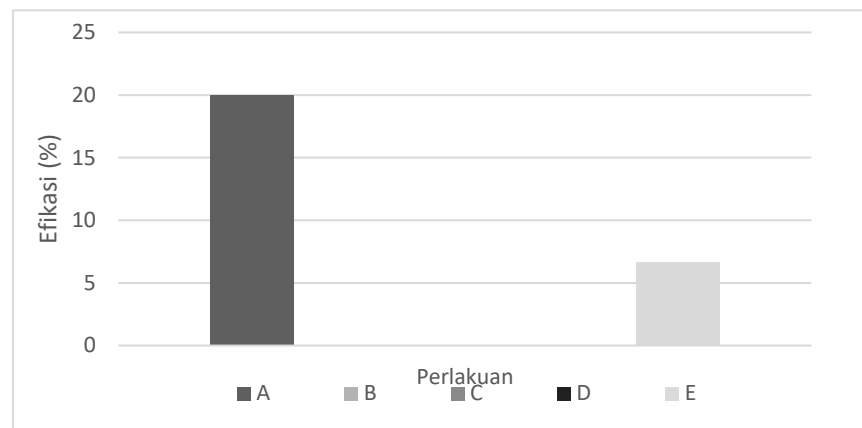
Lambatnya kecepatan kematian ulat api dikarenakan bakteri yang digunakan ialah bakteri *Bacillus thuringiensis*. Menurut Asliahalyas (2013) *B. thuringiensis* adalah bakteri yang menghasilkan kristal protein yang bersifat membunuh serangga (*insektisidal*) sewaktu mengalami proses sporulasinya. Kristal protein yang bersifat insektisidal ini sering disebut dengan endotoksin. Kristal ini sebenarnya hanya merupakan protoksin yang jika larut dalam usus serangga akan berubah menjadi poli-peptida yang lebih pendek (27- 149 kd) serta mempunyai sifat insektisidal. Pada umumnya kristal *B. thuringiensis* di alam bersifat protoksin, karena adanya aktivitas proteolisis dalam sistem pencernaan serangga dapat mengubah Bt-protoksin menjadi polipeptida yang lebih pendek dan bersifat toksin. Toksin dari bakteri ini bersifat sistemik sehingga memerlukan waktu untuk dapat meracuni hama target hingga mati. Waktu yang dibutuhkan juga

berbeda – beda sesuai ketahanan dari serangga atau hama target itu sendiri. Menurut penelitian Sudono, dkk. (2007) Dilihat dari waktu letal kelima jenis binatang terhadap bakteri *B. thuringiensis* varietas *Aizawai*, *Kurstaki* dan jamur *Beauveria bassiana*, maka bekicot merupakan binatang yang paling tahan (resistan) disusul dengan ulat bambu, jangkrik, belalang dan yang paling rentan adalah rayap. Ulat api (*Setora nitens*) memiliki daya tahan yang cukup kuat dibandingkan dengan ulat lain seperti *Spodoptera litura* Sp. dikarenakan ulat api memiliki kondisi fisik lebih kuat, kulitnya yang cukup tebal mengakibatkan bakteri *B. thuringiensis* memerlukan waktu yang lebih lama untuk dapat menembusnya hingga dapat masuk ke pencernaan ulat ini.

3. Efikasi

Uji efikasi merupakan salah satu cara penilaian terhadap penampilan suatu jenis pestisida di lapangan. Uji ini, meskipun sebagian kecil dari berbagai uji lainnya yang harus dijalani oleh suatu jenis pestisida sebelum dapat dipergunakan dan secara resmi dan legal, adalah uji yang sangat penting dalam menentukan ijin pendaftaran dan peredaran pestisida di suatu negara. Uji efikasi dipergunakan untuk mengukur kemanjuran suatu pestisida terhadap jenis sasaran jasad pengganggu tertentu. Efektivitas suatu jenis pestisida ditentukan oleh kemampuan menurunkan populasi jasad pengganggu di suatu lahan pertanian (Martono Edhi, 1999). Penghitungan efikasi dihitung sesuai dengan data pengamatan yang didapatkan dan telah dihitung dalam uji mortalitas.

Berdasarkan data yang tersaji pada Gambar sembilan, hasil uji efikasi ini menunjukkan bahwa keefektifitasan formula yang rendah terhadap penurunannya populasi serangga pengganggu tanaman (Gambar 9).



