

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Tahap 1 : Identifikasi dan Karakterisasi *Bacillus thuringiensis*

1. Sifat Koloni dan Sel Bakteri *Bacillus thuringiensis*

Identifikasi merupakan cara untuk mengetahui apakah inokulum mikrobial yang digunakan merupakan inokulum murni dan mempunyai daya toksik. Berikut merupakan hasil identifikasi dan karakterisasi *Bacillus thuringiensis* pada Tabel 1 dan Gambar 1.

Tabel 1. Karakterisasi *Bacillus thuringiensis*

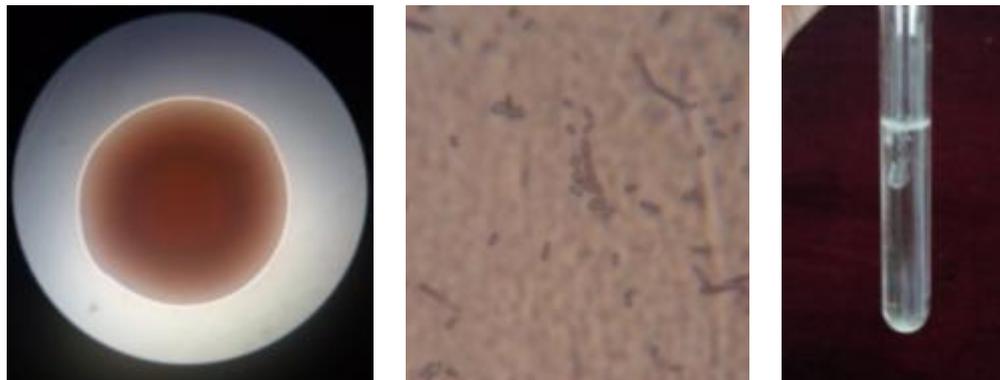
Tingkat	Parameter	Karakterisasi	Karakterisasi*
Koloni	Warna	<i>Cream</i>	<i>Cream</i>
	Bentuk koloni	<i>Circular</i>	<i>Circular</i>
	Bentuk elevasi	<i>Low convex</i>	<i>Low convex</i>
	Bentuk Tepi	<i>Entire</i>	<i>Convex rugose</i>
	Struktur dalam	<i>Coarsely granular</i>	<i>Coarsely granular</i>
Sel	Sifat gram	Positif	Positif
	Bentuk sel	Basil/batang	Basil/batang
	Aerobisitas	Aerob vakultatif	Aerob vakultatif

Keterangan : *Bergey's Manual (1930)

Hasil identifikasi dan karakterisasi *Bacillus thuringiensis* yang telah dilakukan didapatkan bakteri *Bacillus thuringiensis* dengan karakter warna, bentuk koloni, bentuk elevasi, bentuk tepi, struktur dalam, sifat gram, bentuk sel, dan aerobisitas yang sama dengan Bergey's Manual (1930).

Bakteri *Bacillus thuringiensis* merupakan salah satu bakteri patogen pada serangga. Ciri-ciri morfologi *B. thuringiensis* antara lain berwarna *cream*, bentuk koloni *circular*, elevasi *low convex*, bentuk tepi *convex rugose*, struktur dalam *coarsely granular*, sifat gram positif, bentuk sel batang, sifat aerobisitas aerob fakultatif (Astuti, 2017). Sel-sel bakteri mengandung satu kristal protein racun demikian juga dalam sporanya. Jika terlarut dalam tubuh serangga kristal ini

menyebabkan paralysis pada lambung (Howard, 1994). Spora yang dimiliki oleh bakteri *B. thuringiensis* berbentuk oval dan memiliki warna terang, memiliki ukuran 1,0 – 1,3 μm dengan posisi terminal, sedangkan kristal protein berukuran 0.6 sampai 2,0 μm bergantung dengan tipe masing-masing (Zeigler, 1999). Hasil pengamatan karakterisasi sel *B. thuringiensis* disajikan pada Gambar 1.



(a) Struktur koloni (b) Sifat Gram (c) Aerobisitas
Gambar 1. Hasil Identifikasi Koloni dan Sel Bakteri *Bacillus thuringiensis*

Berdasarkan hasil idenfifikasi dan karakterisasi bakteri *Bacillus thuringiensis* memiliki struktur koloni yang berbentuk oval dan berwarna terang. Koloni *Bacillus thuringiensis* memiliki ukuran 1,0 – 1,3 μm . Sifat gram yang dimiliki oleh bakteri *Bacillus thuringiensis* bersifat positif dengan ciri berwarna biru keunguan dan berbentuk basil pada pengujian dengan menggunakan cat gram. Sifat aerobisitas bakteri *Bacillus thuringiensis* yaitu aerob. Menurut Enviren (2009) sel-sel vegetatif *Bacillus thuringiensis* dapat membentuk suatu ikatan rantai yang terdiri dari 5-6 sel dengan sifat aerobisitas aerob tetapi umumnya anaerob fakultatif. Bakteri dengan sifat gram positif dinding selnya menyerap warna violet yang memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal (Carolin, 2018).

2. Uji Toksisitas *B. thuringiensis* terhadap *Plutella xylostella*

Pengujian toksisitas bakteri *Bacillus thuringiensis* diujikan pada larva *Plutella xylostella*. Pengaplikasian *Bacillus thuringiensis* dilakukan melalui makanan larva *Plutella xylostella* yaitu bunga kol. Bunga kol sebagai makanan dicelupkan pada suspensi isolat bakteri *Bacillus thuringiensis* yang telah diinkubasi selama 48 jam. Pencelupan bunga kol dilakukan selama 2 menit dan dibiarkan kering udara. Perlakuan pengujian dilakukan pada 5 larva *Plutella xylostella* dengan ulangan sebanyak 3 kali. Pengujian toksisitas bakteri *Bacillus thuringiensis* pada larva *Plutella xylostella* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Pengujian Toksisitas pada larva *Plutella xylostella*

Berdasarkan hasil pengujian toksisitas pada larva *Plutella xylostella* yang telah dilakukan menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus thuringiensis* mampu membunuh 100% larva *Plutella xylostella* dalam waktu 6 hari. Menurut Howard (1994) ulat yang terserang *B. thuringiensis* menjadi malas, bahkan menjadi tidak berwarna dan lemas. Setelah mati ulat api menghasilkan bau busuk. Sel-sel bakteri mengandung satu kristal protein racun demikian juga dalam sporanya. Jika terlarut dalam tubuh serangga kristal ini menyebabkan paralysis pada lambung.

Hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri *B. thuringiensis* tersebut dapat digunakan sebagai inokulum pembuatan biopestisida.

B. Tahap 2 : Fermetasi *L. camara* dan *B. Thuringiensis*

Formula biopestisida merupakan kultur mikronba yang diinokulasikan kedalam medium pembawa (*Carrier*). Pada saat kultur mikroba tersebut pada fase pertumbuhan dan berdaya bunuh. Bahan pembawa biopestisida yang disebut sebagai *Carrier* pada dasarnya merupakan suatu bahan yang mempunyai kesesuaian terhadap mikroba yang dibawanya, sehingga harus dapat mengaktifkan dan menjadi tempat pertumbuhan bagi mikroba sebelum diaplikasikan sebagai biopestisida (Putrina dan Fardedi, 2007).

Fermentasi merupakan proses terjadinya penguraian senyawa-senyawa organik yang menghasilkan energi serta terjadinya pengubahan substrat menjadi produk baru oleh mikroba (Madigan, 2011). Menurut Benhard dan Utz (1993) faktor yang mempengaruhi proses fermentasi adalah zat makanan, pH, air, oksigen, dan senyawa penghambat pertumbuhan. Proses fermentasi *B. thuringiensis* dan *L. camara* menggunakan media alami LCPKS dan Air Kelapa disajikan pada gambar 3.



Gambar 3. Fermentasi *B. thuringiensis* dan *L. camara* pada media alami LCPKS dan air kelapa

Media alami yang digunakan dalam proses fermentasi yaitu Limbah Cair Pabrik Kelapa Sawit (LCPKS) dan air kelapa. LCPKS merupakan nutrisi yang kaya akan senyawa organik dan karbon, dekomposisi dari senyawa-senyawa organik oleh bakteri anaerob dapat menghasilkan biogas (Deublein dan Steinhauser, 2008). Menurut hasil penelitian Dwi Wahyuono (2015) Penggunaan media alami LCPKS 100 % + 0,4 g gula merah + 30 ml air kelapa + *B. thuringiensis* mampu memberikan hasil terbaik sebagai bioinsektisida hayati karena dapat meningkatkan nilai mortalitas lebih tinggi yakni 66,6 %, kecepatan kematian 4,6 (hari) perubahan persentase populasi 66,6 %, dan hambatan makan 41,1 %.

