

POTENSI PROTEIN *Pomacea canaliculata*, *Erionota thrax*, DAN *Valanga nigricornis* SEBAGAI MEDIUM SUBSTITUSI PERBANYAKAN BAKTERI AGENS HAYATI PENYAKIT BUSUK LUNAK  
UMBI KENTANG (*Erwinia carotovora*)

Oleh

ANISA NURFITRIYAH

MINAT HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN  
PROGRAM STUDI AGROEKOTEKNOLOGI



UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
FAKULTAS PERTANIAN  
JURUSAN HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN  
MALANG  
2014

POTENSI PROTEIN *Pomacea canaliculata*, *Erionota thrax*, DAN *Valanga nigricornis* SEBAGAI MEDIUM SUBSTITUSI PERBANYAKAN BAKTERI AGENS HAYATI PENYAKIT BUSUK LUNAK  
UMBI KENTANG (*Erwinia carotovora*)

Oleh  
ANISA NURFITRIYAH  
0910483081

MINAT HAMA PENYAKIT TUMBUHAN  
PROGRAM STUDI AGROEKOTEKNOLOGI

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh  
Gelar Sarjana Pertanian Strata Satu (S-1)

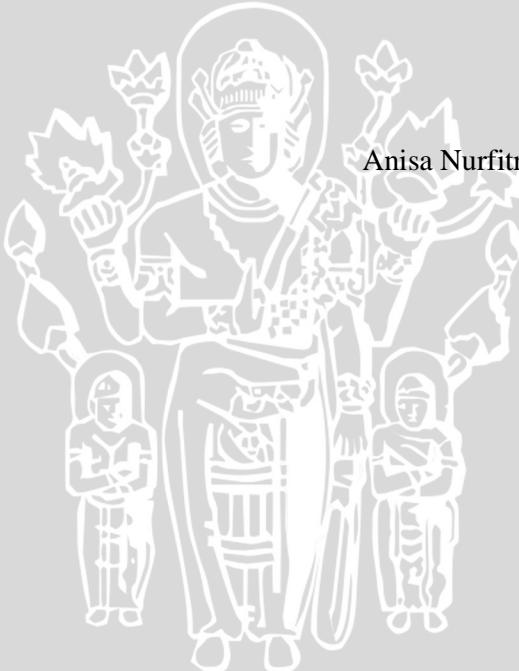
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
FAKULTAS PERTANIAN  
JURUSAN HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN  
MALANG  
2014

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Malang, 13 Agustus 2014

Anisa Nurfitriyah



Judul Skripsi

: **POTENSI PROTEIN *Pomacea canaliculata*, *Valanga nigricornis*, DAN *Erionota thrax* SEBAGAI MEDIUM SUBSTITUSI PERBANYAKAN BAKTERI AGENS HAYATI PENYAKIT BUSUK LUNAK UMBI KENTANG (*Erwinia carotovora*)**

Nama Mahasiswa  
Jurusan  
Program Studi  
Minat  
Menyetujui

: Anisa Nurfitriyah  
: Hama dan Penyakit Tumbuhan  
: Agrekoteknologi  
: Hama dan Penyakit Tumbuhan  
: Dosen Pembimbing

Pembimbing Utama,

Prof Dr.Ir.Abdul Latief Abadi, MS  
NIP. 19550821 198002 1 002

Pembimbing Pendamping,

Luqman Qurata Aini, SP., M.Si., Ph.D  
NIP. 19720919 199802 1 001

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan

Dr. Ir. Bambang Tri Rahardjo, SU.  
NIP. 19550403 198303 1 003

Tanggal Persetujuan: .....

## LEMBAR PENGESAHAN

Mengesahkan

### MAJELIS PENGUJI

Penguji I

Dr.Ir.Bambang Tri Rahardjo, SU.  
NIP. 19550403 198303 1 003

Penguji II

Dr.Ir. Mintarto Martosudiro, MS.  
NIP. 19590705 198601 1 003

Penguji III

Prof Dr.Ir.Abdul Latief Abadi, MS  
NIP. 19550821 198002 1 002

Penguji IV

Luqman Qurata Aini, SP., M.Si., Ph.D  
NIP. 19720919 199802 1 001

Tanggal Lulus:.....

## HALAMAN PERSEMBAHAN

*Bukan karena hanya sebuah karya..*

*Tetapi lebih karena sebuah perjuangan dalam sebuah hikmah...*

*Karena aku persesembahkan karya ini...*

Buat Bapak dan Ibuk...

Terima kasih atas didikan, perjalanan hidup, seluruh kisah hikmah hingga aku belajar

menjadi “manusia yang bisa hidup mandiri”

Buat Mas Roby, Mas Ifan, dan Dek Lisa..

Kebesamaan satu darah menjadikan warna-warni pilihan hidup yang bijaksana,..

Semoga kita selalu menjadi penyelamat Bapak dan Ibuk

untuk Suami saya, Mochamad Andik, SE...

terima kasih untuk keikhlasan, kesabaran, pemahaman dan pendampingan penuh makna hingga aku berlajar menjadi seorang “Wanita”. Semoga keberkahan dan keridhoanNya selalu

memberamai kita dunia akhirat...

Dan untuk putri saya, Nayla Briliant Ilma...

Terima kasih sayang sudah menemani umik ngelab, lembur, dan mondar-mandir ketemu dosen. Nayla adalah penyemangat terbesar umik untuk tetap menghasilkan dan memberikan yang terbaik yang umik bisa. Karya ini benar-benar bersamamu nak.. Thank you Allah atas anugerah Nayla pada saat yang paling tepat...

Untuk sahabat-sahabat saya....

Faradisa Yasnita, Jazakillah ukhti selalu ada setiap aku membutuhkan, bahkan sejak maba. Tapi afwan aku tidak bisa melakukan hal yang sama untuk adis. Keep fight & Uhibbukifillah.

Wiwik Jatnika, SP., Istiqomah, SP., Kustanti Wahyu Utami, SP., Ronny Pamuji, SP., Zainudin, SP., dan Tosan Abirowo.. Terima kasih yang paling banyak, melalui kalian aku bertahan memperjuangkan gelar Sarjana Pertanian. Kebersamaan kita akan selalu indah.. Mas syibli dan Mas Huda, terima kasih atas kerikhlasan berbagi ilmu hingga membesarkan nama saya.. Juga Dek Eka Kartini, ternyata di akhir perjuangan adeklah yang bersama saya.. semoga Allah membalaunya...

Keluarga saya di FORSIKA, PRISMA, KAMMI UB, IM YOUTH, DPM dan semuanya yang pernah terlukis dalam perjalanan saya.. Jazakumullah khoiron katsir...

## RINGKASAN

Anisa Nurfitriyah. 0910483081. Potensi Protein *Pomacea canaliculata*, *Erionata thrax*, dan *Valanga nigricornis* sebagai Medium Substitusi Perbanyak Bakteri Agens Hayati Penyakit Busuk Lunak Umbi Kentang (*Erwinia carotovora*). Dibawah bimbingan Prof. Dr. Ir. Abdul Latief Abadi, MS. dan Luqman Qurata Aini, SP., M.Si., Ph. D.

*Erwinia carotovora* merupakan salah satu penyebab penyakit busuk lunak umbi kentang, baik dilapang maupun di gudang (Addy, 2007) dengan kerusakan antara 15 – 100% (Vanneste, 1996). Javandira (2012) mengemukakan bahwa *Bacillus subtilis* berpotensi mengendalikan patogen *Erwinia carotovora* dengan menghasilkan antibiotik. *Bacillus subtilis* menghasilkan senyawa siderofor dan antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan patogen (Habazaar dan Yahewardi, 2006). Sifat antagonis *Bacillus subtilis* banyak dimanfaatkan sebagai agens hayati yang mulai banyak dikembangkan.

Perbanyak bakteri agens hayati biasanya menggunakan medium EKG (Ekstrak Kentang Gula) yang mempunyai kandungan protein rendah, padahal bakteri membutuhkan banyak protein untuk tumbuh. Salah satu medium yang cocok adalah NB (*Nutrient Broth*), tetapi medium ini sangat mahal. Ada banyak sumber protein di alam dari jenis hama seperti keong mas, ulat dan belalang. Keong mas mempunyai kandungan protein sebesar 10,30% (Susanto, 2010), golongan serangga (termsauk ulat atau larva) sebesar 40-60% (Koswara, 2012), dan kandungan protein belalang sebesar 62,2% (Kusmaryani, 2005). Potensi protein hama-hama tersebut perlu diteliti untuk dijadikan medium substitusi perbanyak bakteri agens hayati.

Penelitian dilaksanakan bulan Oktober 2013 hingga Mei 2014 di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang. Metode Penelitian meliputi uji medium substitusi untuk perbanyak bakteri agens hayati *B. subtilis* dengan berbagai konsentrasi dan uji aktivitas antagonis agens hayati *B. subtilis* terhadap *Erwinia carotovora* setelah diperbanyak dengan medium substitusi. Rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan uji lanjut Duncan (DMRT) pada taraf nyata 5%.

Medium substitusi keong mas, ulat dan belalang dapat dijadikan pengganti *Nutrient Broth* untuk perbanyak agens hayati *B. subtilis* dengan kerapatan akhir (setelah digojok 48 jam) sebesar  $10^{16}$  (meningkat  $10^7$ ) untuk medium keong dan sebesar  $10^{18}$  (meningkat  $10^8$ ) untuk medium ulat dan belalang. Hasil uji kandungan protein medium substitusi cair untuk keong mas antara 4,8-5%, sebesar 5,4-5,8% untuk medium ulat dan belalang pada semua perlakuan konsentrasi. Kandungan ini setara dengan kandungan protein *Nutrient Broth* sebesar 5,88%. Agens hayati *B. subtilis* tetap bersifat antagonis terhadap *Erwinia carotovora* setelah diperbanyak menggunakan medium substitusi dengan menghasilkan indeks zona bening. Rata-rata indeks zona bening yang dihasilkan antara 0,58-0,71 cm pada semua perlakuan. Indeks zona bening terbesar yang dihasilkan adalah 0,71 cm pada medium CP4 (konsentrasi 10 gram tepung belalang/L aquades) lebih baik dari kontrol P0 (8 gram *Nutrient Broth*/L aquades) yang menghasilkan 0,64 cm.

## SUMMARY

**Anisa Nurfitriyah. 0910483081. Potential Protein of *Pomacea canaliculata*, *Erionata thrax*, and *Valanga nigricornis* as Substitution Growth Medium Bacteria Biological Agents of Potato Tuber Soft Rot Disease (*Erwinia carotovora*). Supervised by Prof. Dr. Ir. Abdul Latif Abadi, MS. and Luqman QurataAini, SP., M.Si., Ph.D.**

*Erwinia carotovora* is one of the causes potato tuber soft rot disease, both in the field and in the storage which damage between 15-100% (Vanneste, 1996). Javandira (2012) suggested that *Bacillus subtilis* is potentially to be controlled the pathogen *Erwinia carotovora* by producing antibiotics. *Bacillus subtilis* are produced siderophores and antibiotic that can be inhibited the growth of pathogens (Habazaar and Yahewardi, 2006). Antagonist of *Bacillus subtilis* is used as a biological agent that is started has been developed.

Propagation of bacteria biological agents usually use medium ECG (Potato Extract Sugar) which has a low protein content, whereas the bacteria need a lot of protein to grow. One compatible medium is NB (Nutrient Broth), but this medium is very expensive. There are many sources of protein in the nature, especially kind of pests such as snails, caterpillars and grasshoppers. Snails have a protein content of 10.30% (Susanto, 2010), groups of insects (including caterpillars or larvae) about 40-60% (Koswara, 2012), and the protein content of grasshoppers about 62.2% (Kusmaryani, 2005). Potential proteins of that pest is needed to be studied to be used as a substitution growth medium of bacteria biological agents.

The research was conducted in October 2013 to May 2014 in the Disease Laboratory of Plant Pests and Diseases Department, Agriculture Faculty, Brawijaya University, Malang. Research methods include substitution test medium for the propagation of bacteria biological agents *B. subtilis* with various concentrations and antagonistic activity test of biological agents *B. subtilis* against *Erwinia carotovora* after propagated with substitution medium. The design used was completely randomized design (CRD) with Duncan further test (DMRT) at 5% significance level.