Gambar 9. Uji Efikasi pada hama ulat api (*Setora nitens*)

Keterangan:

- A. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:0) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- B. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (3:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- C. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- D. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:3) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*
- E. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (0:1) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis*

Seperti hasil perhitungan mortalitas yang diperoleh sebelumnya, perhitungan efikasi ini dipengaruhi oleh hasil mortalitas yang didapat. Maka dari itu dapat dikatakan bahwa penyebab rendahnya ketiga parameter ini sama, yakni rendahnya virulensi dari isolat bakteri yang digunakan, sehingga bakteri yang digunakan untuk menyerang hama target sudah tidak dalam keadaan yang optimal.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dan berdasarkan hasil pengamatan dari seluruh parameter didapatkan hasil bahwa Bakteri *Bacillus thuringiensis* yang dikembangkan dalam media alami formulasi LCPKS dan air kelapa dengan *Lantana camara* pada perlakuan dengan perbandingan LCPKS dan air kelapa (0:1) menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri terbaik dilihat dari kurva pertumbuhannya (Gambar 5). Akan tetapi pertumbuhannya di hari ke enam menurun signifikan. Bila dibandingkan dengan perlakuan lainnya yang hasilnya cenderung meningkat, dimana dapat dikatakan jika bakteri pada perlakuan lain dapat bertahan hidup ataupun berkembang lebih baik namun dalam waktu yang lebih lama. Sebaliknya, perlakuan dengan perbandingan media alami LCPKS dan air kelapa (0:1) meskipun hasil pertumbuhan koloni bakteri pada hari ke empat melonjak tinggi akan tetapi di hari ke enam menurun drastis, apabila hal ini terjadi karena faktor nutrisi yang terdapat pada media dengan perbandingan LCPKS dan air kelapa (0:1) yang tanpa menggunakan LCPKS pada formulanya, maka LCPKS memiliki peran dalam menyediakan sumber vitamin untuk pertumbuhan *B. thuringiensis*. *Bacillus thuringiensis* pun terbukti dapat membantu proses penguraian *L. camara* dengan baik, selain menggunakan nutrisi pada *L. camara* sebagai sumber vitaminnya juga *B. thuringiensis* membantu mengeluarkan senyawa – senyawa aktif yang dapat berguna sebagai bahan aktif biopestisida dari dalam *L. camara*. Terbukti dengan adanya perubahan fisik pada saat proses fermentasi, dari semula warnanya yang kehijauan berubah menjadi hitam kecoklatan, aromanya pun menjadi semakin kuat dan saat dimasukkan ke dalam kemasan botol plastik terdapat tekanan udara dari dalam. Hal ini menunjukkan adanya kandungan alkohol pada

larutan. Senyawa Alkohol tersebut dihasilkan dari proses fermentasi *L. camara* . Hasil uji *Bioassay* yaitu Mortalitas, kecepatan kematian, dan efikasi merupakan parameter yang saling berkaitan, sehingga tiap – tiap parameter saling berpengaruh satu dengan yang lainnya terutama mortalitas. Dari ketiga parameter tersebut tingkat mortalitas merupakan titik awal untuk mendapatkan data yang lainnya. Pada tingkat mortalitas didapat bahwa perlakuan dengan perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:0) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis* memiliki nilai terbaik dari perlakuan lainnya pada ketiga parameter. Akan tetapi bukan tidak bisa dikatakan bila perlakuan lainnya tidak baik, karena setiap perlakuan menggunakan isolat bakteri yang sama sehingga hasil yang diperoleh pun tidak jauh berbeda antara perlakuan lainnya.

Selain tingkat virulensi, diduga adanya pengaruh dari masa simpan larutan yang dapat mengurangi daya bunuh formula *biopestisida* ini. Menurut Zafar *et al.* (2000) Formula *B. thuringiensis* didapatkan stabil dan aktif selama penyimpanan laboratorium hingga 36 bulan. Toksisitas setelah 6 – 36 bulan dari penyimpanan lab berkurang hanya 6 – 10% melawan *Helicoverpa armigera*. Sedangkan formula yang digunakan pada penelitian ini sudah disimpan selama 7 bulan di Laboratorium. Formula *biopestisida* disimpan pada lemari pendingin dengan suhu $\pm 6^{\circ}\text{C}$. Pada suhu ini *B. thuringiensis* akan memasuki fase dorman dimana bakteri menjadi tidak aktif dan akan aktif kembali saat suhu di sekitarnya sudah memungkinkan. Menurut Enviren (2009) *B. thuringiensis* bersifat gram positif, aerob, akan tetapi umumnya anaerob fakultatif, dapat tumbuh pada media buatan, sedangkan suhu untuk pertumbuhan berkisar antara $15^{\circ}\text{-}40^{\circ}\text{C}$. Adapun faktor lain yang tidak diketahui

dapat menjadi penyebab tingginya mortalitas pada perlakuan dengan perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:0) untuk Fermentasi *L. camara* dengan *B. thuringiensis* dan rendahnya mortalitas pada perlakuan lainnya.