1. Perubahan Fisik Media Alami LCPKS dan Air Kelapa Selama Fermentasi

Fermentasi *Bacillus thuringiensis* dan *L. camara* menggunakan media pertumbuhan alami LCPKS dan air kelapa. Proses fermentasi menggunakan seperti bakteri memerlukan media pertumbuhan yang mempunyai nilai nutrisi. Kandungan senyawa pada *L. camara* berupa senyawa *lantadene A*, *lantadene B*, *lantanollic acid*, *lantic acid*, dan minyak atsiri dapat dikeluarkan melalui proses fermentasi. Menurut Alavie (2017) konsentrasi *L. camara* 10% dengan lama fermentasi 6 hari efektif mengendalikan hama ulat api dengan tingkat mortalitas 80%. Penelitian yang dilakukan Rasyid (2018) menggunakan media alternatif Limbah Cair Pabrik Kelapa Sawit (LCPKS) dan air kelapa dengan perbandingan 1:3 merupakan perbandingan yang paling efektif dalam memperbanyak *B. thuringiensis* yang difermentasikan dengan *L. camara* untuk mengendalikan ulat api pada kelapa sawit. Proses fermentasi yang dilakukan pada penelitian ini yaitu

menggunakan media alternatif berupa Limbah Cair Pabrik Kelapa Sawit (LCPKS) dan air kelapa yang difermentasikan selama 6 hari. Menurut Sjamsuriputra *et al.* (1984) *B. thuringiensis* dalam pertumbuhannya membutuhkan air, karbon, energi, nitrogen, elemen mineral dan faktor pertumbuhan (suhu, pH, dan aerasi). Pada proses fermentasi yang dilakukan terdapat beberapa perubahan fisik yang terjadi diantaranya perubahan suhu, pH, warna, aroma, dan total padatan terlarut. Hasil perubahan fisik selama fermentasi disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Perubahan Fisik Media Alami LCPKS dan air kelapa dengan *Bacillus thuringiensis* dan *Lantana Camara*

Parameter	H-0	H-6	H-0 *	H-6 *
Suhu (°C)	26,7	28	28,67	28
pH	6,57	4,27	6,73	4,10
Warna	3/3 2,5 Y (Dark olive brown)	3/3 10YR (Dark brown)	3/3 2,5 Y (Dark olive brown)	3/3 10YR (Dark brown)
Aroma	Daun Segar	Menyengat	Daun Segar	Menyengat
TDS (ppm)		654 ppm		740ppm

Keterangan : H-0 = Sebelum fermentasi
H-6 = Setelah fermentasi
*(Rasyid, 2018)

Pengamatan perubahan fisik selama fermentasi yang dilakukan yaitu pada awal fermentasi dan akhir fermentasi. Selama proses fermentasi *Lantana camara* dan *Bacillus thuringiensis* dengan media alami LCPKS dan air kelapa terdapat perubahan fisik berupa suhu, pH, warna, aroma, dan total padatan terlarut.

a. Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi terjadinya proses fermentasi. Dalam proses fermentasi setiap mikrobia mempunyai tingkat fluktuasi yang berbeda. Tingkat fluktuasi yang baik mampu mempengaruhi pertumbuhan

dan reproduksi organisme. Pada suhu yang optimal suatu organisme dapat tumbuh dengan baik dan mampu memperbanyak diri dengan cepat.

Berdasarkan hasil pengukuran suhu yang dilakukan pada awal fermentasi dan akhir fermentasi dapat dilihat pada Tabel 2. Pada awal fermentasi hasil pengukuran suhu menunjukkan angka 26,7°C dan pada akhir fermentasi menunjukkan angka 28°C. Hal tersebut menunjukkan terjadi peningkatan suhu pada proses fermentasi yang berlangsung pada 6 hari fermentasi. Perubahan suhu yang terjadi dikarenakan terdapat aktivitas enzim yang mengalami respirasi. Menurut Enviren (2009) bakteri *Bacillus thuringiensis* dapat tumbuh pada media buatan dengan suhu optimum pertumbuhan yaitu berkisar antara 26° - 37° C. Pada kisaran suhu tersebut bakteri mampu berkembang secara maksimal. Pada suhu yang lebih rendah minimum atau lebih tinggi maksimum maka pertumbuhan bakteri akan melambat bahkan dapat terhenti, komponen sel menjadi tidak aktif dan mengakibatkan kematian sel-sel.

Penelitian sebelumnya pada fermentasi *B. thuringiensis* dan *L. camara* menggunakan media fermentasi yang sama yaitu LCPKS dan air kelapa terjadi penurunan suhu akhir fermentasi dibandingkan dari awal fermentasi. Wahyuono (2015) menyebutkan bahwa setiap penurunan suhu 8°C akan membuat kecepatan reaksi berkurang menjadi setengahnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada proses fermentasi yang telah dilakukan pada penelitian kali ini mempunyai kualitas yang lebih baik dibandingkan penelitian yang sebelumnya.

b. pH

Pertumbuhan suatu mikrobia sangat diengaruhi oleh keadaan lingkungan pertumbuhan mikroba tersebut (Pelczar dan Chan, 2006). Suatu mikroorganisme mempunyai pH optimal tersendiri karena mempunyai kepekan terhadap perubahan pH. Menurut Judoamidjojo (1989) pH dapat mempengaruhi kinerja membran sel, enzim, dan komponen lainnya. Selain itu dapat mempengaruhi permeabilitas dinding sel dan laju reaksi enzim ekstraseluler.

Berdasarkan pengukuran pH yang dilakukan pada awal fermentasi dan akhir fermentasi terdapat perbedaan nilai pH. Nilai pH pada awal fermentasi sebesar 6,47 dan setelah dilakukan fermentasi selama 6 hari nilai pH pada akhir fermentasi sebesar 4,10. Pada Tabel 2 menunjukkan adanya penurunan pH selama proses fermentasi yang disebabkan adanya aktifitas mikroorganisme. Pada saat fermentasi terjadi pendegradasian mikroorganisme sehingga menyebabkan adanya peruraian asam organik yang menyebabkan penurunan pH. Asam-asam organik seperti asam laktat, piruvat, dan asetat dapat terbentuk selama proses fermentasi (Said, 1987). Hidrolisis senyawa organik terjadi dimana ion hydrogen 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.

Pengamatan perubahan fisik media alami LCPKS dan air kelapa yang difermentasi dengan *Bacillus thuringiensis* dan *Lantana camara* mempunyai kesamaan terhadap penelitian sebelumnya. Pada penelitian sebelumnya yang telah

dilakukan oleh Rasyid (2018) pH mengalami penurunan yang ditandai dengan nilai pH yang lebih rendah. Pada penelitian tersebut terdapat penurunan pH pada akhir proses fermentasi. Setiap mikroorganisme mempunyai kisaran pH tertentu dalam pertumbuhannya dan juga pH optimum sehingga dapat berkembang secara maksimal. Pertumbuhan mikroorganisme umumnya tumbuh pada pH 5,5 – 8,5. Namun pada mikroorganisme bakteri pH optimum pertumbuhannya 6,5-7,5 atau pada pH netral (Benhard dan Utz, 1993).

c. Warna

Proses fermentasi terjadi ketika terdapat kegiatan atau aktivitas mikroba yang merombak senyawa – senyawa organik untuk menghasilkan energi serta terjadi pengubahan substrat menjadi produk baru oleh mikroba. Selama proses fermentasi terjadi perubahan fisik akibat aktivitas dari mikroba, diantaranya terjadinya perubahan warna.

Pengamatan perubahan fisik media alami LCPKS dan air kelapa yang difermentasi dengan *Bacillus thuringiensis* dan *Lantana camara* diantaranya perubahan warna. Pengamatan dilakukan pada awal fermentasi dan akhir fermentasi. Pada awal fermentasi (hari ke 0) memiliki warna *Dark Olive Brown* dan terdapat perubahan warna pada akhir fermentasi (hari ke 6) menjadi warna *Dark brown*. Terjadinya perubahan warna pada proses fermentasi dikarenakan adanya perubahan dari daun *L. camara* yang dipengaruhi oleh media LCPKS dan air kelapa. Pada daun *L. camara* terdapat kandungan klorofil yang berwarna hijau. Warna hijau daun tersebut terdegradasi selama proses fermentasi yang berlangsung dan mengakibatkan kehilangan zat hijau daun sehingga terjadi

pencoklatan (*browning*). Hal tersebut sesuai dengan pendapat Astuti dan Trisnawati (2017) yang menunjukkan bahwa pada proses fermentasi terjadi reaksi pencoklatan yang melibatkan perubahan senyawa dalam jaringan dari bentuk kuinol menjadi kuinon melalui proses oksidasi.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan terdapat perubahan warna pada proses fermentasi. Sama halnya dengan penelitian yang dilakukan oleh Rasyid (2018) mengenai media alami fermentasi *B. thuringiensis* dan *L. camara* terdapat perubahan warna yang dihasilkan dari proses fermentasi. Perubahan warna yang terjadi yaitu dari *Dark Olive Brown* dan pada akhir fermentasi menjadi warna *Dark brown*.

d. Aroma

Tembelean merupakan gulma beracun dan berbau sangat menyengat. Kandungan tersebut dapat dimanfaatkan sehingga mampu membunuh secara kontak berbagai jenis ulat daun. Menurut Pramono 1999, daun tembelean (*L. camara*) memiliki kandungan senyawa kimia seperti *lantadene A*, *lantadene B*, *lantanollic acid*, *lantic acid*, *beta- caryophyllene*, *gamma-terpidene*, *alpha-pinene*, *p-cymene*, dan minyak atsiri (berbau menyengat yang tidak disukai serangga). Pada proses fermentasi terdapat proses oksidasi yang mengakibatkan pembusukan. Hasil pengamatan perubahan fisik berupa aroma terdapat pada Tabel 2.

Berdasarkan hasil pengamatan yang terapat pada tabel 2 menunjukkan terjadinya perubahan aroma selama proses fermentasi berlangsung. Pada awal fermentasi aroma yang ditimbulkan yaitu aroma daun segar yang berasal dari daun

Lantana camara. Setelah dilakukan fermentasi selama 6 hari aroma yang dihasilkan lebih menyengat. Hal tersebut disebabkan oleh adanya proses degradasi yang mengakibatkan pembusukan pada saat fermentasi. Pada saat fermentasi *Bacillus thuringiensis* yang merupakan bakteri proteolitik dapat digunakan untuk memecah protein. Menurut Susanti (2003) melalui sistem enzim yang kompleks *Bacillus thuringiensis* mampu memecah protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana. Protein yang dipecahkan akan menimbulkan bau busuk yang menyengat. Hasil pengamatan perubahan fisik berupa perubahan aroma sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Rasyid (2018) yang menyatakan terjadi perubahan aroma pada saat fermentasi dengan awal mula memiliki aroma daun segar menjadi beraroma yang menyengat.

e. Total Padatan Terlarut (TDS)

TDS (*Total Dissolved Solid*) merupakan jumlah zat padat terlarut baik berupa ion-ion organik, senyawa, maupun koloid didalam air (WHO, 2003). Nilai TDS menunjukkan seberapa besar kandungan zat terlarut yang terkandung pada suatu cairan. Pengukuran total zat padat terlarut dilakukan dengan menggunakan alat berupa TDS meter yang dilakukan pada awal proses fermentasi (Hari ke 0) dan akhir fermentasi (Hari ke 6). Hasil pengamatan fisik TDS disajikan pada tabel 2.