Substitution medium snails, caterpillars and grasshoppers could potentially be a substitution propagation medium biological agent *B. subtilis* and have equal ability to Nutrient Broth medium. Final density of *B. subtilis* (after 48 hours shaker) is  $10^{16}$ (increase  $10^7$ ) for snails medium and  $10^{18}$ (increase  $10^8$ ) for caterpillars medium and grasshoppers medium. Protein content test results substitution liquid medium about 4.8 to 5% for snails and about 5.4 to 5.8% for caterpillars medium and grasshoppers medium in all treatment concentrations. The content is equivalent to the protein content of Nutrient Broth which is about 5.88%. Biological agents *B. subtilis* still antagonistic to *Erwinia carotovora* after propagated by substitution medium which is characterized by clear zone. Average clear zone index that resulted in all treatment are about 0.58 to 0.71cm. The largest clear zone index resulted was 0.71 cm in the medium CP4 (concentration of 10 grams of flour grasshopper/L distilled water) better than the control P0 (8 grams of Nutrient Broth/L distilled water) which results 0.64cm.

## KATA PENGATAR

Alhamdulillah, puji syukur atas seluruh rahmat, hidayah, kemudahan, kekuatan dan hikmah yang Allah SWT berikan. Sholawat serta salam semoga selalu terlimpahkan kepada junjungan kita Rasulullah Muhammad SAW, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian yang berjudul “**Potensi Protein *Pomacea canaliculata*, *Erionata thrax*, dan *Valanga nigricornis* sebagai Medium Substitusi Perbanyak Bakteri Agens Hayati Penyakit Busuk Lunak Umbi Kentang (*Erwinia carotovora*)**” sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi Strata Satu Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang.

Terima kasih dan salam hormat kepada kedua orang tua atas seluruh dukungan moril dan materiil untuk penulis; kepada suami (Mochamad Andik, SE) atas pendampingan dan penguatan dalam perjalanan penulis, kepada Prof. Dr. Ir. Abdul Latief Abadi, MS. dan Luqman Qurata Aini, SP., M.Si., Ph.D. selaku dosen pembimbing sekaligus ayah yang selalu sabar dan memahami penulis; terima kasih kepada teman-teman Lab. Bakteriologi dan semua laboran (Pak Wid, Mb Nia, dan Pak Tomo) atas semua bantuannya. Tidak lupa juga untuk semua teman-teman dan sahabat serta semua pihak yang mendukung penyusunan penelitian ini atas segala dukungan dan kerjasamanya.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan, untuk itu penulis berharap masukan dan kritik yang membangun demi perbaikan dan kesempurnaan karya berikutnya.

Malang. Juli 2014

Anisa Nurfitriyah

## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan pada tanggal 10 April 1989 di Bondowoso, Jawa Timur sebagai putri ketiga dari 4 bersaudara dari pasangan Bapak Abdul Azis dan Ibu Nit Sriatun.

Penulis memulai jenjang pendidikan pada tahun 1994-1996 di TK Pertiwi Tapen dilanjutkan dengan SDN Tapen 1 pada tahun 1996-2002. Pada tahun 2002, penulis melanjutkan pendidikan di SMPN 1 Bondowoso dan lulus pada tahun 2005. Pada tahun yang sama penulis memasuki SMAN 2 Bondowoso hingga lulus pada tahun 2008. Satu tahun kemudian yaitu Tahun 2009, penulis tercatat sebagai mahasiswa Strata Satu (S1) Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang memalui jalur Seleksi Perminatan Bakat dan Kemampuan (SPMK).

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif dalam kegiatan organisasi intra dan ektra kampus diantaranya, Staf Divisi Keputrian Forum Studi Islam Insan Kamil (FORSIKA) FP UB Tahun 2009-2010, Sekdept PSDM FORSIKA FP UB dan Staff Divisi Diklat Departemen Pembinaan Anggota (PA) di Pusat Riset dan Kajian Ilmiah Mahasiswa (PRISMA) FP UB pada Tahun 2010-2011. Pada Tahun 2012-2013 penulis menjabat sebagai Ketua Umum Pusat Riset dan Kajian Ilmiah Mahasiswa (PRISMA) FP UB dan pada Tahun 2013-2014 penulis terpilih sebagai Dewan Perwakilan Mahasiswa (DPM) Universitas Brawijaya melalui Pemilihan Umum Mahasiswa Raya (PEMIRA), serta menjabat sebagai Bendahara 1. Penulis juga aktif di organisasi ektra kampus seperti Remas At-Taqwa Bondowoso (2005-2011), Kadiksuh (Kakak adik asuh) Tahun 2010, Amazing community PT. Inspiera Sinergi Indonesia (2009-1014), Executive Board IM YOUTH (Inspiring Moeslem Youth Community) Tahun 2012, Kesatuan Aksi Mahasiswa Muslim Indonesia (KAMMI) UB Tahun 2011-2014, dan FIMalang ( Forum Indonesia Muda Malang) Tahun 2012-2014.

Penulis juga aktif dalam berbagai kegiatan lomba dan kejuaraan. Pada Tahun 2013, penulis memperoleh medali perunggu katagori poster PKMK PIMNAS XXVI dan Juara 1 dalam 1<sup>st</sup> Decade of Dinamit UPN Jogja Tingkat Nasional. Pada Tahun 2012, penulis terpilih sebagai Mahasiswa Berprestasi Utama FP UB dan terpilih sebagai Mahasiswa Berprestasi Utama UB serta menjadi finalis 10 Besar Mahasiswa Berprestasi Tingkat Nasional sebagai delegasi Universitas Brawijaya. Pada tahun yang sama, penulis juga memperoleh Juara 1 Writing Nasional Contest Unmuh Makasar, Juara 1 LKTI Lumpur Lapinda ITS EXPO Tingkat Nasional, Juara 2 LKTI Nasional “DEFEST” UNDIP, Juara 2 Mineral and Metallurgy Weeks (MnMS) FTUI Tingkat Nasional dan Juara 3 Make and Sell Competition (MSC) Himmateks ITS Tingkat Nasional serta finalis beberapa lomba tingkast nasional lainnya. Penulis juga merupakan nominator Inovasi IPTEK KEMENPORA Tahun 20111 dan finalis beberapa lomba tingkat nasional lainnya.

Pengalaman kerja yang dimiliki penulis adalah magang di toko roti As Sunnah, *freelance* PT. Inspiera Sinergi Indonesia, guru les privat di Bintang School Malang, Asisten Praktikum Dasar Ilmu Tanah Tahun 2010 serta secara mandiri berwirausaha menjual berbagai macam kue basah dan roti. Penulis juga aktif sebagai pemateri di berbagai pelatihan dan training kepemimpinan, organisasi, penulisan, dan quantum learning (amazing memory dan amazing reading).

**DAFTAR ISI**

RINGKASAN .....	i
SUMMARY .....	ii
KATA PENGANTAR .....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Hipotesis Penelitian.....	2
1.5 Manfaat Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Agens Hayati Antagonis.....	4
2.2 Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> .....	5
2.3 Hama Belalang Kayu ( <i>Valanga nigricornis</i> ) .....	6
2.4 Hama Keong Mas ( <i>Pomacea canaliculata</i> ) .....	9
2.5 Hama Ulat Daun Penggulung ( <i>Erionota thrax</i> ) .....	10
2.6 Penyakit Busuk Lunak Umbi Kentang ( <i>Erwinia carotovora</i> ) .....	12
III. BAHAN DAN METODE	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	15
3.2 Alat dan Bahan Penelitian .....	15
3.3 Metode Penelitian.....	15
3.3 Pelaksanaan Penelitian .....	17
3.4 Analisis Data .....	21
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil .....	22
4.2 Pembahasan .....	37
4.3 Analisis Ekonomi .....	44
V. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	45
5.2 Saran .....	45
DAFTAR PUSTAKA .....	46
LAMPIRAN .....	51

**DAFTAR TABEL**

<b>Nomor</b>	<b>Teks</b>	<b>Halaman</b>
1.	Karakteristik Bakteri <i>B. subtilis</i> .....	5
2.	Komposisi Gizi Jenis-jenis Serangga yang dapat digunakan sebagai bahan pangan .....	8
3.	Data Luas Serangan Keoang Mas di Indonesia Tahun 2003-2007 .....	10
4.	Komposisi Kimia Keong Mas .....	10
5.	Sifat Fisik Tepung Medium Substitusi .....	22
6.	Rerata Nilai Kandungan Uji Proksimat Tepung Medium Substitusi .....	23
7.	Waktu Generasi dan Konstanta Laju Pertumbuhan <i>B. subtilis</i> Medium Keong mas .....	26
8.	Waktu Generasi dan Konstanta Laju Pertumbuhan <i>B. subtilis</i> Medium Ulat .....	27
9.	Waktu Generasi dan Konstanta Laju Pertumbuhan <i>B. subtilis</i> Medium Belalang .....	27
10.	Rerata Populasi Akhir <i>B. subtilis</i> Hasil Perbanyakan Medium Substitusi .....	30
11.	Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Setiap 6 Jam Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Keong mas .....	33
12.	Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Setiap 6 Jam Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Ulat .....	33
13.	Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Setiap 6 Jam Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Belalang .....	34
14.	Analisis Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Medium Substitusi Setiap 6 Jam .....	34
15.	Rerata Uji Antagonis Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Hasil Perbanyakan Medium Substitusi terhadap <i>E. caraotovora</i> .....	36

17. Perbandingan Biaya Medium Tumbuh Bakteri Agens Hayati ..... 44



**DAFTAR GAMBAR**

<b>Nomor</b>	<b>Teks</b>	<b>Halaman</b>
1.	Belalang ( <i>Valanga nnigricornis</i> ).....	8
2.	Keong mas ( <i>Pomacea canaliculata</i> ) .....	9
3.	<i>Erionata thrax</i> .....	11
4.	Tepung Medium Substitusi .....	21
5.	Kurva Pertumbuhan <i>B. subtilis</i> pada Medium Substitusi Keong mas .....	24
6.	Kurva Pertumbuhan <i>B. subtilis</i> pada Medium Substitusi Ulat .....	24
7.	Kurva Pertumbuhan <i>B. subtilis</i> pada Medium Substitusi Belalang .....	25
8.	Grafik Waktu Generasi <i>B. subtilis</i> pada Semua Jenis Medium .....	28
9.	Grafik Konstanta Laju <i>B. subtilis</i> pada Semua Jenis Medium .....	29
10.	Grafik Rerata Nilai Protein Medium Substitusi Cair .....	40
11.	Nilai pH Medium Substitusi.....	42

**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Nomor</b>	<b>Teks</b>	<b>Halaman</b>
1.	Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> antar Perlakuan pada Medium Substitusi Keong mas Jam Ke 6 .....	51
2.	Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> antar Perlakuan pada Medium Substitusi Keong mas Jam Ke 12 ...	51
3.	Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Keong mas Jam Ke 18 ..	51
4.	Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> antar Perlakuan pada Medium Substitusi Keong mas Jam Ke 24 ...	51
5.	Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Keong mas Jam Ke 30 ..	51
6.	Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> antar Perlakuan pada Medium Substitusi Keong mas Jam Ke 36 ...	52
7.	Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Jam Ke 42 .....	52
8.	Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> antar Perlakuan pada Medium Substitusi Keong mas Jam Ke 48 ...	52
9.	Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Ulat Jam Ke 6 .....	51
10.	Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Ulat Jam Ke 12 .....	52
11.	Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Ulat Jam Ke 18 .....	52
12.	Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Ulat Jam Ke 24 .....	53
13.	Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Ulat Jam Ke 30 .....	53
14.	Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Ulat Jam Ke 36 .....	53

15. Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Ulat Jam Ke 42 .....	53
16. Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Ulat Jam Ke 48 .....	53
17. Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Belalang Jam Ke 6 .....	53
18. Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Belalang Jam Ke 12 .....	54
19. Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Belalang Jam Ke 18 .....	54
20. Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Belalang Jam Ke 24 .....	54
21. Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Belalang Jam Ke 30 .....	54
22. Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Belalang Jam Ke 36 .....	54
23. Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Belalang Jam Ke 42 .....	54
24. Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Belalang Jam Ke 48 .....	55
25. Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> pada Medium Substitusi Jam Pengamatan Ke 6 .....	55
26. Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> pada Medium Substitusi Jam Pengamatan Ke 12 .....	55
27. Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> pada Medium Substitusi Jam Pengamatan Ke 18 .....	55
28. Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> pada Medium Substitusi Jam Pengamatan Ke 24 .....	55
29. Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> pada Medium Substitusi Jam Pengamatan Ke 30 .....	56
30. Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> pada Medium Substitusi Jam Pengamatan Ke 36 .....	56

31. Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> pada Medium Substitusi Jam Pengamatan Ke 42 .....	56
32. Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati <i>B. subtilis</i> pada Medium Substitusi Jam Pengamatan Ke 48 .....	56
33. Tabel Analisis Ragam Indeks Zona Bening .....	56
34. Tabel Harga Medium Perbanyak Agens Hayati Bakteri.....	57
35. Gambar Diagram Alir Pembuatan Tepung Keong mas.....	57
36. Gambar Diagram Alir Pembuatan Tepung Belalang.....	58
37. Gambar Diagram Alir Pembuatan Tepung Ulat.....	58
38. Gambar Diagram Alir Pembuatan Medium Susbstitusi Cair .....	58
39. Gambar Diagram Alir Pembuatan Medium Susbstitusi Padat .....	59
40. Gambar Medium Susbstitusi Padat.....	59
41. Gambar Medium Susbstitusi Cair.....	60
42. Gambar Koloni <i>B. subtilis</i> Medium Susbstitusi .....	60
43. Gambar Serangga Hama.....	60
44. Gambar Perbandingan Medium Substitusi Sebelum dan Sesudah Perbanyak <i>B. subtilis</i> dengan digojok 48.....	61
45. Laporan Analisis Medium Substitusi.....	62

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Erwinia carotovora* merupakan salah satu bakteri penyebab penyakit busuk lunak pada tanaman kentang, baik ketika di lapang maupun dalam gudang penyimpanan (Addy, 2007). Serangan patogen ini dapat mengubah sifat fisik, kimia dan fisiologi umbi kentang sehingga menyebabkan kerugian yang besar akibat penurunan kualitas dan kuantitas hasil panen. Menurut Vanneste (1996), *Erwinia carotovora* dapat menyebabkan kerusakan antara 15-100%. Patogen ini hampir ditemukan di semua areal pertanaman kentang dan masih belum ditemukan pengendalian yang efektif.

Muis (2007) mengemukakan bahwa *Bacillus subtilis* yang dibalutkan pada biji atau benih tanaman akan berkembang pada sistem perakaran dan berkompetisi dengan cendawan tular tanah seperti *Erwinia* sp. Penelitian Javandira (2012) menyebutkan bahwa *B. subtilis* berpotensi mengendalikan patogen *E. carotovora* dengan menghasilkan senyawa antibiotik. Beberapa senyawa antimikroba juga dihasilkan oleh *Bacillus* diantaranya senyawa *basitrasin*, *basilin*, *basilomisin* B, *difisidin*, *oksidifisidin*, *lesitinase*, *subtilisin* (Supriadi, 2006). *B. subtilis* juga menghasilkan senyawa siderofor dan antibiotic yang dapat menghambat pertumbuhan patogen (Habazar dan Yahewardi, 2006). Sifat antagonis *B. subtilis* tersebut banyak dimanfaatkan sebagai pengendalian hayati atau dikenal sebagai agens hayati yang mulai banyak dikembangkan.

Perbanyak agens hayati untuk aplikasi lapang, pada umumnya menggunakan medium EKG (Ekstrak Kentang Gula). Tetapi medium ini kurang cocok karena mempunyai kandungan protein rendah. Padahal bakteri membutuhkan protein yang tinggi untuk metabolisme tubuhnya (Todar, 2014). Salah satu medium yang cocok untuk perbanyak bakteri agens hayati adalah *Nutrient Broth* (NB), tetapi medium ini sangat mahal. *Nutrient Broth* (NB) biasanya hanya digunakan pada skala laboratorium untuk keperluan penelitian. Sehingga diperlukan kajian mengenai medium substitusi untuk perbanyak agens hayati bakteri yang efektif dan murah.

Ada banyak sumber protein yang terdapat pada binatang di alam, termasuk jenis-jenis hama seperti keong mas, ulat dan belalang. Saat ini, hama-hama tersebut mulai dikaji pemanfaatannya, karena mengandung protein yang cukup tinggi. Pada umumnya serangga (termasuk golongan ulat atau larva dan belalang) mengandung protein 40-60% (Koswara, 2012). Menurut Kusmaryani (2005), kandungan protein pada belalang sebesar 62,2%. Susanto (2010) menyebutkan bahwa keong mas mengandung sebesar 10,30% protein.

Berdasarkan latar belakang diatas, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi hama keong mas (*Pomacea canaliculata*), ulat penggulung daun pisang (*Erionata thrax*), dan belalang (*Valanga nigricornis*) sebagai medium substitusi untuk perbanyak agens hayati *B. subtilis*. Pada penelitian ini juga dilakukan uji antagonis untuk mengetahui pengaruh medium substitusi terhadap aktivitas antagonis *B. subtilis* dalam mengendalikan *E. carotovora*.

### 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana potensi protein *P. canaliculata*, *Erionata thrax*, dan *V. Nigricornis* sebagai medium substitusi perbanyak agens hayati *B. subtilis*?
2. Bagaimana aktivitas antagonis agens hayati *B. subtilis* terhadap *Erwinia carotovora* setelah diperbanyak menggunakan medium substitusi?

### 1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui potensi protein *P. canaliculata*, *Erionata thrax*, dan *V. Nigricornis* sebagai medium substitusi perbanyak agens hayati *B. subtilis*.
2. Untuk mengetahui aktivitas antagonis agens hayati *B. subtilis* terhadap *Erwinia carotovora* setelah diperbanyak menggunakan medium substitusi.

### 1.4 Hipotesis Penelitian

1. Hama *P. canaliculata*, *Erionata thrax*, dan *V. Nigricornis* berpotensi sebagai medium substitusi perbanyak agens hayati *B. subtilis*.

2. *B. subtilis* setelah diperbanyak menggunakan medium substitusi tetap memiliki aktivitas antagonis terhadap *Erwinia carotovora*.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini dapat bermanfaat untuk beberapa kalangan, yaitu:

- Bagi peneliti.

Memberikan informasi mengenai penggunaan medium substitusi perbanyak agens hayati yang alami, lebih murah dan tidak berbahaya; sebagai acuan dasar penelitian selanjutnya mengenai medium substitusi dari hama.

- Bagi petani.

Sebagai informasi pembuatan agens hayati murah dari medium substitusi; dapat menambah penghasilan karena jika medium substitusi ini banyak digunakan, maka petani dapat menjual hama-hama *P. canaliculata*, *V. Nigricornis*, dan *Erionota thrax* sebagai bahan baku sekaligus melakukan pengendalian mekanis terhadap tanaman budidayanya.

- Bagi industri kimia.

Penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan sebuah produk yang mampu masuk dalam industri bahan-bahan kimia, yaitu medium substitusi perbanyak agens hayati bakteri.



## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Agens Hayati Antagonis

Penelitian, pemanfaatan dan pengembangan agens hayati untuk mengendalikan patogen tanaman sudah banyak dilakukan dan dikembangkan. Bahkan sampai pada tingkat petani di desa-desa. Pengertian agens hayati menurut Supriadi (2006) berdasarkan Peraturan Menteri No 411 Tahun 1995 adalah setiap organisme yang meliputi spesies, subspesies, varietas, semua jenis serangga, nematoda, protozoa, cendawan (fungi), bakteri, virus, mikoplasma, serta organisme lainnya dalam semua tahap perkembangannya yang dapat dipergunakan untuk keperluan pengendalian hama dan penyakit atau organisme pengganggu, proses produksi, pengolahan hasil pertanian, dan berbagai keperluan lainnya.

Beberapa bakteri penting yang banyak dipelajari dan dimanfaatkan untuk agens hayati antagonis yaitu: *B. subtilis* dan *P. fluorescens* (Supriadi, 2006). Menurut Habazar *et al.* (2006) bakteri rhizosfer seperti *B. subtilis* telah banyak digunakan sebagai agensi pengendali hayati patogen tumbuhan. Bakteri *B. subtilis* mampu digunakan sebagai agensi pengendali hayati karena bakteri ini mampu menghasilkan senyawa antimikroba terhadap patogen tumbuhan.

Bakteri agens hayati mengendalikan patogen tumbuhan dengan cara; (1) melakukan kompetisi dalam mendapatkan zat makanan; (2) menghasilkan senyawa antimikroba terhadap patogen tumbuhan; (3) menghasilkan senyawa-senyawa metabolit seperti siderofor, antibiotik atau enzim ekstraselluler. Menurut Muis (2007) jika *B. subtilis* dibalutkan pada biji atau benih tanaman maka bakteri tersebut akan berkembang pada sistem perakaran tanaman. Selanjutnya bakteri akan berkompetisi dan menekan cendawan tular tanah seperti *Erwinia sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Fusarium sp.*, dan *Aspergillus sp.*. Bakteri tersebut terus hidup pada sistem perakaran dan melindungi tanaman sepanjang musim tanam.

Pada umumnya agens hayati diperbanyak menggunakan *Natrium agar* (NA) dalam bentuk padat atau *Nutrient broth* (NB) dalam bentuk cair pada skala labratorium. *Nutrient agar* (NA) terdiri dari *beef extract* (*difco*), *peptone* dan agar. Komposisi masing-masing komponen per liter yaitu, 3 gram *beef extract*

(*difco*), 5 gram *peptone* dan 15 gram agar. *Natrium broth* (NB) memiliki komposisi yang sama dengan NA tapi tanpa menggunakan agar (Waluyo, 2010). Perbanyak juga menggunakan EKG (Ekstrak Kentang Gula) untuk skala lebih besar seperti pada pembuatan agens hayati untuk aplikasi di lapang.

## 2.2 Bakteri *Bacillus subtilis*

### 2.2.1 Klasifikasi bakteri *B. subtilis*

Agrios (2005) mengklasifikasikan bakteri agens hayati *B. subtilis* sebagai berikut:

Kingdom	:	Procyotae
Divisio	:	Firmicutes
Kelas	:	Firmibacteria
Famili	:	Bacillaceae
Genus	:	Bacillus
Spesies	:	<i>Bacillus subtilis</i>

### 2.2.2 Karakteristik bakteri *B. subtilis*

*B. subtilis* ialah jenis bakteri yang umum ditemukan di banyak tempat, yaitu di tanah, air, udara dan materi tumbuhan yang terdekomposisi (Tanighuci *et al.*, 2005).

Tabel 1. Karakteristik bakteri *B. subtilis*

	Pengujian	Reaksi
Sifat Gram		+
Flagela		+
Endospora (sentral)		+
Pembengkakan sel berspora		-
Tumbuh pada suhu 45°C		+
Tumbuh pada pH 5,7		+
Tumbuh pada kandungan NaCl 1%		+
Penggunaan sitrat		+
Hidup dalam glukosa (tanpa oksigen)		-
Produksi asam dari karbon: arabinose, manitol&xylose		+
Vp test		+
Hidrolisis pati		+

Sumber: Leary *et al.* (1988)

*B. subtilis* dapat beradaptasi pada kondisi termal, yaitu dengan suhu 25° C, 35° C dan 40° C selama 2 hari dengan kondisi optimal pada suhu 35° C dan masih

dapat bertahan pada suhu  $40^{\circ}\text{C}$  (Sreekumar *et al.*, 2010; Sanayeい *et al.*, 2010). Bakteri ini termasuk bakteri saprofit, tidak menyebabkan penyakit pada tanaman, dapat hidup dalam kondisi anaerob (tanpa oksigen), bersifat Gram positif, dan membentuk spora, serta menghasilkan beberapa jenis senyawa antimikroba seperti basitrasin, basilin, basilomisin B, difisidin, oksidifisidin, lesitinase, dan subtilisin (Supriadi, 2006).

### 2.3 Hama Belalang Kayu *Valanga nigricornis*

#### 2.3.1 Klasifikasi dan Karakteristik Belalang (*V. nigricornis*)

*V. nigricornis* hidup di daerah panas yang banyak tumbuh-tumbuhan atau semak pada area yang sangat luas dan dapat beradaptasi pada kondisi ekologi yang sangat berbeda. Kondisi hidup optimum *V. nigricornis* pada suhu  $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$  dan curah hujan 50-100 milimeter perbulan dengan kondisi kelembaban yang cukup. Belalang ini memiliki antena dan ovipositor yang lebih pendek dari tubuhnya dengan alat mulut yang berfungsi untuk memotong dan merobek makanan. Serangga ini dapat mengeluarkan bunyi dengan cara menggosok femur bagian belakang, perut (untuk komunikasi), atau dengan menjentikkan bagian sayapnya.

Menurut Kalshoven (1981), daur hidup *V. nigricornis* merupakan metamorfosis tidak sempurna. Pada kondisi laboratorium (temperatur  $28^{\circ}\text{C}$  dan kelembapan 80% RH) daur hidup dapat mencapai 6,5 bulan sampai 8,5 bulan, dan fekunditas rata-ratanya mencapai 158 butir. Metamorfosis sederhana terjadi dengan perkembangan melalui tiga stadia yaitu telur, nimfa, dan dewasa (imago). Belalang ini bertelur pada awal musim kemarau dan akan menetas pada awal musim hujan yaitu bulan Oktober dan November. Telurnya berbentuk bulat panjang yang diletakkan berkelompok dalam tanah dengan kedalaman 5-8 cm. Telur ini berukuran 2-3 cm (Sudarmo, 2000). Pada tanah lembab penetasan telur setelah 5-7,5 bulan, sedangkan pada tanah yang kering setelah 4-5 minggu.

Stadia nimfa dan imago dapat dibedakan pada bentuk dan ukuran sayap serta ukuran tubuhnya. Alat-alat tambahan lain pada caput terdiri dari: dua buah (sepasang) mata facet, sepasang antene, serta tiga buah mata sederhana (occeli). Menurut Kalshoven (1981), struktur tubuhnya terdiri dari: dua pasang sayap serta

tiga pasang kaki yang terdapat pada thorax. Pada ruas pertama abdomen terdapat suatu membran alat pendengar yang disebut tympanum, spiralukum yang merupakan alat pernafasan luar terdapat pada tiap-tiap ruas abdomen maupun thorax. Anus dan alat genetalia luar dijumpai pada ujung abdomen (segmen terakhir abdomen).

Belalang betina dapat hidup selama 3-4 bulan, jantan 4-5 bulan. Seekor belalang betina selama hidupnya dapat bertelur beberapa kali. Telurnya diletakkan berkelompok dilindungi oleh busa berwarna putih yang dapat menutupi sampai mulut lubang tempat peneluran. Tiap kelompok telur terdiri dari 50-140 butir. Morfologi tubuh belalang jenis *V. nigricornis zehntneri* berwarna hijau kecokelatan dengan corak warna terang di belakang femur, kemerahan di belakang tibia, dan pada dasar sayap berwarna merah. Panjang belalang betina 58-71 mm, belalang jantan 49-63 mm. Sedangkan untuk jenis *V. nigricornis melanocornis*. Ukuran tubuhnya lebih besar, panjang tubuh belalang betina 73-91 mm, belalang jantan 61-68 mm. Klasifikasi *V. nigricornis* menurut Burmeister (1838) sebagai berikut:

Kingdom	:	Animalia
Divisio	:	Arthropoda
Kelas	:	Insecta
Famili	:	Orthoptera
Genus	:	Valanga
Spesies	:	<i>Valanga nigricornis</i>

### 2.3.2 Belalang (*V. nigricornis*) Sebagai hama

Belalang mampu menyerang berhektar-hektar budidaya pertanian hingga licin tandas. Ladang yang semula hijau subur, bisa tiba-tiba menjadi lembah gundul. Serangga (insekt) ini terhitung paling tinggi populasinya. Mendominasi sekitar 75 persen populasi binatang di dunia. Belalang termasuk sekelompok serangga bersayap lurus (Orthoptera) yang berevolusi sejak 300 juta tahun lalu (Sanjaya, 2010).

Perkembangbiakan populasi belalang kembar terjadi akibat dari perubahan iklim dengan curah hujan rata-rata 177,9 mm/th dengan hari hujan 11,3 kali/bulan, suhu rata-rata berkisar 23,6 °C – 26,8°C dan pada siang hari rata-rata

mencapai 31,1 OC. Jika populasi belalang kembara ini sangat tinggi, maka dapat menyerang tanaman hortikultura (padi, jagung dan sayur-sayuran) sampai dengan tanaman kelapa sawit. Pada tahun 1999 serangan hama belalang kembara mencapai 9 kecamatan di kabupaten Ketapang dengan luas daerah serangannya mencapai 4420 ha daerah pertanian dan perkebunan (Sahala, 2005).



Gambar 1.Belalang (*Valanga nigricornis*). Sumber: Punnadee *et al.*, 2014.

### 2.3.3 Kandungan Protein Belalang (*V. nigricornis*)

Belalang kayu (*V. nigricornis*) memiliki protein lebih tinggi dibandingkan udang windu (Kusmaryani, 2005). Tabel 2 menunjukkan komposisi kandungan protein belalang dibandingkan dengan serangga lainnya:

Tabel 2. Komposisi gizi jenis-jenis serangga yang dapat digunakan sebagai bahan pangan (per 100 gram bagian yang dapat dimakan)

Jenis Serangga	Energi (kkal)	Air (%)	Protein (%)	Lemak (%)	Karbohidrat (%)	Serat (%)
Semut Terbang						
• Betina		60,0	3,0	9,5		
• Jantan		60,0	10,1	1,3		
Kumbang						
<i>Polypleis, Sternocera</i>	192	56,2	27,1	3,7	11,2	6,4
Larva (ulat) kumbang kelapa						
• Mentah	86	81,1	10,6	2,7	4,2	2,8
• Kering	430	9,1	52,9	15,4	16,9	5,4
Jangkrik						
( <i>Bracytrypes membranaceus</i> )						
• Mentah	117	76,0	13,7	5,3	2,9	2,9
Belalang						
• Mentah	170	62,7	26,8	3,8	5,5	2,4
• Kering	420	7,0	62,2	10,4	15,8	
Rayap (termes)						
• Mentah	356	44,5	20,4	28,0	4,2	2,7
• Kering	656	1,7	35,7	54,3	3,5	

Sumber: Kusmaryani (2005)

## 2.4 Hama Keong Mas (*Pomacea canaliculata*)

### 2.4.1 Klasifikasi dan Karakteristik Keong mas (*P. canaliculata*)

Keong mas memiliki karakteristik khusus yang dapat digunakan untuk membedakan dengan keong-keong jenis lain yang hidup pada habitat yang sama. Keong mas dewasa memiliki cangkang berwarna coklat dan daging berwarna putih krem hingga kemerah-merahan. Ukuran tubuhnya bervariasi dan tergantung pada ketersediaan makanan. Makanan keong mas umumnya berupa tanaman yang masih muda dan lunak, misalnya bibit padi, sayuran, dan enceng gondok (Budiyono, 2006). Ukuran diameter cangkang keong mas dapat mencapai 4 cm dengan berat 10-20 gram.



Gambar 2. Keong mas (*Pomacea canaliculata*). Sumber: Jackman (2005)

Keong mas memiliki *umbilicus* terbuka. Operkulum yang menutupi lubang *aperture* terbuat dari kitin dan merupakan operkulum tipe konsentris. Keong mas dikategorikan sebagai hewan omnivora. Klasifikasi keong mas (*Pomacea canaliculata*) menurut Cazzaniga (2002) adalah sebagai berikut:

Filum	: Moluska
Kelas	: Gastropoda
Ordo	: Mesogastropoda
Famili	: Ampullariidae
Genus	: <i>Pomacea</i>
Spesies	: <i>Pomacea canaliculata</i>

### 2.4.2 Keong mas (*P. canaliculata*) sebagai hama

Keong mas (*Pomacea canaliculata*) adalah siput sawah dengan warna cangkang keemasan yang dianggap sebagai salah satu hama dalam produksi padi. Keong mas disebut hama karena menjadi pemakan tanaman padi di areal

persawahan dan telurnya yang menempel pada batang padi menyebabkan tanaman padi mati.

Tabel 3. Data Luas Serangan Keong Mas di Indonesia Tahun 2003-2007

Tahun	Luas serangan keong mas (Ha)		
	Terkena	Puso	Total
2003	13,227	19	13,246
2004	16,737	46	16,783
2005	14,711	68	14,779
2006	15,840	52	15,892
2007	22,110	77	22,187
Rata-rata 1997-2006	11,361	69	11,380

Sumber: Direktorat Perlindungan Tanaman Pangan (2008)

Sejak tahun 1996, hama ini ditemukan menyerang tanaman padi pada lahan di 12 kabupaten dan pada tahun 1999 berkembang menjadi 16 kabupaten (Hendarsih dan Kurniawati, 2002). Luas areal pertanaman padi sawah yang terserang keong mas baru tercatat secara resmi pada tahun 1997, yaitu 3.630 ha. Pada tahun 2003 luas serangan keong mas mencapai lebih dari 13.000 ha dan meningkat menjadi 22.000 ha pada tahun 2007 (Tabel 1).

#### 2.4.3 Kandungan Protein Keong mas (*P. canaliculata*)

Komposisi kimia keong mas dinyatakan dalam persentase dari unsur-unsur air, abu, protein, dan lemak. Komposisi kimia bahan baku sangat bervariasi, tergantung pada ukuran, kelamin, tingkat kematangan seksual, maupun waktu penangkapan biota. Komposisi kimia daging keong mas dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Komposisi kimia keong mas

Komposisi Kimia	Nurjanah <i>et al.</i> (1996)	Susanto (2010)	Pambudi (2011)
Kadar air	84,70 % (bb)	81,19 % (bb)	81,50 % (bb)
Kadar protein	9,33 % (bb)	10,30 % (bb)	7,58 % (bk)
Kadar lemak	0,91 % (bb)	0,51 % (bb)	2,10 7,58 % (bk)
Kadar abu	1,43 % (bb)	4,07 % (bb)	9,03 7,58 % (bk)

Sumber: Nurjanah *et al.* (1996), Susanto (2010) dan Pambudi (2011)

### 2.5 Hama Ulat Daun Penggulung Pisang Pisang (*Erionota thrax*)

#### 2.5.1 Klasifikasi dan Karakteristik Ulat Daun Penggulung (*Erionota thrax*)

Klasifikasi *Erionota thrax* menurut Linnaeus (1976), sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Arthropoda
Kelas	: Insecta
Ordo	: Lepidoptera
Famili	: Hesperiidae
Genus	: Erionata
Spesies	: <i>Erionata thrax</i> .

*Erionata thrax* merupakan salah satu hama penting tanaman pisang. Ulat ini termasuk ke dalam famili Hesperiidae, Ordo Lepidoptera. Telur berwarna kuning dan menetas setelah mencapai umur 5-8 hari setelah diletakkan (Satuhu dan Supriyadi, 1999). Imago meletakkan telur secara berkelompok kira-kira 25 butir pada permukaan bawah daun yang utuh pada malam hari (Kalshoven 1981).

### 2.5.2 Ulat Daun Penggulung (*Erionata thrax*) Sebagai hama

Menurut Novianti (2008), larva yang masih muda warnanya sedikit kehijauan dan tubuhnya tidak dilapisi lilin. Larva yang ukurannya lebih besar berwarna putih kekuningan dan tubuhnya dilapisi lilin. Larva muda yang baru menetas memotong daun pisang secara miring mulai dari bagian tepi daun lalu menggulung potongan tersebut. Satu larva hidup dalam satu gulungan daun. Stadium larva berlangsung selama 28 hari. Larva makan dari bagian dalam gulungan tersebut, kemudian membentuk gulungan yang lebih besar sesuai dengan perkembangan larva sampai instar akhir. Mortalitas larva cukup tinggi pada larva muda karena pada permukaan tubuhnya belum ditutupi lilin dan gulungan daunnya masih terbuka.