Berdasarkan pengamatan yang telah dilakukan pada Tabel 2 menunjukkan adanya perubahan nilai TDS pada awal fermentasi dan setelah 6 hari dilakukan fermentasi. Selama proses fermentasi berlangsung terjadi peningkatan nilai TDS. Peningkatan nilai TDS yang terjadi yaitu 654 ppm. Menurut Paramita dkk. (2012)

adanya proses degradasi dapat ditunjukkan dengan semakin menurunnya nilai TDS, semakin kecil perubahan nilai TDS menunjukkan semakin kecil proses degradasi yang terjadi. Peningkatan nilai TDS, dapat disebabkan karena adanya proses pemecahan bahan organik yang tadinya merupakan *suspended solid* menjadi berukuran lebih kecil. Seharusnya, meskipun terdapat bahan organik yang belum terdegradasi, nilai TDS tetap mengalami penurunan karena bahan organik tersebut digunakan mikroorganisme sebagai sumber energi. Pada penelitian ini, nilai TDS yang meningkat diduga karena proses penggunaan bahan organik sebagai sumber energi oleh mikroorganisme belum sempurna.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan terdapat perubahan nilai TDS pada proses fermentasi. Sama halnya dengan penelitian yang dilakukan oleh Rasyid (2018) mengenai media alami fermentasi *B. thuringiensis* dan *L. camara* terdapat perubahan nilai TDS yang dihasilkan dari proses fermentasi. Perubahan nilai TDS yaitu mengalami peningkatan. Pada penelitian yang dilakukan peningkatan nilai TDS yang terjadi sebesar 654 ppm sedangkan pada penelitian Rasyid (2018) terjadi peningkatan nilai TDS sebesar 740 ppm. Terjadinya peningkatan nilai TDS dikarenakan terjadinya proses pemecahan senyawa organik menjadi bagian yang lebih kecil.

C. Tahap 3. Ekstraksi Padatan Hasil Fermentasi *L. camara* dan *B. thuringiensis*

Ekstraksi menggunakan pelarut merupakan salah satu cara yang dapat dilakukan untuk pengambilan senyawa metabolit sekunder. Ekstraksi menggunakan suhu tinggi akan mengakibatkan beberapa komponen rusak, namun dengan menggunakan suhu tinggi ekstraksi dapat mempersingkat waktu (Harbone, 1987).

Proses ekstraksi yang dilakukan pada padatan hasil fermentasi *L. camara* dan *B. thuringiensis* sebelumnya dilakukan maserasi menggunakan pelarut Aseton. Menurut Cahyani (2017) aseton merupakan pelarut terbaik untuk ekstraksi padatan hasil fermentasi *B. thuringiensis* dan *L. camara* karena mempunyai rendemen tertinggi yaitu 15%. Pengamatan tahap ekstraksi yang dilakukan diantaranya:

1. Berat Padatan Hasil Fermentasi

Padatan hasil fermentasi merupakan produk sampingan dari hasil fermentasi. Padatan fermentasi didapatkan dari penyaringan hasil fermentasi menggunakan saringan. Pada penelitian yang telah dilaksanakan pembuatan larutan fermentasi *B. thuringiensis* dan *L. camara* sebanyak 6000 ml menggunakan media LCPKS dan air kelapa dengan perbandingan 3:1. Menurut Rasyid (2018) perbandingan media fermentasi LCPKS dan air kelapa 3:1 merupakan perbandingan terbaik untuk memperbanyak *B. thuringiensis* yang difermentasi dengan *L. camara*. Dari hasil fermentasi selama 6 hari didapatkan padatan sebanyak 1140 gram atau 19% dari larutan fermentasi melalui proses penyaringan. Pengukuran berat padatan dilakukan untuk menentukan jumlah pelarut yang dibutuhkan. Padatan hasil fermentasi kemudian dimaserasi menggunakan pelarut Aseton dengan perbandingan 1:5. Jumlah pelarut aseton yang digunakan sebanyak 5.680 ml (Lampiran 8a). Aseton dengan perbandingan 1:5 dapat menghasilkan rendemen sebesar 15% dari hasil ekstraksi padatan hasil fermentasi *B. thuringiensis* dan *L. camara* (Cahyani, 2017). Menurut Harbone

(1987) suatu senyawa akan mudah larut apabila dilarutkan dengan menggunakan pelarut yang memiliki nilai kepolaran yang sama.

Padatan hasil fermentasi yang telah disaring kemudian di maserasi dengan menggunakan aseton selama 24 jam. Setelah dilakukan maserasi larutan kemudian disaring menggunakan kertas saring untuk mendapatkan cairannya untuk dilakukan ekstraksi (Lampiran 8b).

2. Jumlah Cairan Hasil Ekstraksi

Pelarut dalam ekstraksi merupakan salah satu cara yang dapat digunakan untuk pengambilan senyawa metabolit sekunder. Pelarut yang digunakan pada proses maserasi yaitu Aseton dengan perbandingan 1:5. Total pelarut Aseton yang digunakan sebanyak 5.680 ml. Pelarut Aseton dipisahkan dengan senyawa yang diinginkan dengan melakukan ekstraksi menggunakan *Rotary Vacum Evaporator* (Lampiran 8b). Tujuan *Rotary Vacum Evaporator* yaitu untuk memekatkan ekstrak dan memisahkan senyawa metabolit dari pelarut Aseton. Proses pemekatan dilakukan pada suhu 45°C dan kecepatan 100 rpm. Menurut Khunafi (2010) pemekatan dengan *Rotary Vacum Evaporator* pada suhu 50°C meminimalisir meminimalisir kerusakan senyawa metabolit sekunder.

Pemekatan dengan labu berukuran 1 liter hanya diisi 800 ml untuk meminimalisir terjadinya semburan akibat mendidihnya larutan. Waktu yang dibutuhkan untuk melakukan pemekatan 800 ml menggunakan *Rotary Vacum Evaporator* yaitu 3 jam atau pada total ekstraksi 20% (hasil pengujian pendahuluan). Pengamatan hasil ekstraksi berupa pengamatan fisik yang dilakukan yaitu suhu, pH, warna, aroma, dan TDS. Suhu hasil ekstraksi sebesar

27,5°C, suhu tersebut sama dengan suhu ruangan yang ada pada saat pengamatan. Hasil ekstraksi memiliki pH sebesar 3,2 menunjukkan bahwa terdapat perombakan senyawa organik menjadi asam-asam organik. Menurut Purnawati, dkk. (2015) penurunan pH di bawah 5,5 mengakibatkan penurunan pertumbuhan sel dan spora pada *B. thuringiensis*.

Ekstraksi padatan menggunakan Aseton mengakibatkan perubahan warna menjadi warna *Dark Olive*. Perubahan warna tersebut diduga karena kandungan *flavonoid* yang dihasilkan oleh *L.camara*. Terbentuknya kandungan *flavonoid* dapat ditandai dengan larutan yang berwarna kuning sampai jingga (Maryono dkk., 2015). Aroma yang dihasilkan dari proses ekstraksi menghasilkan aroma yang menyengat karena keberadaan pelarut aseton yang mempunyai aroma yang tajam. Nilai TDS hasil ekstraksi mengalami penurunan 376 ppm menunjukkan adanya pendegradasian bahan organik.

D. Tahap 4 : Uji *Bioassay* Formula Cair Ekstrak *L. Camara* Setelah Difermentasi dengan *B. thuringiensis* dengan Hasil Ekstraksi Bahan Padatan.

1. Pembuatan Formula Cair Ekstrak *L. camara* Setelah Difermentasi dengan *B. thuringiensis* dengan Hasil Ekstraksi Bahan Padatan

Pengamatan formula kombinasi hasil fermentasi formula cair hasil fermentasi ditambah hasil ekstraksi padatan meliputi pengamatan fisika dan kimiawi, diantaranya:

a. Sifat Fisik

Pembuatan formula cair ekstrak *L. camara* setelah difermentasi dengan *B. thuringiensis* dengan hasil ekstraksi bahan padatan yaitu dengan mencampurkan cairan hasil fermentasi dengan hasil ekstraksi. Menurut Rasyid (2018) fermentasi

B. thuringiensis dan *L. camara* menggunakan media alami LCPKS dan air kelapa dengan perbandingan 3:1 merupakan media yang efektif untuk memperbanyak *B. thuringiensis*. Proses fermentasi *B. thuringiensis* dan *L. camara* menghasilkan produk berupa cairan dan padatan. Menurut Cahyani (2017) padatan hasil fermentasi *B. thuringiensis* dan *L. camara* yang diekstraksikan dengan pelarut Aseton mempunyai rendemen yang tinggi yaitu 15%. Maka diduga dengan mengkombinasikan cairan hasil fermentasi dengan hasil ekstraksi padatan merupakan kombinasi yang baik untuk digunakan sebagai biopestisida yang mempunyai daya bunuh yang tinggi.

Kombinasi formula cair hasil fermentasi dengan hasil ekstraksi yang digunakan yaitu 100 ml formula cair fermentasi dengan (5 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml, dan 25 ml) hasil ekstraksi padatan (Lampiran 10a). Perlakuan tersebut dicampurkan ke dalam wadah erlenmeyer dan dihomogenkan. Hasil pengamatan sifat fisik formula cair ekstrak *L. camara* setelah difermentasi dengan *B. thuringiensis* dengan hasil ekstraksi bahan padatan disajikan pada Tabel 3.

Hasil pengujian sifat fisik formula cair ekstrak *L. camara* setelah difermentasi dengan *B. thuringiensis* dengan hasil ekstraksi bahan padatan pada Tabel 3 menunjukkan beberapa perbedaan pada setiap perlakuan. Data hasil pengamatan suhu pada setiap perlakuan tidak terdapat perbedaan. Suhu pada semua perlakuan yaitu 27,5°C. Hal tersebut menunjukkan perlakuan kombinasi tidak mempengaruhi suhu dari setiap perlakuan. pH dari setiap perlakuan menunjukkan derajat keasaman yang dimiliki oleh larutan tersebut. Hasil pengamatan pH setiap perlakuan tidak terdapat perbedaan. Menurut Purnawati,

dkk. (2015) penurunan pH di bawah 5,5 mengakibatkan penurunan pertumbuhan sel dan spora pada *B. thuringiensis*.

Tabel 3. Sifat Fisik Formula Cair Ekstrak *L. camara* setelah Difermentasi dengan *B. thuringiensis* dengan Hasil Ekstraksi Bahan Padatan

Perlakuan	Suhu (°C)	pH	Warna	Aroma	TDS (ppm)
A	27,5	2,9	3/2 5Y (<i>Dark olive gray</i>)	Menyengat	1900 ppm
B	27,5	3,0	3/2 5Y (<i>Dark olive gray</i>)	Menyengat	2031 ppm
C	27,5	2,6	3/2 5Y (<i>Dark olive gray</i>)	Menyengat	2027 ppm
D	27,5	3,3	3/2 5Y (<i>Dark olive gray</i>)	Menyengat	2070 ppm
E	27,5	3,5	3/2 5Y (<i>Dark olive gray</i>)	Menyengat	1968 ppm

Keterangan :

- A. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi 5 ml.
- B. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi 10 ml.
- C. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi 15 ml.
- D. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi 20 ml.
- E. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi 25 ml.

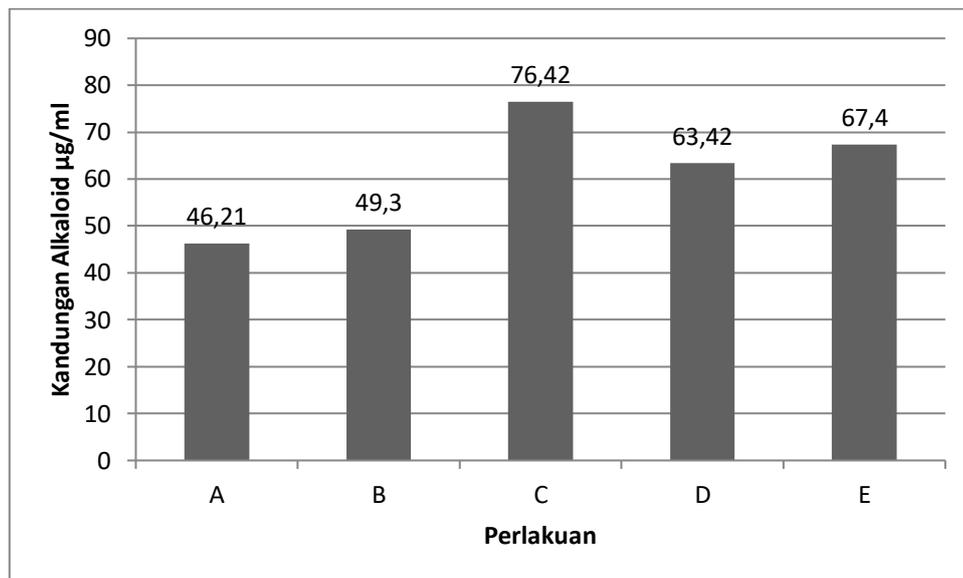
Warna yang dimiliki dari setiap perlakuan sama yaitu 3/2 5Y (*Dark Olive Grey*). Warna tersebut merupakan kombinasi warna yang dihasilkan dari kombinasi formula cair ekstrak *L. camara* setelah difermentasi dengan *B. thuringiensis* dengan hasil ekstraksi bahan padatan. Aroma yang dihasilkan dari kombinasi yaitu menyengat karena hasil formula cair hasil fermentasi yang beraroma menyengat dikombinasikan dengan pelarut Aseton sehingga aroma yang dihasilkan menyengat. Pengamatan fisik TDS menunjukkan perlakuan formula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi 20 ml mempunyai nilai TDS yang tertinggi yaitu 2070 ppm. Terjadinya peningkatan nilai TDS dikarenakan terjadinya proses pemecahan senyawa organik menjadi bagian yang lebih kecil.

b. Sifat Kimia

Tanaman Tembelekan (*Lantana camara*) mengandung *lantadine*, minyak atsiri, *flavonoid*, *alkaloid*, *saponin*, dan *tannin* yang memiliki bau menyengat dan memiliki potensi sebagai bahan penolak serangga (Purnawati, 2015). Menurut Muharram dkk. (2010) *alkaloid* merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman dan bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen. Kandungan bahan aktif *alkaloid* mampu meningkatkan daya bunuh formula biopestisida dengan meningkatkan permeabilitas dinding sel pencernaan dan mempermudah adanya zat toksik yang masuk. Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan untuk mengetahui senyawa yang terkandung pada biopestisida maka dilaksanakan pengujian fitokimia. Pengujian fitokimia dilakukan di Lembaga Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gajah Mada dengan hasil pada Gambar 4 dan 5.

Berdasarkan hasil uji fitokimia gambar 4 kandungan bahan aktif *alkaloid* pada masing masing perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Kandungan *alkaloid* yang tertinggi dimiliki oleh perlakuan formula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 15 ml sebesar 76,42 µg/mL. Sedangkan formula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 5 ml mempunyai kandungan *alkaloid* yang rendah yaitu 46,21 µg/mL. Tingginya kandungan *alkaloid* yang dimiliki oleh perlakuan tersebut menunjukkan adanya bahan aktif yang meningkatkan daya racun pada produk biopestisida. Tingginya kandungan *alkaloid* pada formula biopestisida tersebut didukung dengan jumlah mikorbia *B. thuringiensis*. Semakin banyak jumlah

bakteri *B. thuringiensis* maka kandungan bahan aktif *alkaloid* yang dikeluarkan dari dalam sel *L. camara* semakin banyak. Menurut Hartini dan Zulkifli (2010) kandungan senyawa toksik *tanin*, *alkaloid* dan *tripeptoid* pada ekstrak daun krinyu mengakibatkan menurunnya laju konsumsi dan efisiensi pencernaan serta merusak sistem syaraf serangga ulat api.



Keterangan :

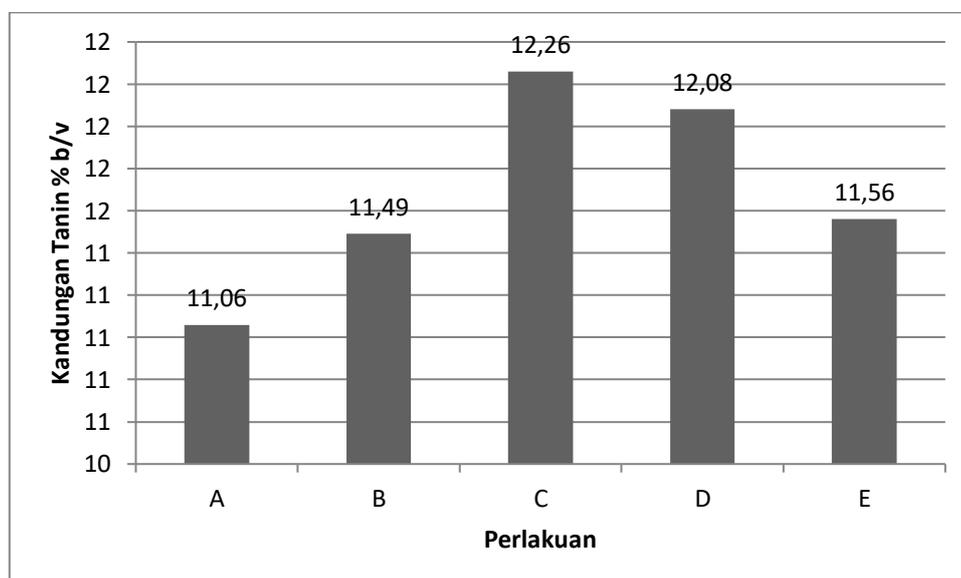
- A. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 5 ml.
- B. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 10 ml.
- C. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 15 ml.
- D. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 20 ml.
- E. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 25 ml.

Gambar 4. Kandungan *Alkaloid* pada Kombinasi Hasil Fermentasi Ditambah Hasil Ekstraksi Padatan

Berdasarkan total alkaloid pada gambar 4 dapat dilihat bahwa semakin banyak cairan hasil ekstraksi yang ditambahkan maka nilai total alkaloid yang dihasilkan semakin tinggi. Hal tersebut menunjukkan bahwa nilai alkaloid yang dihasilkan sebagian besar berasal dari proses ekstraksi. Sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Pramono (1999) *L. camara* merupakan sumber pestisida nabati karena mengandung bahan-bahan aktif seperti senyawa *alkaloid*

(*lantanine*), *flavanoid* dan juga *terpenoid*. Namun, pada formula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 20 ml mengalami penurunan jumlah *alkaloid* diduga karena adanya perombakan kandungan *alkaloid* oleh *B. thuringiensis* yang rendah.