Gambar 3. *Erionata thrax* (Hamzati, 2011)

Pengendalian *Erionata thrax* dapat dilakukan dengan cara mekanis dan kimia. Pengendalian mekanis dapat dilakukan dengan cara mengumpulkan telur,

larvadan daun yang menggulung, kemudian melenyapkannya. Pengendalian ini kurang efisien karena tidak cocok pada pertanaman yang luas. Pengendalian secara kimiadilakukan dengan insektisida racun kontak maupun racun perut misalnya insektisida yang mengandung bahan aktif diazinon, endosulfan, dieldrin dan dimethoathe. Penyemprotan dilakukan pada saat telur baru menetas (Satuhu & Supriyadi 1999).

### 2.5.3 Kandungan Protein Ulat Daun Penggulung (*Erionata thrax*)

Menurut Koswara (2005) sebagian besar serangga mengandung 40-60% protein. Larva kupu-kupu sering disebut *caterpillar*, yang jenisnya banyak digunakan sebagai bahan pangan. Di Zambia, ulat-ulat yang hidup berkelompok merupakan sumber daya alam yang penting untuk musim hujan. Selama beberapa bulan digunakan untuk menyumbang protein hewani dalam jumlah banyak. Meski kebanyakan yang digunakan adalah ulat sutera dan ulat kumbang kelapa, namun pada umumnya pemanfaatan protein ulat sudah mulai dikembangkan.

## 2.6 Penyakit Busuk Lunak Umbi Kentang (*Erwinia carotovora*)

### 2.6.1 Klasifikasi bakteri *E. carotovora*

Goto (1990) mengklasifikasikan bakteri penyebab busuk lunak pada tanaman kentang *E. carotovora*, sebagai berikut:

Kingdom	:	Prokaryotae
Divisio	:	Gracilicutes
Kelas	:	Proteobacteria
Famili	:	Enterobacteriaceae
Genus	:	Erwinia
Spesies	:	<i>Erwinia carotovora</i>

### 2.6.2 Fisiologi dan Morfologi Bakteri *E. carotovora*

*E. carotovora* termasuk anggota Enterobacteriaceae. Menurut Schaad *et al.* (2001), bakteri ini merupakan anaerobik fakultatif, berbentuk batang dengan ukuran  $0,5 \times 1,0\text{-}3 \mu\text{m}$ , bersifat gram negatif dan bergerak dengan flagela peritrik. *E. carotovora* juga bersifat katalase positif, fermentatif, menghasilkan asam dari glukosa, mereduksi nitrat, menghasilkan  $\beta$ -galaktosidase dan  $\text{H}_2\text{S}$ , L-arabinose,

D-galaktose, D-glukose, glycerol, D-mannose, D-ribose dan sucrose tapi tidak menghasilkan urease dan tidak menghasilkan asam dari adonitol.

Beberapa strain *E.carotovora* dapat menghidrolisa L-rhamnose dan D-mannitol tapi tidak pada dekstrin. Suhu optimum pertumbuhan *E. carotovora* antara 27-30°C, sedangkan suhu maksimumnya bervariasi dari 32°C sampai 40°C. *E. carotovora* bersifat patogenik pada beberapa tanaman (Schaad *et al.*, 2001).

### 2.6.3 Gejala Penyakit Busuk Lunak Umbi Kentang (*E. Carotovora*)

Menurut Chailani (2010), gejala penyakit busuk lunak umbi kentang ditandai dengan infeksi pada umbi. Umbi terlihat seperti berbintik krem sampai coklat kemerahan, busuk dan lunak. Pada kondisi lingkungan lembab, bintik tersebut akan meluas dengan cepat dan bagian jaringan umbi hingga umbi bagian dalam. Jika umbi dipotong, bagian umbi dalam akan terlihat basah, seperti bubur, berwarna krem sampai coklat kemerahan dengan dibatasi oleh warna hitam antara bagian umbi yang terserang dengan umbi yang masih sehat. Jaringan yang membusuk sangat lunak dan kental, pembusukan tersebut akan meluas hingga hampir ke sebagian besar umbi kentang.

Pembusukan pada umbi kentang, pada awalnya tidak mengeluarkan bau. Bau busuk terciptakan ketika pembusukan berkembang merata ke seluruh bagian umbi. Pada kondisi lingkungan kering, bagian umbi yang busukakan menjadi seperti berkapur berwarna pucat sampai putih. Infeksi *E. carotovora* pada tanaman menyebabkan daun menjadi layu, menguning, dan kadang daun terlihat menggulung keatas. Batang yang terinfeksi berwarna coklat muda, kadang tidak berwarna namun juga tidak berwarna hitam, dan batang yang terinfeksi akan busuk dan menjadi lunak (Chailani, 2010).

### 2.6.4 Penyebaran Penyakit *E. carotovora*

*E. carotvora* ini tersebar luas di Indonesia, misalnya di Sumatera Utara, Sumatera Selatan, Lampung, Jawa Timur, Jawa Tengah, Bali, Sulawesi Selatan dan Nusa Tenggara Timur. Bakteri ini hidup dalam tanah, air tanah dan sisa-sisa tanaman, terutama pada kelembaban dan suhu yang tinggi. Bakteri *E. carotovora* menginfeksi umbi kentang melalui lentisel, luka pada umbi kentang maupun luka karena serangga. Infeksi, kemudian menyebar ke bagian umbi yang lain (Chailani, 2010).

*E. carotovora* dapat menyerang umbi kentang bersama dengan patogen yang lain. Infeksi dan perkembangan *E. carotovora* dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu umbi yang masih muda, terdapat luka pada umbi, kekurangan cahaya atau sinar, kelembaban pada tanah yang tinggi dan kekurangan oksigen ketika umbi di penyimpanan (Chailani, 2010). *E. carotovora* dapat menyebar selama proses setek atau *cutting*, penanaman atau *planting*, percikan air hujan serta melalui irigasi.



### III. BAHAN DAN METODE

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan (Sub Laboratorium Bakteriologi) Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Malang mulai bulan Oktober 2013 sampai bulan Mei 2014.

#### 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan selama penelitian yaitu: oven, blender kering, gojokan, panci, kompor, autoklaf, scalpel, cawan petri, jarum ose, bunsen, inkubator, *showcase*, mikropipet, mikrotube, tip, beaker glass, timbangan analitik, LAF, tabung reaksi, pinset, pisau, botol media, gelas ukur, gunting, pipet, botol kecil, spektrofotometer, jangka sorong, kotak plastik, saringan, *hand counter* dan penggaris.

Bahan yang digunakan adalah belalang (*Valanga nigricornis*), keong mas (*Pomacea canaliculata*) dan ulat penggulung daun pisang (*Erionota thrax*), biakan murni bakteri *Erwinia carotovora* dan *B. subtilis* isolat UB-ABS1 koleksi Laboratorium Penyakit Tumbuhan Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan FPUB, *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), aquades, spiritus, alkohol 70%, alkohol 90%, agar teknis, alumunium foil, plastik wrapping, tissue, kapas dan keras saring 5 mm.

#### 3.3 Metode Penelitian

##### 3.3.1 Uji Medium Substitusi untuk Perbanyakkan Bakteri Agens Hayati Menggunakan *B. subtilis*

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 16 perlakuan jenis dan konsentrasi medium yaitu:

- P0: Konsentrasi 8 gram *Nutreint broth* (NB)/L aquades
- AP1: Konsentrasi tepung keong mas (*P. canaliculata*) 4 gram/L aquades
- AP2: Konsentrasi tepung keong mas (*P. canaliculata*) 6 gram/L aquades
- AP3: Konsentrasi tepung keong mas (*P. canaliculata*) 8 gram/L aquades

- AP4: Konsentrasi tepung keong mas (*P. canaliculata*) 10 gram/L aquades
- AP5: Konsentrasi tepung keong mas (*P. canaliculata*) 12 gram/L aquades
- BP1: Konsentrasi tepung ulat (*Erionata thrax*) 4 gram/L aquades
- BP2: Konsentrasi tepung ulat (*Erionata thrax*) 6 gram/L aquades
- BP3: Konsentrasi tepung ulat (*Erionata thrax*) 8 gram/L aquades
- BP4: Konsentrasi tepung ulat (*Erionata thrax*) 10 gram/L aquades
- BP5: Konsentrasi tepung ulat (*Erionata thrax*) 12 gram/L aquades
- CP1: Konsentrasi tepung belalang (*V. nigricornis*) 4 gram/L aquades
- CP2: Konsentrasi tepung belalang (*V. nigricornis*) 6 gram/L aquades
- CP3: Konsentrasi tepung belalang (*V. nigricornis*) 8 gram/L aquades
- CP4: Konsentrasi tepung belalang (*V. nigricornis*) 10 gram/L aquades
- CP5: Konsentrasi tepung belalang (*V. nigricornis*) 12 gram/L aquades

Masing - masing perlakuan menggunakan sample 10 mL medium cair ditambah dengan 100  $\mu\text{L}$  *B.subtilis*  $10^{10}$  cfu/mL kemudian digojok selama 48 jam dan diamati setip 6 jam sekali. Masing-masing perlakuan diulang 3 kali.

#### **3.4.3. Uji Antagonis Agens Hayati *B.subtilis* Hasil Perbanyakkan Medium Substitusi dengan *E. carotovora***

Uji antagonis agens hayati *B. subtilis* dilakukan secara in vitro pada cawan petri dengan metode *overlay* atau lebih dikenal dengan zona bening menurut Wakimoto *et al.* (1986) dan Hara dan Ono(1991). Uji dilakukan untuk mengetahui aktivitas antagonis agens hayati *B. subtilis* terhadap *E. carotovora* setelah diperbanyak dengan medium substitusi. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan diulang 3 kali. *B. subtilis* yang akan diuji diperoleh dari hasil gojokan dengan 7 perlakuan yaitu:

- P0: Konsentrasi 8 gram *Nutreint broth* (NB)/L aquades
- AP1: Konsentrasi tepung keong mas (*P. canaliculata*) 4 gram/L aquades
- AP3: Konsentrasi tepung keong mas (*P. canaliculata*) 8 gram/L aquades
- AP5: Konsentrasi tepung keong mas (*P. canaliculata*) 12 gram/L aquades
- BP1: Konsentrasi tepung ulat (*Erionata thrax*) 4 gram/L aquades
- BP3: Konsentrasi tepung ulat (*Erionata thrax*) 8 gram/L aquades
- BP5: Konsentrasi tepung ulat (*Erionata thrax*) 12 gram/L aquades

- CP1: Konsentrasi tepung belalang (*V. nigricornis*) 4 gram/L aquades
- CP3: Konsentrasi tepung belalang (*V. nigricornis*) 8 gram/L aquades
- CP5: Konsentrasi tepung belalang (*V. nigricornis*) 12 gram/L aquades

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1 Persiapan

##### 1. Pembuatan Tepung Medium Substitusi

➤ Pembuatan Tepung Keong Mas (*P. canaliculata*)

Pembuatan tepung keong mas mengacu pada Wardana (2008), dilakukan dalam beberapa tahap yaitu: perebusan, pengeringan dan penggilingan. Perebusan keong mas dilakukan selama 20 menit dari dalam cangkangnya. Daging keong mas tersebut selanjutnya dikeringkan dalam oven  $60^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam. Kemudian, daging keong mas digiling untuk mendapatkan tepung keong mas. Tepung disaring dan diuji protein. Diagram alir pembuatan tepung keong mas dapat dilihat pada Lampiran 35.

➤ Pembuatan Tepung Ulat Gulung Daun Pisang (*Erionota thrax*)

Pembuatan tepung ulat ini diambil dari metode yang digunakan oleh Pagarra (2008) yang untuk membuat tepung dari ulat sagu (*R. ferrugineus*). Metode yang diambil adalah metode dengan perlakuan yang mampu menghasilkan protein terbanyak. Ulat *Erionota thrax* dikeringkan dalam oven dengan suhu  $60^{\circ}\text{C}$  selama 25 jam. Kemudian digiling dan diuji kandungan proteininya. Diagram alir pembuatan tepung ulat pada Lampiran 36.

➤ Pembuatan Tepung Belalang (*V. nigricornis*)

Pembuatan tepung belalang diawali dengan pengeringan belalang menggunakan dalam oven  $60^{\circ}\text{C}$  selama 96 jam. Kemudian belalang digiling dengan alat Wiley mill (penggiling tepung) menggunakan saringan berdiameter 1 mm untuk mendapatkan tepung belalang (Daryatmo, 2004).