Selain kandungan bahan aktif *Alkaloid* pada terdapat juga kandungan *tanin* pada simplisia *L. camara*. Menurut Mardiana (2009) kandungan senyawa *tannin* adalah senyawa fenolik yang merupakan polimerasi polifenol sederhana. Senyawa *tannin* pada tubuh organisme dapat menyebabkan terjadinya penyerapan air yang dapat mematikan. Terjadinya kekurangan air pada tubuh organisme tersebut dapat mengakibatkan dehidrasi dan ulat mati dalam keadaan kering. Kandungan *tanin* yang terdapat pada formula biopestisida disajikan pada Gambar 5.



Keterangan :

- Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 5 ml.
- Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 10 ml.
- Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 15 ml.
- Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 20 ml.
- Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 25 ml.

Gambar 5. Kandungan *Tanin* Kombinasi Hasil Fermentasi Ditambah Hasil Ekstraksi Padatan

Berdasarkan pada Gambar 5 hasil uji fitokimia *tanin* pada formula cair ekstrak *L. camara* setelah difermentasi dengan *B. thuringiensis* dengan hasil ekstraksi bahan padatan dapat diketahui kandungan *tanin* pada masing masing perlakuan. Kandungan *tanin* pada perlakuan formula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi 15 ml mempunyai kandungan *tanin* yang tinggi yaitu 12,26 %b/v. Tingginya kandungan *alkaloid* pada formula biopestisida tersebut didukung dengan jumlah mikorbia *B. thuringiensis*. Semakin banyak jumlah bakteri *B. thuringiensis* maka kandungan bahan aktif *alkaloid* yang dikeluarkan dari dalam sel *L. camara* semakin banyak. Sedangkan perlakuan formula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi 5 ml mempunyai total *tanin* yang rendah. Diduga sebagian besar kandungan *tanin* didapatkan dari hasil ekstraksi padatan karena semakin banyak jumlah cairan ekstraksi yang ditambahkan maka semakin tinggi nilai *tanin* yang dihasilkan. Menurut Hartini dan Zulkifli (2010) kandungan senyawa toksik *tanin*, *alkaloid* dan *tripeptoid* pada ekstrak daun tembelean mengakibatkan menurunnya laju konsumsi dan efisiensi pencernaan serta merusak sistem syaraf serangga ulat api. Kandungan senyawa toksik yang tinggi pada perlakuan tersebut menunjukkan kandungan racun yang dapat membunuh hama ulat api dan meningkatkan mortalitas hama ulat api.

Selain kandungan bahan aktif *alkaloid* dan *tanin* terdapat kandungan bahan aktif lain yang mampu terlarut melalui proses ekstraksi seperti *saponin* dan *flavonoid*. Penelitian yang telah dilakukan oleh Hidayati (2008) mendapatkan hasil bahwa seluruh bagian dari tanaman *L. camara* yang meliputi akar, daun, dan

buah mempunyai kandungan bahan aktif *saponin* dengan kadar yang bervariasi. Daun *L. camara* memiliki kandungan saponin tertinggi yaitu 66, 22 mg/g.

2. Populasi *Bacillus thuringiensis* (cfu/ml).

Populasi *Bacillus thuringiensis* merupakan jumlah bakteri *Bacillus thuringiensis* yang terdapat pada setiap tahapan pembuatan formula biopestisida. Perhitungan dinamika populasi *Bacillus thuringiensis* dimulai pada awal fermentasi, setelah dilakukan fermentasi, hasil ekstraksi, dan hasil kombinasi formula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi. Populasi *Bacillus thuringiensis* sebelum fermentasi hingga ekstraksi disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Populasi Pertumbuhan *Bacillus thuringiensis* Sebelum Fermentasi sampai Hasil Ekstraksi

Populasi	Jumlah Total <i>B. thuringiensis</i> 10 ⁶ cfu/ml
Sebelum Fermentasi	85
Setelah Fermentasi	83
Hasil Ekstraksi	111,3

Penghitungan jumlah populasi *B. thuringiensis* dilakukan bertujuan untuk mengetahui pertumbuhan *B. thuringiensis* selama proses fermentasi dan ekstraksi yang dilakukan dengan metode *Total Plat Count* yang dilakukan pada awal dilakukan fermentasi, hari ke 6 fermentasi, hasil ekstraksi, dan setelah dikombinasikan. Perhitungan ini dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan bakteri *B. thuringiensis* pada media media alami LCPKS dan air kelapa dengan *L. camara* selama proses pembuatan formula biopestisida. Penghitungan populasi koloni dilakukan dengan mengisolasi bakteri pada petridish dengan media Nutrient Agar dengan metode dekomposit. Setelah itu di inkubasi selama 48 jam (Lampiran 10a-b).

Perhitungan jumlah populasi *B. thuringiensis* diawali pada inokulum murni yang diamati pada awal dilakukan fermentasi. Jumlah populasi *B. thuringiensis* pada awal fermentasi berjumlah 85×10^6 cfu/ml. Pengamatan populasi *B. thuringiensis* selanjutnya dilakukan pada hari ke 6 setelah dilakukan fermentasi. Jumlah total *B. thuringiensis* yang terdapat pada akhir fermentasi yaitu 83×10^6 cfu/ml. Pada akhir fermentasi terjadi penurunan jumlah populasi *B. thuringiensis*. Terjadinya penurunan jumlah populasi *B. thuringiensis* salah satunya dikarenakan kondisi lingkungan yang tidak mendukung. Menurut Pelczar dan Chan (2006) suatu mikroorganisme mempunyai kepekaan terhadap perubahan pH yang mempengaruhi kinerja enzim, membran sel, dan komponen lainnya. Berdasarkan hasil pengamatan perubahan fisik berupa pH pada saat fermentasi *B. thuringiensis* dan *L. camara* pada hari ke 6 fermentasi nilai pH yaitu 4,27. Hal tersebut yang mempengaruhi penurunan jumlah mikroba pada hari terakhir fermentasi.

Jumlah populasi *B. thuringiensis* mengalami kenaikan jumlah populasi pada pengamatan setelah dilakukan ekstraksi (Lampiran 8c). Jumlah populasi *B. thuringiensis* pada hasil ekstraksi berjumlah $111,3 \times 10^6$ cfu/ml. Jumlah tersebut meningkat dibandingkan dengan hasil fermentasi. Sebelum dilakukan proses ekstraksi padatan hasil fermentasi direndam dengan menggunakan aseton dengan perbandingan 1:5 pada proses maserasi. Menurut Cahyani (2017) ekstraksi menggunakan aseton dengan perbandingan 1:5 merupakan pelarut yang baik karena senyawa yang terkandung mempunyai tingkat kepolaran yang sama dengan pelarut. Pada tingkat kepolaran yang sama maka senyawa yang akan larut

lebih banyak. Senyawa yang dikeluarkan oleh *L. camara* diantaranya *alkaloidslantanine*, *flavonoids* dan juga *tripernoids*. Selain kandungan bahan aktif terdapat juga nutrisi yang ikut dilekuarkan oleh perendaman dengan aseton. Senyawa nutrisi yang larut mampu mempengaruhi jumlah populasi *B. thuringiensis* dikarenakan kandungan tersebut dapat memberikan nutrisi bagi pertumbuhan *B. thuringiensis*.

Hasil ekstraksi padatan hasil fermentasi kemudian dikombinasikan dengan cairan hasil fermentasi. Berdasarkan data pada Tabel 5 menunjukkan tidak terdapat adanya beda nyata antar perlakuan, ditunjukkan dengan hasil sidik ragam dengan taraf kesalahan lebih dari 5% (Lampiran 5d). Populasi *B. thuringiensis* pada setiap perlakuan kombinasi disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Sidik Ragam Pertumbuhan *B. thuringiensis* pada kombinasi formula cair hasil fermentasi dan hasil ekstraksi padatan

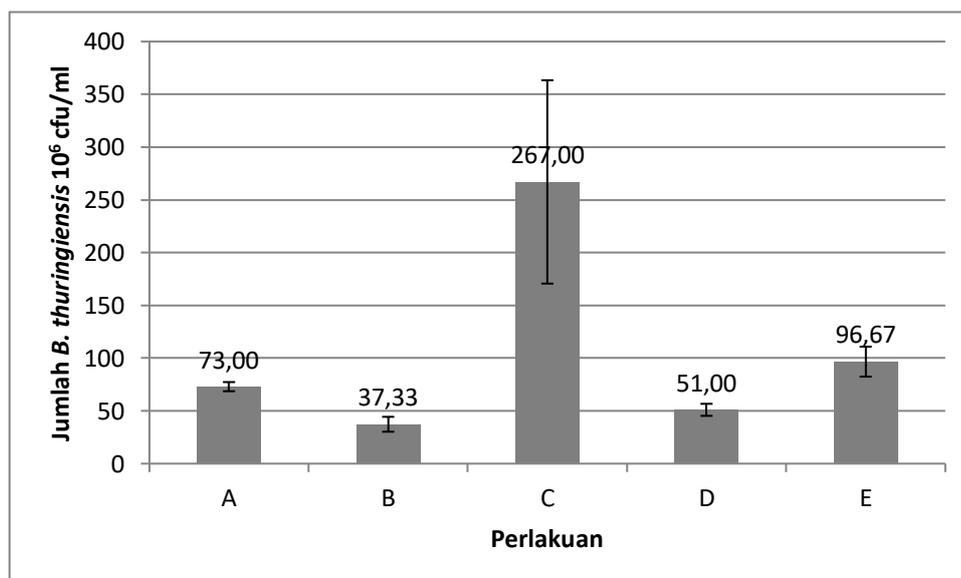
Perlakuan	Jumlah Total <i>B. thuringiensis</i> 10 ⁶ cfu/ml
A	73,00a
B	37,33a
C	267,00a
D	51,00a
E	96,67a

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

- A. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 5 ml.
- B. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 10 ml.
- C. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 15 ml.
- D. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 20 ml.
- E. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 25 ml.

Berdasarkan Tabel 5. Menunjukkan tidak adanya beda nyata antar perlakuan. Hal tersebut menunjukkan antar perlakuan jumlah populasi *B. thuringiensis* tidak berbeda jauh. Namun dapat dilihat dari Tabel 5 rerata jumlah total *B. thuringiensis* pada tertinggi pada perlakuan formula cair hasil fermentasi

dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 15 ml. Pada perlakuan formula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi 15 ml populasi jumlah total *B. thuringiensis* berjumlah 267×10^6 cfu/ml. Tingginya jumlah populasi *B. thuringiensis* dikarenakan pada perlakuan tersebut jumlah penambahan hasil ekstraksi padatan sebesar 15 ml mampu meningkatkan populasi *B. thuringiensis*. Tingginya jumlah populasi *B. thuringiensis* diduga karena adanya nutrisi yang mendukung pertumbuhannya yang berasal dari *L. camara* melalui proses ekstraksi padatan. Populasi *B. thuringiensis* pada Gambar 6.



Keterangan :

- A. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 5 ml.
 - B. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 10 ml.
 - C. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 15 ml.
 - D. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 20 ml.
 - E. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 25 ml.
- Gambar 6. Pertumbuhan *B. thuringiensis* pada kombinasi formula cair hasil fermentasi dan hasil ekstraksi

Berdasarkan pada Gambar 6 menunjukkan bahwa pada perlakuan formula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 15 ml

mempunyai nilai rata-rata jumlah *B. thuringiensis* yang tinggi yaitu 267×10^6 . Dilihat dari grafik tersebut terdapat nilai *standar error* yang tinggi pada perlakuan formula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 15 ml. *Standar error* merupakan standar deviasi (penyimpangan data yang sangat tinggi) dari rata-rata. Semakin tinggi nilai *standar error* maka dapat dikatakan data tersebut tidak normal. Jumlah populasi *B. thuringiensis* disajikan pada Gambar 6.

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 *tripernoids* dan kandungan nutrisi yang dapat digunakan 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*. Perlakuan yang terbaik yaitu formula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 15 ml. Dikarenakan semakin tinggi jumlah populasi *B. thuringiensis* maka senyawa bioaktif yang dihasilkan dari perombakan oleh *B. thuringiensis* dalam larutan mampu meningkatkan jumlah kandungan bahan aktif.

3. Pengujian *Bioassay* Formula Cair Ekstrak *L. Camara* Setelah Difermentasi dengan *B. thuringiensis* dengan Hasil Ekstraksi Bahan Padatan

Pengujian *bioassay* bertujuan untuk mengetahui daya bunuh biopestisida terhadap ulat api. Pengujian *bioassay* kombinasi formula cair ekstrak *L. Camara* setelah difermentasi dengan *B. thuringiensis* dengan hasil ekstraksi bahan padatan diaplikasikan pada ulat api (*Setora nitens*). Pengaplikasian dilakukan dengan memberikan berbagai perlakuan kombinasi formula cair ekstrak *L. camara* setelah difermentasi dengan *B. thuringiensis* dengan hasil ekstraksi bahan padatan. Biopestisida diaplikasikan pada makanan ulat api berupa daun rambutan dengan mencelupkan daun rambutan kedalam setiap perlakuan selama 2 menit. Pengamatan terhadap uji *bioassay* dilakukan selama 6 hari pengamatan. Nilai rerata pada pengamatan *Bioassay* disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Rerata mortalitas, efikasi, dan kecepatan kematian Ulat Api hari ke 6 setelah aplikasi formula cair ekstrak *L. camara* setelah difermentasi dengan *B. thuringiensis* dan hasil ekstraksi bahan padatan.

Perlakuan	Mortalitas (%)	Efikasi (%)	Kecepatan Kematian (Hari)
A	0,00a	0,00a	0,00a
B	11,00a	13,33a	0,20a
C	55,33a	60,00a	2,30a
D	77,33a	80,00a	2,87a
E	55,33a	56,67a	1,73a
G	100,00a	100,00a	4,17a
F	0,00a	0,00a	0,00a
CV	46,30078	53,19445	31,79266

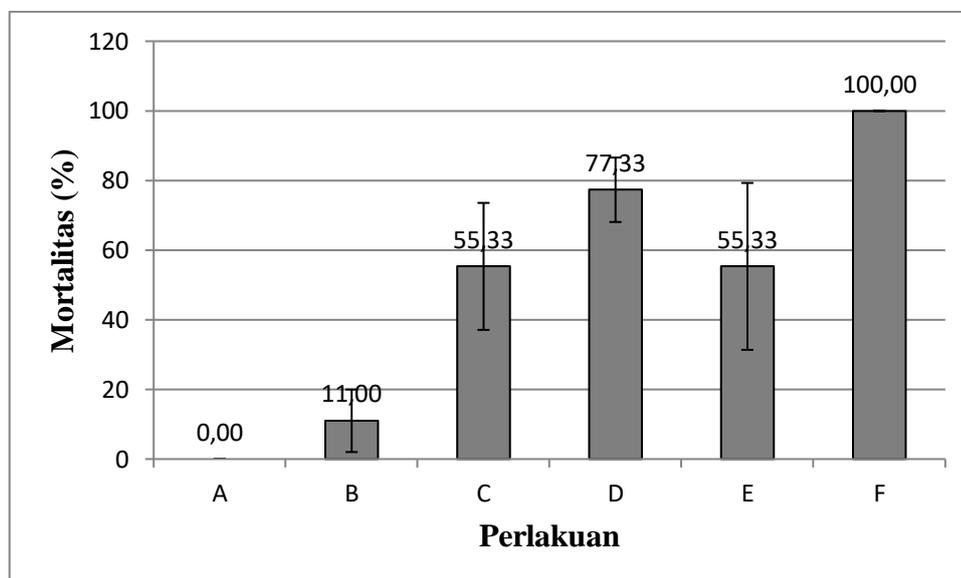
Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada setiap kolom, menunjukkan tidak ada beda nyata pada jenjang 5%.

- A. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 5 ml.
- B. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 10 ml.
- C. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 15 ml.
- D. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 20 ml.
- E. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 25 ml.
- F. Kontrol positif dengan pestisida (*Beta silflutrin 25g/L*)
- G. Kontrol negatif dengan air

Hasil pengamatan menunjukkan tidak terdapat beda nyata antar perlakuan terhadap perhitungan mortalitas, efikasi, dan kecepatan kematian pada setiap perlakuan (Lampiran 5a,b,c).

a. Mortalitas Hama Ulat Api

Pengamatan jumlah hama mati dilakukan dengan cara menghitung larva ulat api yang mati setelah diaplikasikan perlakuan setiap hari 24 jam setelah aplikasi (Putri, 2009). Hasil perhitungan mortalitas disajikan pada Gambar 4.



Keterangan :

- A. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 5 ml.
- B. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 10 ml.
- C. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 15 ml.
- D. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 20 ml.
- E. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 25 ml.
- F. Kontrol positif dengan pestisida (*Beta silflutrin 25g/L*)

Gambar 7. Mortalitas Hama Ulat Api

Berdasarkan hasil mortalitas hama ulat api pada hari ke 6 perhitungan mortalitas pada gambar 6 menunjukkan adanya daya bunuh dari biopestisida kombinasi formula cair ekstrak *L. camara* setelah difermentasi dengan *B. thuringiensis* dengan hasil ekstraksi bahan padatan. Hasil sidik ragam rerata

mortalitas hama ulat api pada hari ke enam Tabel 6 menunjukkan tidak terdapat adanya beda nyata. Hal tersebut dapat diartikan bahwa antar perlakuan tidak memberikan efek mortalitas yang berbeda.

Mortalitas hama ulat api dengan perlakuan pemberian pestisida sintetik (*Beta silflutrin* 25g/L) mempunyai nilai mortalitas 100%. Namun penggunaan pestisida sintetik tersebut mempunyai dampak yang buruk bagi lingkungan. Gambar 7 menunjukkan formula biopestisida *B. thuringiensis* dan *L. camara* dapat digunakan sebagai alternatif pengendalian populasi hama ulat api apabila dibandingkan dengan penggunaan pestisida sintetik (*Beta silflutrin* 25g/L) dilihat dari nilai mortalitas biopestisida yang mebcapai 77,33%.

Berdasarkan pada Gambar 7 rata-rata dari nilai mortalitas terdapat data yang menyimpang. Data nilai deviasi yang lebih besar dari rata-rata maka data tersebut dapat dikatakan terdapat penyimpangan yang sangat tinggi yang menunjukkan data tersebut tidak normal. *Standar error* merupakan standar deviasi (penyimpangan data yang sangat tinggi) dari rata-rata. Kelompok data yang dirata-rata jika dihitung nilai standar deviasi maka menghasilkan nilai *standar error*. Dilihat dari Gambar 7 mortalitas ulat api hari keenam menunjukkan pada perlakuan kombinasi fomula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 15 ml, 20 ml, dan 25 ml mempunyai nilai mortalitas tinggi namun tidak berbeda nyata satu sama lain. Perlakuan kombinasi fomula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 15 ml, 20 ml, dan 25 ml berbeda nyata dengan perlakuan kombinasi fomula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 5 ml dan 10 ml. Hal tersebut ditunjukkan

dengan adanya nilai penyimpangan yang tidak menyinggung satu sama lain. Namun, nilai rerata mortalitas tertinggi yaitu pada perlakuan kombinasi fomula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 20 ml.