Metode ini digunakan oleh Daryatmo (2004) untuk membuat tepung belalang dengan jenis belalang kumbara (*Locusta sp.*). Pada penelitian ini juga diasumsikan bahwa dengan metode ini masih berlaku pada belalang kayu (*Valanga nigricornis*). Tepung kemudian di uji kandungan proteininya. Diagram alir pembuatan tepung belalang dapat dilihat pada Lampiran 37.

### ➤ Pengujian Protein

Uji kandungan protein dilakukan di Laboratorium Kimia UMM. Metode analisis yang digunakan untuk uji protein adalah *semi micro kjeldhal*, metode *soxhlet* untuk analisis lemak, metode *acid alkali digestion* untuk analisis serat, metode *furnace* untuk analisis abu, metode *oven* untuk analisis air, dan metode *calculation based on nutrient* (BETN). Hasil uji dinyatakan dalam bentuk % per 100 gram untuk sample padat dan % per 100 mL untuk sample dalam bentuk cair.

## 2. Pembuatan Medium Substitusi dalam Bentuk Cair dan Padat

### ➤ Pembuatan Media Cair

Pembuatan media cair diawali dengan menimbang tepung medium sesuai kebutuhan P1 4 gr/L, P2 6 gr/L, P3 8 gr/L, P4 10 gr/L, dan P5 12 gr/L. Kemudian ditambahkan aquades dan direbus hingga mendidih. Lalu diendapkan dengan diinkubasi minimal 1 x 24 jam pada suhu 2-5°C dan dibuang endapannya sebelum disterilissi. Diagram alir pembuatan medium substitusi cair dapat dilihat pada Lampiran 38.

### ➤ Pembuatan Media Padat

Pembuatan media padat menggunakan standar konsentrasi pembuatan *Nutrient Broth (NB)* padat yaitu 8 gr/L ditambahkan 20 gram agar. Tepung medium substitusi yang telah ditimbang ditabamhkan aquades, direbus hingga mendidih lalu diendapkan dengan diinkubasi minimal 1 x 24 jam pada suhu 2-5°C. Kemudian dibuang endapannya dan ditambahkan 20 gram agar dan disterilisasi. Diagram alir pembuatan medium substitusi padat dapat dilihat pada Lampiran 39.

### 3.4.2 Uji Medium Substitusi untuk Perbanyakan Bakteri Agens Hayati Menggunakan *B.subtilis*

#### 1. Perbanyakan Agens Hayati *B. subtilis*

Isolat bakteri berasal dari Koleksi Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Malang. Isolat agens hayati *B. subtilis* ini ditumbuhkan kembali pada media NA dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 x 24 jam.

## 2. Pembuatan Suspensi Agens Hayati *B. subtilis* konsentrasi $10^{10}$ cfu/ml.

Koloni biakan 24 jam kemudian dipanen dengan cara menambahkan 3-5 mL aquades pada petri kemudian gores permukaan NA menggunakan glass L, suspensi hasil panen diambil menggunakan mikropipet dan diletakkan pada botol yang telah disiapkan. Selanjutnya dilakukan pengukuran OD 1 menggunakan spektrofotometer dengan cara mengambil suspensi bakteri hasil panen sebanyak 1 mL dan sesuaikan dengan menambahkan aquades steril hingga mencapai OD 1.

Suspensi bakteri dengan konsentrasi  $10^{10}$  cfu/ml diperoleh melalui pengenceran suspensi bakteri dengan cara mengambil 100  $\mu\text{L}$  suspensi bakteri OD 1 kemudian dicampurkan dengan 900  $\mu\text{L}$  aquades steril. Pengenceran dilakukan sebanyak 10 kali. Selanjutnya dilakukan penghitungan kerapatan awal menggunakan metode *pour plate*.

## 3. Perlakuan Medium Substitusi untuk Perbanyakan *B. subtilis*

Medium substitusi cair yang telah disiapkan sebelumnya, dimasukkan ke dalam botol kecil sebanyak 10 mL untuk semua perlakuan pada masing-masing jenis medium. Kemudian ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  suspensi bakteri *B. subtilis*  $10^{10}$  cfu/ml. Selanjutnya digojok selama 48 jam.

## 4. Pengamatan Perbanyakan *B. subtilis*

Pengamatan dilakukan setiap 6 jam sekali selama 48 jam untuk menghitung kerapatan bakteri menggunakan metode *puor plate* melalui pengenceran sebelumnya. Pengencera n dilakukan dengan cara mengambil 100  $\mu\text{L}$  suspensi bakteri gojok kemudian dicampurkan dengan 900  $\mu\text{L}$  aquades steril dan dilakukan sebanyak pengenceran yang diinginkan.

*Pour plate* dilakukan dengan cara mengambil 100  $\mu\text{L}$  suspensi bakteri yang telah diencerkan pada konsentrasi tertentu kemudian diletakkan pada petri, ditambahkan medium substitusi padat yang masih cair pada suhu  $\pm 45^\circ\text{C}$  dan diputar searah untuk pencampuran. Selanjutnya, petri dibiarkan di LAF hingga medium padat, di wrapping dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24. Selanjutkan koloni bakteri yang tumbuh dihitung setelah inkubasi 24 jam.

## 5. Variable Pengamatan

Variable pengamatan dilihat dari populasi bakteri dan laju pertumbuhan bakteri. Populasi bakteri (setelah digojok 48 jam) diperoleh secara tidak langsung dengan menghitung jumlah sel yang hidup menggunakan metode *pour plate*. Kemudian dilakukan penghitungan waktu generasi (g) dan laju pertumbuhan (k). Waktu generasi dihitung dengan rumus (Pelczar dan Chan, 2006):

$$g = \frac{t}{3,3 \log(b/B)}$$

dimana g merupakan waktu generasi, t merupakan selisih waktu pengukuran, B merupakan populasi awal, b merupakan populasi setelah waktu t dan 3,3 merupakan faktor konversi log<sub>2</sub> menjadi log<sub>10</sub>.

Laju pertumbuhan agens hidup *B. subtilis* dihitung dengan formula (Madigan *et al.*, 2003):

$$k = 0,693/g$$

dimana k merupakan laju pertumbuhan (jam<sup>-1</sup>); g merupakan waktu generasi (menit); dan 0,693 adalah angka ketetapan.

### 3.4.3. Uji Antagonis Agens Hidup *B. subtilis* Hasil Perbanyakan Medium Substitusi dengan *E. carotovora*

Uji antagonis bakteri *B. Subtilis* dilakukan secara *in vitro* pada cawan petri dengan metode *overlay* atau lebih dikenal dengan zona bening menurut Wakimoto *et al.* (1986) dan Hara dan Ono (1991). Agens hidup *B. subtilis* yang telah digojok 48 jam dibuat suspensi 10<sup>9</sup> cfu/mL dalam aquades steril. Kemudian kertas saring dengan diameter 5 mm yang sudah steril dimasukkan ke dalam suspense selama ± 2 menit dan ditiriskan pada tissue steril selama 2 jam. Kertas saring yang sudah kering ditanam pada bagian tengah medium substitusi padat dan diinkubasi selama 2 x 24 jam untuk menumbuhkan bakteri. Selanjutnya, agens hidup *B. subtilis* yang telah tumbuh pada cawan petri dilapisi atau

dioverlay dengan suspense bakteri *E. carotovora* yang telah dicampur dengan ± 14 mL medium substitusi padat yang masih cair pada suhu ± 45°C. Hasil *overlay* tersebut diinkubasi selama 2 x 24 jam dan diamati diameter hambatan zona bening menggunakan jangka sorong. Variable pengamatan dilihat secara kuantitas melalui penghitungan indeks zona bening dengan rumus Hara dan Ono (1991):

$$I = \frac{B - A}{B}$$

dimana :

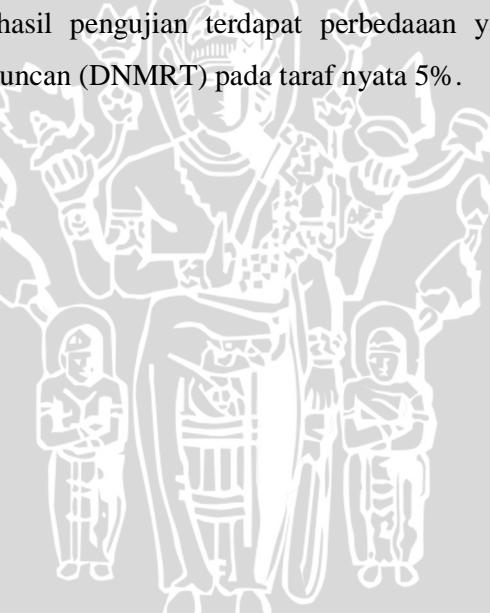
I = Indeks zona bening

A = diameter koloni agens hidup

B = diameter zona bening

### 3.5 Analisis Data

Data pengamatan dianalisis menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA) pada taraf 5 %. Bila hasil pengujian terdapat perbedaan yang nyata maka dilanjutkan dengan uji Duncan (DMRT) pada taraf nyata 5%.



## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 HASIL

#### 4.1.1 Hasil Pembuatan Medium Substitusi

Hasil pembuatan tepung medium substitusi dari hama keong mas, ulat dan belalang dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4.Tepung Medium Substitusi. (A) Tepung Keong mas (*Pomacea canaliculata*); (B) Tepung Ulat penggulung daun pisang (*Erionota thrax*); (C) Tepung Belalang (*Valanga nigricornis*)

Tepung dianalisis sifat fisik dan sifat kimianya untuk menunjukkan karakteristik yang dimiliki.Sifat fisik dari tepung medium substitusi dapat dilihat pada Tabel 5. Tepung medium substitusi memiliki kehalusan dengan lolos pada saringan 60 mess. Warna tepung menyesuaikan dengan bahan dasar hama. Tepung keong mas berwarna putih keabuan, tepung ulat berwarna hijau dan tepung belalang berwarna coklat. Rendemen tertinggi dimiliki oleh tepung belalang sebesar 18,11% dan terendah pada tepung keong mas 11,11%.

Tabel 5. Sifat Fisik Tepung Medium Substitusi

No	Sifat	Sample Tepung		
		Keong mas	Ulat	Belalang
1	Kehalusan (lolos ayak)	60 mess	60 mess	60 mess
2	Warna	Putih keabuan	Hijau	Coklat
3	Rendemen (%)	11,11	11,67	18,11

Tabel 6 menunjukkan hasil uji proksimat medium substitusi. Kandungan protein tertinggi dimiliki oleh belalang sebesar 62,162%.Kadar lemak tertinggi terdapat pada tepung ulat sebesar 4,627. Kadar karbohidrat terbanyak dimiliki

oleh tepung keong mas sebesar 24,367% dan memiliki selisih yang sangat jauh dibandingkan dengan belalang yang hanya 4,559%. Kadar serat, abu dan air tertinggi berturut-turut sebesar 18,085%, 11,940% dan 9,577% semuanya terdapat pada tepung belalang.

Tabel 6. Rerata Nilai Kandungan Uji Proksimat Tepung Medium Substitusi

No	Jenis	Sample Tepung (%)		
		Keong mas	Ulat	Belalang
1	Protein	45,382	57,759	62,162
2	Lemak	2,964	4,627	3,254
3	Karbohidrat	24,367	14,657	4,559
4	Serat	16,555	12,758	18,085
5	Abu	10,732	10,169	11,940
6	Air	8,566	7,211	9,577

Keterangan: Berdasarkan hasil Uji proksimat Lampiran 45. Nilai % per 100 gram tepung.