Nilai rerata mortalitas tertinggi yang dihasilkan oleh perlakuan kombinasi fomula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 20 ml yaitu sebesar 77,33%. Tingginya nilai mortalitas yang dimiliki oleh perlakuan tersebut dikarenakan terdapat kandungan bahan aktif yang tinggi berasal dari *L. camara* dan bakteri *B. thuringiensis*. Menurut Pramono 1999, daun tembelean (*L. camara*) memiliki kandungan senyawa kimia seperti *lantadene A*, *lantadene B*, *lantanolic acid*, *lantic acid*, minyak atsiri (berbau menyengat yang tidak disukai serangga), *beta- caryophyllene*, *gamma-terpidene*, *alpha-pinene* dan *p-cymene*. Kandungan tersebut dapat dimanfaatkan sehingga mampu membunuh secara kontak berbagai jenis ulat daun.

Berdasarkan Gambar 7 menunjukkan adanya perbedaan nilai rerata mortalitas hama ulat api. Pada hari ke-6 perlakuan kontrol negatif tidak menyebabkan kematian pada hama ulat api sedangkan pada perlakuan pestisida sintetik (*Beta silflutrin 25g/L*) mempunyai nilai mortalitas 100%. Hal tersebut menunjukkan bahwa biopestisida fomula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi mampu menjadi alternatif bagi pestisida sintetik untuk mengendalikan hama ulat api. Kandungan mikroba *B. thuringiensis* pada perlakuan kombinasi fomula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 20 ml mampu meningkatkan nilai mortalitas dari biopestisida. Ulat api yang mati sebelumnya mengalami gejala lemas, tidak bergerak aktif, dan

tidak nafsu makan yang kemudian ulat api tersebut mati. Ulat api yang mati dikarenakan adanya kristal protein toksik yang menyerang pencernaan dari ulat api. Kristal protein yang terkandung dalam *B. thuringiensis* masuk kedalam pencernaan mengakibatkan pH masam sehingga pencernaan terganggu dan mengakibatkan kematian. Ulat api yang mati akibat kristal protein dapat dilihat pada gambar 8b.

Selain kandungan kristal protein yang merusak pencernaan pada biopestisida kombinasi formula cair ekstrak *L. camara* setelah difermentasi dengan *B. thuringiensis* dengan hasil ekstraksi bahan padatan terdapat kandungan *Alkaloidslantanine*, *Flavanoids* dan juga *Triterpenoids*. Menurut penelitian Darwiati (2005) membuktikan bahwa tembelean ternyata juga mampu membasmi hama penggerek pucuk Mahoni (*Hysiphylla robusta*) karena kandungan *Alkaloidslantanine*, *Flavanoids*, *Saponin* dan juga *Triterpenoids* dengan tingkat kematian 85%. Kematian ulat api akibat bahan aktif *Alkaloidslantanine*, *Flavanoids* dan juga *Triterpenoids* dicirikan dengan tubuh ulat api yang kering karena adanya degradasi cairan dalam pencernaan Gambar 8a.



(a) ulat api mati kering



(b) ulat api mati basah

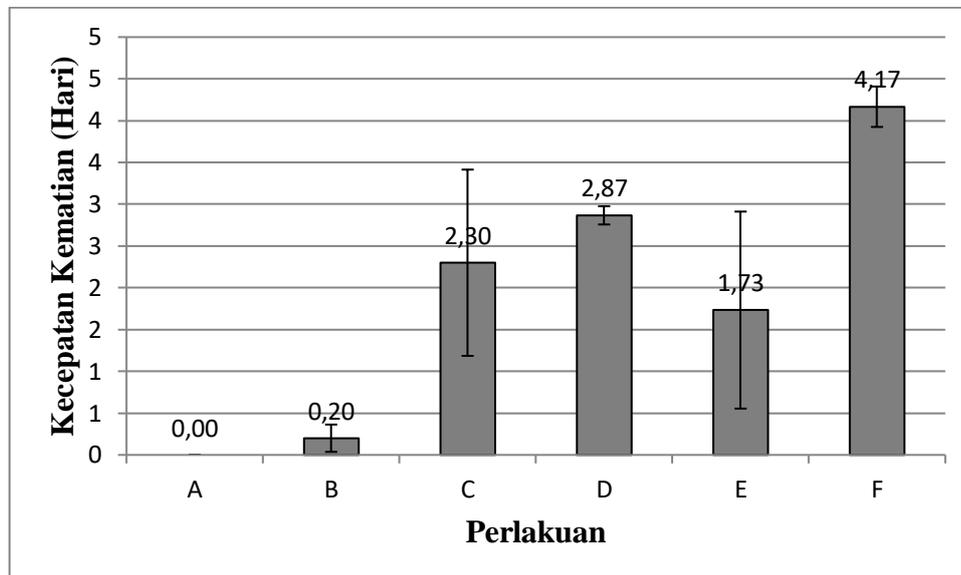
Gambar 8. Ulat Api Pengamatan Hari Ke 4

Penelitian sebelumnya pada perlakuan fermentasi *B. thuringiensis* dan *L. camara* menggunakan media fermentasi LCPKS dan air kelapa mempunyai nilai mortalitas yang rendah. Menurut Rasyid (2018) nilai mortalitas hama ulat api pada perlakuan perbandingan media alami LCPKS dan air kelapa (3:1) hanya sebesar 40%. Penambahan hasil ekstraksi padatan pada penelitian yang telah dilakukan terbukti mampu menambah kandungan senyawa bahan aktif dan meningkatkan daya bunuh sehingga nilai mortalitas yang didapatkan lebih tinggi dari penelitian sebelumnya. Diduga terdapat kandungan senyawa bahan aktif seperti *Saponin* yang terdapat pada formula biopestisida yang mampu meningkatkan daya bunuh dari formula biopestisida. Penelitian yang telah dilakukan oleh Hidayati (2008) mendapatkan hasil bahwa seluruh bagian dari tanaman *L. camara* yang meliputi akar, daun, dan buah mempunyai kandungan bahan aktif *saponin* dengan kadar yang bervariasi. Daun *L. camara* memiliki kandungan saponin tertinggi yaitu 66,22 mg/g.

c. Kecepatan Kematian Hama Ulat Api

Kecepatan kematian menunjukkan jumlah ulat yang mati dalam satuan waktu tertentu. Uji *bioassay* terhadap ulat api kelapa sawit menunjukkan bahwa pada parameter kecepatan kematian tidak adanya beda nyata setiap perlakuan (Lampiran 5c). Hal tersebut dibuktikan dengan menggunakan uji DMRT taraf 5%. Akan tetapi, pada setiap perlakuan memiliki tingkat kecepatan kematian (hari) yang berbeda-beda. Pada perlakuan kombinasi formula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi 20 ml memiliki nilai kecepatan kematian 2,87 pada hari ke 6. Sedangkan pada perlakuan kombinasi formula cair hasil fermentasi

dengan penambahan hasil ekstraksi 5 ml mempunyai nilai efikasi yaitu 0 pada hari ke 6. Kecepatan kematian hama ulat api disajikan pada gambar 8.



Keterangan :

- A. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 5 ml.
- B. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 10 ml.
- C. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 15 ml.
- D. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 20 ml.
- E. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 25 ml.
- F. Kontrol positif dengan pestisida (*Beta silflutrin 25g/L*)

Gambar 9. Kecepatan Kematian Hama Ulat Api

Berdasarkan hasil perhitungan kecepatan kematian pada gambar 9 dapat dilihat perlakuan kombinasi formula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 20 ml memiliki kecepatan kematian yang tinggi yaitu 2,87 pada hari ke 6 pengamatan. Kematian ulat api *Setora nitens* relatif lambat, pada hari ke 6 hanya beberapa perlakuan saja yang memiliki kecepatan kematian tinggi. Hal ini terjadi dimungkinkan Ulat api memiliki ketahanan hidup yang lebih kuat dan dimungkinkan juga *B. thuringiensis* belum memasuki masa sporulasinya (bentuk infeksi matang), sehingga menyebabkan lambatnya proses terinfeksi hama ulat api tersebut. Menurut Asliahalyas (2013) *Bacillus thuringiensis* adalah

bakteri yang menghasilkan kristal protein yang bersifat membunuh serangga (insektisidal) sewaktu mengalami proses sporulasinya. Pada perlakuan penambahan hasil fermentasi dengan hasil ekstraksi padatan 20 ml mempunyai kecepatan kematian yang tinggi diduga karena adanya bahan aktif lain yang mampu terlarut melalui proses ekstraksi dengan menggunakan aseton seperti *saponin* dan *flvonoid* yang mampu meningkatkan daya bunuh dari formula biopestisida. Penelitian yang telah dilakukan oleh Hidayati (2008) mendapatkan hasil bahwa seluruh bagian dari tanaman *L. camara* yang meliputi akar, daun, dan buah mempunyai kandungan bahan aktif *saponin* dengan kadar yang bervariasi. Daun *L. camara* memiliki kandungan saponin tertinggi yaitu 66, 22 mg/g.