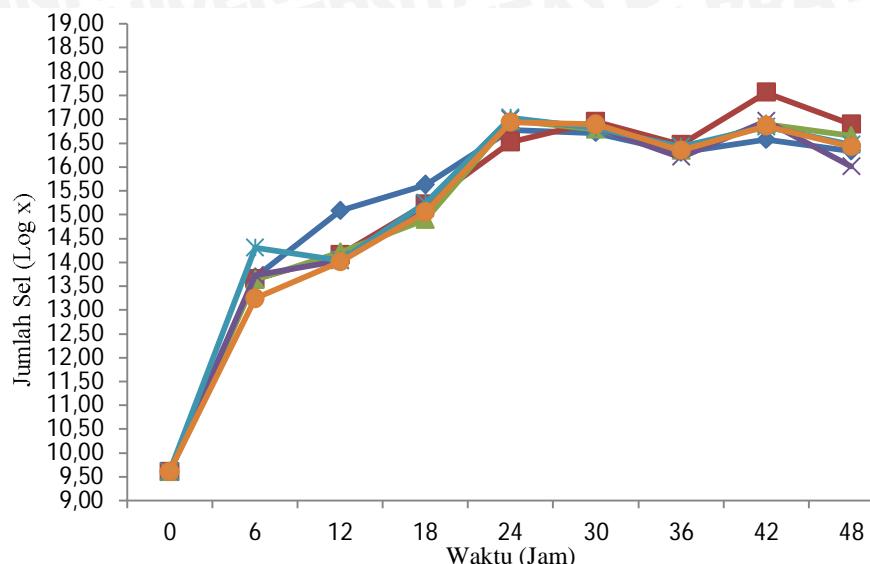
#### 4.1.2 Uji Medium Substitusi untuk Perbanyak Agens Hayati *B. subtilis*

Data hasil uji medium substitusi untuk perbanyak agens hayati disajikan dalam 3 bentuk data yaitu, kurva pertumbuhan, waktu generasi, laju pertumbuhan, dan analisis pertumbuhan setiap 6 jam sekali.

##### Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* pada Medium Substitusi Keong Mas

Pertumbuhan *B. subtilis* ditunjukkan oleh sebuah kurva yang membentuk pola pertumbuhan sigmoid. Kurva Pertumbuhan *B. subtilis* setiap 6 jam sekali selama 48 jam (masa gojok) pada medium substitusi keong mas cair dapat dilihat pada Gambar 5. Kurva pertumbuhan menunjukkan terjadinya fase eksponensial dan stationer.

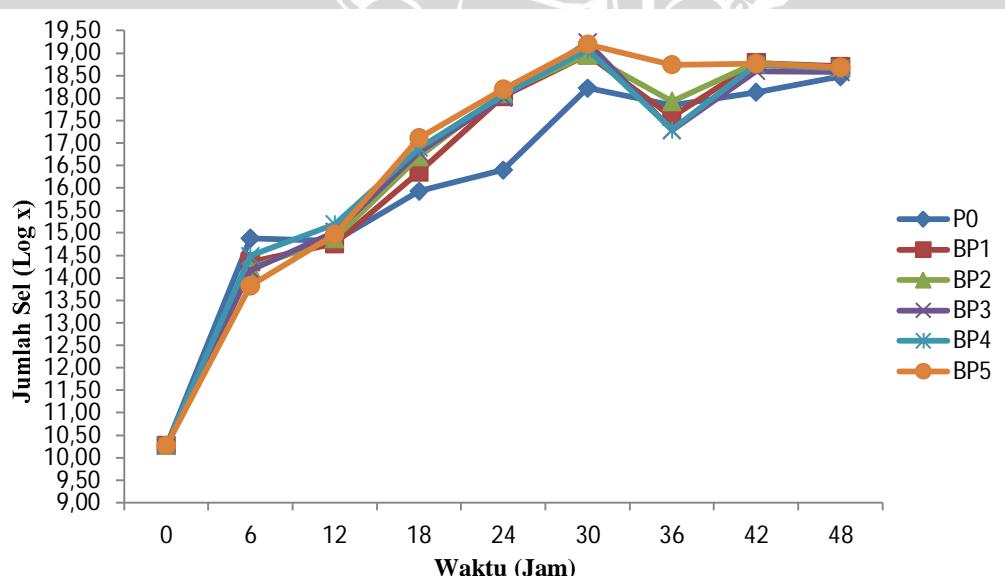
Fase lag tidak terlihat dengan jelas karena waktu pengamatan dilakukan setiap 6 jam sehingga tidak dapat dilihat pertumbuhan selama selang waktu 6 jam. Fase eksponensial pada medium keong mas (A) terjadi hingga 24 jam pada semua perlakuan (AP1, AP2, AP3, AP4, AP5 dan P0A atau kontrol). Fase stationer untuk semua perlakuan (AP1, AP2, AP3, AP4, AP5 dan P0A atau kontrol) terlihat jelas pada jam ke 24 hingga jam ke 48. Fase kematian belum terlihat karena pengamatan hanya 48 jam. Fase-fase pertumbuhan pada medium keong mas memiliki kesamaan pada semua perlakuan (AP1, AP2, AP3, AP4, AP5 dan P0A atau kontrol).



Gambar 5.Kurva Pertumbuhan *B. subtilis* pada Medium Substitusi Keong mas.  
P0: Nutrient Broth (8gr/L); AP1: Tepung keong mas (4 gr/L); AP2: Tepung Keong mas (6 gr/L); AP3: Tepung keong mas (8 gr/L); AP4: Tepung Keong mas (10 gr/L); AP5: Tepung keong mas (12 gr/L).

#### Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* pada Medium Substitusi Ulat (B)

Kurva Pertumbuhan *B. subtilis* setiap 6 jam sekali selama 48 jam (masa gojok) pada medium substitusi ulat cair dapat dilihat pada Gambar 6.

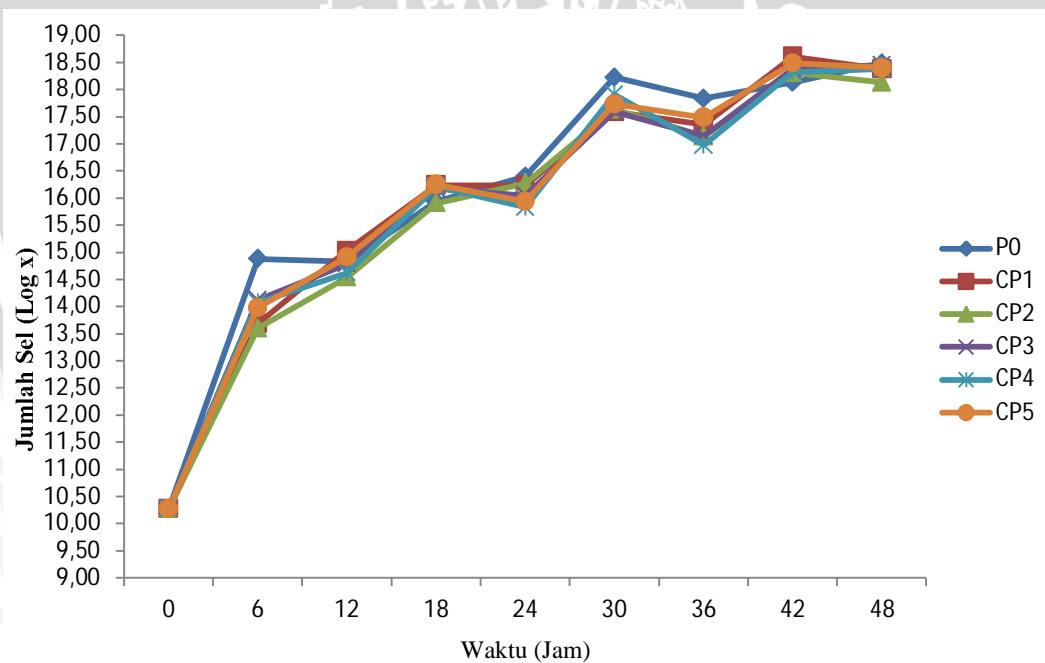


Gambar6 .Kurva Pertumbuhan *B. subtilis* pada Medium Substitusi ulat. P0: Nutrient Broth (8gr/L); BP1: Tepung Ulat (4 gr/L); BP2: Tepung Ulat (6 gr/L); BP3: Tepung Ulat (8 gr/L); BP4: Tepung Ulat (10 gr/L); BP5: Tepung Ulat (12 gr/L).

Gambar 6 menunjukkan terjadinya fase eksponensial dan stationer. Fase lag tidak terlihat dengan jelas karena waktu pengamatan dilakukan setiap 6 jam sehingga tidak dapat dilihat pertumbuhan selama selang waktu 6 jam. Fase eksponensial pada medium ulat (B) terjadi hingga 30 jam pada semua perlakuan. Pada jam ke 36 hingga 48 terjadi fase stationer. Fase kematian belum terlihat karena pengamatan hanya terbatas selama 48 jam.

### Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* pada Medium Substitusi Belalang (C)

Gambar 7 menunjukkan kurva pertumbuhan pada fase eksponensial. Fase lag tidak terlihat dengan jelas karena waktu pengamatan dilakukan setiap 6 jam sehingga tidak dapat dilihat pertumbuhan selama selang waktu 6 jam. Fase eksponensial pada medium belalang (C) terus terjadi hingga jam ke 48 untuk semua perlakuan. Fase stationer dan fase kematian belum terlihat karena pengamatan terbatas hanya 48 jam.



Gambar 7 .Kurva Pertumbuhan *B. subtilis* pada Medium Substitusi Belalang. P0: Nutrient Broth (8gr/L); CP1: Tepung Belalang (4 gr/L); CP2: Tepung Belalang (6 gr/L); CP3: Tepung Belalang (8 gr/L); CP4: Tepung Belalang (10 gr/L); CP5: Tepung Belalang (12 gr/L).

### Laju Pertumbuhan dan Waktu Generasi Agens Hayati *B. subtilis* pada Medium Substitusi Keong mas (A)

Waktu generasi (g) dan konstanta laju pertumbuhan (k) untuk medium keong mas dapat dilihat pada tabel 7. Perlakuan konsentrasi tepung per liter aquades menunjukkan terjadinya perbedaan waktu generasi. Waktu generasi tercepat *B. subtilis* yang ditumbuhkan pada medium keong mas terjadi pada medium dengan konsentrasi 8 gr/L (AP3), sedangkan waktu generasi terlama terjadi pada medium dengan konsentrasi 4 gr/L (AP1).

Pada pengamatan konsstanta laju pertumbuhan *B. subtilis*, terlihat bahwa laju pertumbuhan tertinggi terjadi pada medium AP3 (konsentrasi tepung 8 gr/L) sebesar  $1,71 \text{ jam}^{-1}$ , sedangkan laju pertumbuhan terendah terjadi pada medium AP1 (konsentrasi tepung 4 gr/L) sebesar  $1,61 \text{ jam}^{-1}$ . Tetapi secara umum, laju pertumbuhan menunjukkan sedikit perbedaan diantara semua perlakuan. Dapat dikatakan bahwa medium substitusi mempunyai kemampuan yang setara dengan kontrol (NB) dalam menumbuhkan agens hayati, *B. subtilis*.

Tabel 7. Waktu Generasi dan Konstanta Laju Pertumbuhan *B. subtilis* Medium Keong mas

Perlakuan	Nilai	
	g (menit)	k ( $\text{jam}^{-1}$ )
P0A (Kontrol)	24,79	1,68
AP1 Tepung Keong mas (4 gr/L)	25,78	1,61
AP2 Tepung Keong mas (6 gr/L)	25,51	1,63
AP3 Tepung Keong mas (8 gr/L)	24,26	1,71
AP4 Tepung Keong mas (10 gr/L)	24,97	1,66
AP5 Tepung Keong mas (12 gr/L)	25,28	1,64

Keterangan: P0A: menggunakan media Nutrient Broth (8 gr/L)

### Laju Pertumbuhan dan Waktu Generasi Agens Hayati *B. subtilis* pada Medium Substitusi Ulat (B)

Waktu generasi (g) dan konstanta laju pertumbuhan (k) untuk medium ulat dapat dilihat pada Tabel 8. Tabel 8 menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi tepung ulat per liter aquades menunjukkan terjadinya sedikit perbedaan waktu generasi, hanya dalam hitungan detik. Waktu generasi tercepat *B. subtilis*, 26,33 menit, yang ditumbuhkan pada medium dengan konsentrasi 8 gr/L (BP3),

sedangkan waktu generasi terlama terjadi pada BP1 yang hanya memiliki selisih 0,24 menit.