Berdasarkan hasil analisis kecepatan kematian hama ulat api pada Gambar 9 terlihat adanya nilai *standar error* yang tinggi dari beberapa perlakuan. Diduga tingginya nilai *standar error* dikarenakan hama ulat api yang digunakan dalam pengujian mempunyai daya tahan yang berbeda sehingga waktu kematian dari hama ulat api juga berbeda-beda. Dilihat dari Gambar 9 kecepatan kematian hama ulat api hari keenam menunjukkan pada perlakuan kombinasi fomula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 15 ml, 20 ml, dan 25 ml mempunyai nilai kecepatan kematian yang tinggi namun tidak berbeda nyata satu sama lain. Perlakuan kombinasi fomula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 15 ml, 20 ml, dan 25 ml berbeda nyata dengan perlakuan kombinasi fomula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 5 ml dan 10 ml. Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya nilai penyimpangan yang tidak menyinggung satu sama lain. Namun, nilai rerata

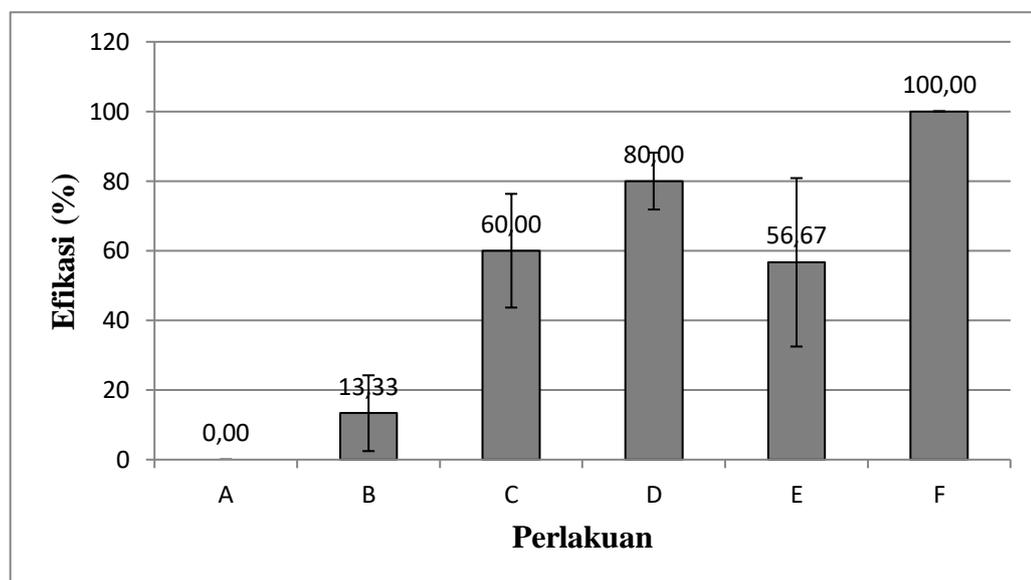
kecepatan kematian tertinggi yaitu pada perlakuan kombinasi formula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 20 ml. Selain itu rendahnya nilai error yang dihasilkan maka akurasi data yang didapatkan lebih tinggi.

Penelitian sebelumnya pada perlakuan fermentasi *B. thuringiensis* dan *L. camara* menggunakan media fermentasi LCPKS dan air kelapa mempunyai kecepatan kematian yang rendah (Rasyid, 2018). Penambahan hasil ekstraksi padatan pada penelitian yang telah dilakukan terbukti mampu menambah kandungan senyawa bahan aktif dan meningkatkan daya bunuh sehingga mempengaruhi kecepatan kematian yang didapatkan lebih tinggi dari penelitian sebelumnya. Gambar 9 menunjukkan perlakuan pemberian pestisida (*Beta silflutrin* 25g/L) mempunyai rerata kecepatan kematian 4,17 (hari) sedangkan pemberian cairan fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 20 ml mempunyai rerata kecepatan kematian 2,87 (hari). Dari hasil tersebut maka dapat diketahui bahwa formula biopestisida *B. thuringiensis* dan *L. camara* mampu menurunkan populasi hama ulat api.

d. Efikasi Hama Ulat Api

Efikasi adalah efektivitas pestisida terhadap organisme sasaran yang didaftarkan berdasarkan pada hasil percobaan lapangan atau laboratorium menurut metode yang berlaku (Permentan, 2007). Uji efikasi digunakan untuk mengukur kemanjuran suatu pestisida terhadap jenis pengganggu tertentu. Semakin tinggi efektifitas daya bunuh maka semakin bagus pestisida tersebut.

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam efikasi menunjukkan tidak adanya pengaruh nyata pada setiap perlakuan kombinasi formula cair ekstrak *L. Camara* setelah difermentasi dengan *B. thuringiensis* dengan hasil ekstraksi bahan padatan. Nilai efikasi tertinggi yaitu pada perlakuan kombinasi fomula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 20 ml. Grafik nilai efikasi hama ulat api disajikan pada Gambar 10.



Keterangan :

- A. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 5 ml.
- B. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 10 ml.
- C. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 15 ml.
- D. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 20 ml.
- E. Formula cair hasil fermentasi 100 ml ditambah hasil ekstraksi padatan 25 ml.
- F. Kontrol positif dengan pestisida (*Beta silflutrin 25g/L*)

Gambar 10. Efikasi Hama Ulat Api

Berdasarkan hasil perhitungan nilai efikasi hama ulat api pada gambar 10 dapat dilihat nilai efikasi yang tertinggi yaitu pada perlakuan kombinasi fomula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 20 ml yaitu 80%. Tingginya nilai efikasi dipegaruhi oleh tingkat mortalitas yang didapat. Data tersebut menunjukkan penyimpangan yang tinggi yang menunjukkan data tersebut

tidak normal. *Standar error* merupakan standar deviasi (penyimpangan data yang sangat tinggi) dari rata-rata. Kelompok data yang dirata-rata jika dihitung nilai standar deviasi maka menghasilkan nilai *standar error*. Dari data tersebut dapat dilihat bahwa perlakuan formula biopestisida dapat digunakan sebagai alternatif pengendalian hama ulat api.

Dilihat dari Gambar 10 nilai efikasi hama ulat api hari keenam menunjukkan pada perlakuan kombinasi formula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 15 ml, 20 ml, dan 25 ml mempunyai nilai efikasi yang tinggi namun tidak berbeda nyata satu sama lain. Perlakuan kombinasi formula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 15 ml, 20 ml, dan 25 ml berbeda nyata dengan perlakuan kombinasi formula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 5 ml dan 10 ml. Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya nilai penyimpangan yang tidak menyinggung satu sama lain. Namun, nilai rerata efikasi tertinggi yaitu pada perlakuan kombinasi formula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 20 ml. Selain itu rendahnya nilai error yang dihasilkan maka akurasi data yang didapatkan lebih tinggi.

Penelitian sebelumnya pada perlakuan fermentasi *B. thuringiensis* dan *L. camara* menggunakan media fermentasi LCPKS dan air kelapa mempunyai nilai efikasi yang rendah. Hal tersebut dikarenakan nilai efikasi dipengaruhi oleh mortalitas (Rasyid, 2018). Penambahan hasil ekstraksi padatan pada penelitian yang telah dilakukan terbukti mampu menambah kandungan senyawa bahan aktif

dan meningkatkan daya bunuh sehingga nilai efikasi yang didapatkan lebih tinggi dari penelitian sebelumnya.

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan parameter satu sama lain mempunyai keterkaitan. Proses fermentasi *B. thuringiensis* dan *L. camara* dengan menggunakan media alami LCPKS dan air kelapa menghasilkan perubahan fisik dari awal fermentasi dan akhir fermentasi. Perombakan bahan organik yang dilakukan oleh *B. thuringiensis* mengakibatkan peningkatan suhu. Bahan organik dari *L. camara* yang dirombak menjadi asam-asam organik diikuti dengan penurunan pH. Terjadinya degradasi bahan organik oleh bakteri menyebabkan terjadinya perubahan warna yang berasal dari kandungan klorofil pada *L. camara* yang menjadi rusak dan mengalami pencoklatan. Perombakan bahan organik oleh *B. thuringiensis* mampu memecah protein dan nitrogen yang menyebabkan aroma yang menyengat. Hasil proses fermentasi berupa kandungan senyawa dan bahan aktif meningkatkan nilai TDS. Perubahan fisik yang terjadi juga mempengaruhi populasi *B. thuringiensis*. Hasil fermentasi berupa padatan masih mempunyai kandungan bahan aktif yang dapat dimanfaatkan. Ekstraksi dengan menggunakan aseton dapat dilakukan untuk mengeluarkan bahan aktif karena mempunyai tingkat kepolaran yang sama. Bahan aktif dapat dimanfaatkan kembali oleh *B. thuringiensis* untuk berkembangbiak. Kombinasi formula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 15 ml mempunyai nilai total *Alkaloid* dan *Tanin* yang tinggi yaitu *Alkaloid* 76,42 µg/ml dan *Tanin* 12,26 % b/v. Jumlah populasi *B. thuringiensis* tertinggi 267×10^6 cfu/ml pada perlakuan formula cair hasil fermentasi dengan penambahan hasil ekstraksi padatan 15 ml. Kombinasi

cairan hasil fermentasi ditambah hasil ekstraksi padatan mampu menurunkan populasi hama ulat api. Dengan kandungan fitokimia dan jumlah populasi *B. thuringiensis* yang tinggi pada erlakuan cairan hasil fermentasi ditambah hasil ekstraksi padatan padatan 15 ml namun berdasarkan hasil uji *bioassay* belum mampu menurunkan pupulasi hama ulat api secara maksimal. Terbukti dengan kombinasi cairan hasil fermentasi dengan penambahan 20 ml cairan hasil ekstraksi padatan mempunyai nilai mortalitas, kecepatan kematian, dan nilai efikasi yang tinggi. Parameter pengamatan hama ulat api menunjukkan nilai mortalitas 77,33%, kecepatan kematian 2,87 (hari), dan efikasi 80%. Kematian hama ulat api dikarenakan kandungan senyawa dan bahan aktif yang menyebabkan hama ulat api terinfeksi dan mengalami kematian. Diduga terdapat kandungan bahan aktif lain seperti *saponin* yang tinggi diadalam *L. camara* yang mampu meningkatkan daya bunuh dari formula biopestisida kombinasi cairan hasil fermentasi dengan penambahan ekstraksi padatan 20 ml. Terlihat hasil uji *Bioassay* hama ulat api yang mati rata-rata dicirikan tidak berwarna coklat dan lembek pada perutnya karena pencernaan yang rusak akibat adanya kristal protein. Namun, ulat api yang mati masih utuh dan tidak berwarna coklat pada bagian perutnya. Hal tersebut diduga adanya bahan aktif lain yang belum terdeteksi mampu meningkatkan virulensi dari produk formula biopestisida.