Tabel 8. Waktu Generasi dan Konstanta Laju Pertumbuhan *B. subtilis* pada Medium Ulat

Perlakuan	Nilai	
	g (menit)	k (jam <sup>-1</sup> )
P0B (Kontrol)	26,34	1,58
BP1 Tepung Ulat (4 gr/L)	26,57	1,57
BP2 Tepung Ulat (6 gr/L)	26,48	1,57
BP3 Tepung Ulat (8 gr/L)	26,33	1,58
BP4 Tepung Ulat (10 gr/L)	26,44	1,57
BP5 Tepung Ulat(12 gr/L)	26,47	1,57

Keterangan: P0B: menggunakan media *Nutrient Broth* (8 gr/L)

Konstanta laju pertumbuhan menunjukkan keselarasan dengan waktu generasi. Laju pertumbuhan tertinggi terjadi pada medium BP3 (konsentrasi tepung 12 gr/L) sebesar  $1,58 \text{ jam}^{-1}$  sama dengan kontrol P0B. Sedangkan laju pertumbuhan untuk perlakuan BP1, BP2, BP4 dan BP5 memiliki nilai yang sama, yaitu  $1,57 \text{ jam}^{-1}$ . Berdasarkan nilai waktu generasi dan laju pertumbuhan *B. subtilis*, dapat diketahui bahwa medium substitusi ulat mempunyai kemampuan setara dengan kontrol (NB) dalam menumbuhkan agens hidup *B. subtilis*.

#### Laju Pertumbuhan dan Waktu Generasi Agens Hayati *B. subtilis* pada Medium Substitusi Belalang (C)

Waktu generasi (g) dan konstanta laju pertumbuhan (k) untuk medium belalang dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Waktu Generasi dan Konstanta Laju Pertumbuhan *B. subtilis* pada Medium Belalang (C)

Perlakuan	Nilai	
	g (menit)	k (jam <sup>-1</sup> )
P0B (Kontrol)	26,34	1,58
CP1 Tepung Belalang (4 gr/L)	26,24	1,58
CP2 Tepung Belalang (6 gr/L)	25,67	1,62
CP3 Tepung Belalang (8 gr/L)	26,26	1,58
CP4 Tepung Belalang (10 gr/L)	26,11	1,59
CP5 Tepung Belalang (12 gr/L)	26,11	1,59

Keterangan: P0B: menggunakan media *Nutrient Broth* (8 gr/L)

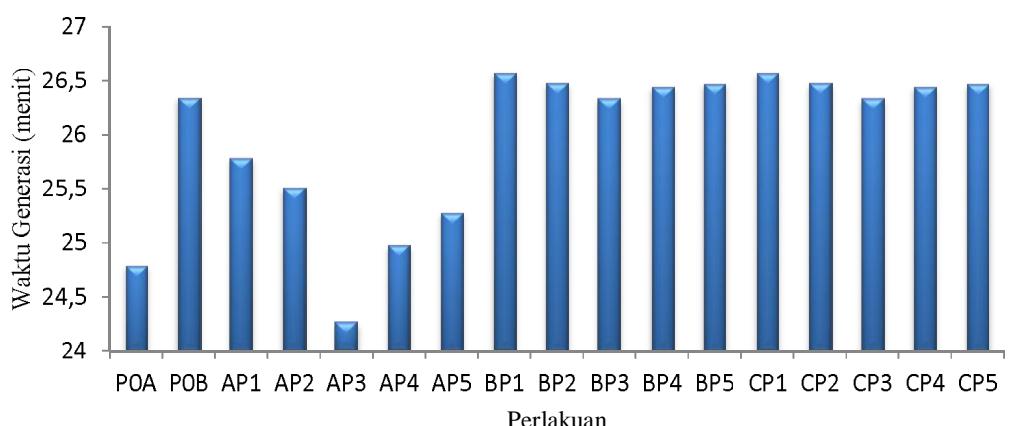
Perbedaan waktu generasi dan laju pertumbuhan terjadi pada perlakuan konsentrasi tepung belalang per liter aquades. Waktu generasi tercepat *B. subtilis*

yang ditumbuhkan pada medium belalang terjadi pada medium dengan konsentrasi 6 gr/L (CP2) selama 25,67 menit. Sedangkan waktu generasi terlama terjadi pada medium kontrol (POB) dengan selisih waktu 0,67 menit. Waktu generasi (g) untuk perlakuan CP1, CP3, CP4, dan CP 5 berturut-turut sebesar 26,24 menit, 26,26 menit, 26,11 menit dan 26,11 menit.

Laju pertumbuhan tertinggi terjadi pada medium CP2 (konsentrasi tepung 6 gr/L) sebesar  $1,62 \text{ jam}^{-1}$ . Laju pertumbuhan kontrol (POB), CP1 dan CP3 memiliki nilai yang sama yaitu  $1,58 \text{ jam}^{-1}$ . Sedangkan untuk CP4 dan CP5 juga memiliki waktu yang sama yaitu  $1,59 \text{ jam}^{-1}$ . Berdasarkan nilai waktu generasi dan laju pertumbuhan *B. subtilis*, dapat diketahui bahwa medium substitusi belalang mempunyai kemampuan yang lebih baik dibandingkan dengan kontrol (NB) dalam menumbuhkan agens hidup, *B. subtilis*.

#### Perbandingan Laju Pertumbuhan dan Waktu Generasi *B. subtilis* pada Semua Jenis Medium Substitusi

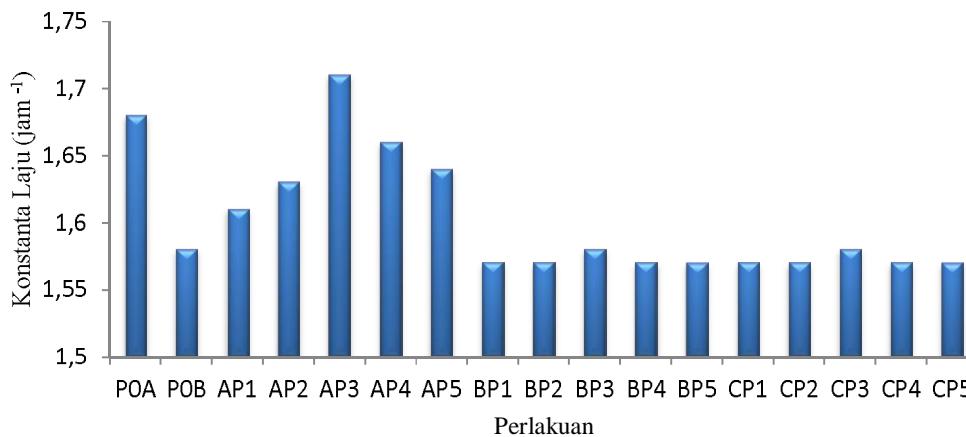
Perbandingan waktu generasi antar perlakuan pada semua jenis medium dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8.Grafik Waktu Generasi *B. subtilis* pada Semua Jenis Media. P0: *Nutrient Broth* (8gr/L); AP1: Tepung keong mas (4 gr/L); AP2: Tepung Keong mas (6 gr/L); AP3: Tepung keong mas (8 gr/L); AP4: Tepung Keong mas (10 gr/L); AP5: Tepung keong mas (12 gr/L); BP1: Tepung Ulat (4 gr/L); BP2: Tepung Ulat (6 gr/L); BP3: Tepung Ulat (8 gr/L); BP4: Tepung Ulat (10 gr/L); BP5: Tepung Ulat (12 gr/L); CP1: Tepung Belalang (4 gr/L); CP2: Tepung Belalang (6 gr/L); CP3: Tepung Belalang (8 gr/L); CP4: Tepung Belalang (10 gr/L); CP5: Tepung Belalang (12 gr/L).

Waktu generasi tercepat *B. subtilis* yang ditumbuhkan pada medium substitusi terjadi pada AP3 (8 gram tepung keong mas/L) selama 24,26 menit. Sedangkan waktu generasi terlama terjadi pada BP 1 (4 gram tepung ulat/L) selama 26, 57. Selesih waktu generasi antara keduanya sebesar 2,41 menit.

Perbandingan laju pertumbuhan antar perlakuan pada semua jenis meidium dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Grafik Konstanta Laju *B. subtilis* pada Semua Jenis Media. P0: Nutrient Broth (8gr/L); AP1: Tepung keong mas (4 gr/L); AP2: Tepung Keong mas (6 gr/L); AP3: Tepung keong mas (8 gr/L); AP4: Tepung Keong mas (10 gr/L); AP5: Tepung keong mas (12 gr/L); BP1: Tepung Ulat (4 gr/L); BP2: Tepung Ulat (6 gr/L); BP3: Tepung Ulat (8 gr/L); BP4: Tepung Ulat (10 gr/L); BP5: Tepung Ulat (12 gr/L); CP1: Tepung Belalang (4 gr/L); CP2: Tepung Belalang (6 gr/L); CP3: Tepung Belalang (8 gr/L); CP4: Tepung Belalang (10 gr/L); CP5: Tepung Belalang (12 gr/L).

Laju pertumbuhan tertinggi terjadi pada medium AP3 (8 gram tepung keong mas gr/L) sebesar  $1,71 \text{ jam}^{-1}$  dan laju terendah sebesar  $1,57 \text{ jam}^{-1}$  pada medium BP1 (4 gram tepung ulat gr/L), BP2 (6 gram tepung ulat gr/L), BP4 (10 gram tepung ulat gr/L) dan BP5 (12 gram tepung ulat gr/L). Berdasarkan nilai waktu generasi dan laju pertumbuhan *B. subtilis*, dapat diketahui bahwa medium substitusi mempunyai kemampuan yang setara dengan kontrol (NB) dalam menumbuhkan agens hidup, *B. subtilis*.

### Populasi Akhir *B. subtilis* pada Medium Substitusi

Populasi atau kerapatan akhir *B. subtilis* pada perbanyakan menggunakan medium substitusi cair setelah digojok selama 48 jam dapat dilihat pada Tabel 10.

Data diambil dari rerata ulangan masing-masing perlakuan. Kerapatan *B. subtilis* awal yang digunakan (pada jam ke 0) diketahui sebesar  $4 \times 10^9$  untuk P0A dan sebesar  $1,87 \times 10^{10}$  untuk P0B. Berdasarkan pengamatan rerata populasi akhir *B. subtilis* pada medium keong mas memiliki kerapatan  $10^{16}$  untuk AP2, AP3, AP4 dan AP5. Artinya populasi *B. subtilis* meningkat sebanyak  $10^7$  kali sel selama 48 jam sama seperti peningkatan populasi pada kontrol (P0A). Berbeda dengan perlakuan AP1 yang mempunyai populasi lebih banyak daripada kontrol (P0A) dengan populasi akhir menjadi  $10^{17}$ , meningkat sebesar  $10^8$ .

Tabel 10. Rerata Populasi Akhir *B. subtilis* Hasil Perbanyakan Medium Substitusi

Perlakuan	Kerapatan (cfu/mL)	Perlakuan	Kerapatan (cfu/mL)	Perlakuan	Kerapatan (cfu/mL)
P0A (Kontrol)	$2,33 \times 10^{16}$	P0B (Kontrol)	$4.01 \times 10^{18}$	P0B (Kontrol)	$4,01 \times 10^{18}$
AP1 (4 gr/L)	$1,04 \times 10^{17}$	BP1 (4 gr/L)	$5,78 \times 10^{18}$	CP1 (4 gr/L)	$3,39 \times 10^{18}$
AP2 (6 gr/L)	$6,90 \times 10^{16}$	BP2 (6 gr/L)	$5.05 \times 10^{18}$	CP2 (6 gr/L)	$1,35 \times 10^{18}$
AP3 (8 gr/L)	$1,03 \times 10^{16}$	BP3 (8 gr/L)	$3,95 \times 10^{18}$	CP3 (8 gr/L)	$3,51 \times 10^{18}$
AP4 (10 gr/L)	$1,87 \times 10^{16}$	BP4 (10 gr/L)	$4,70 \times 10^{18}$	CP4 (10 gr/L)	$2,75 \times 10^{18}$
AP5 (12 gr/L)	$4,90 \times 10^{16}$	BP5 (12 gr/L)	$4,97 \times 10^{18}$	CP5 (12 gr/L)	$2,73 \times 10^{18}$

Keterangan: P0A dan P0B: menggunakan media *Nutrient Broth* (8 gr/L). P0A digunakan saat perlakuan medium keong mas dan P0B digunakan saat perlakuan medium ulat belalang. Perlakuan AP menggunakan tepung keong mas, perlakuan BP menggunakan tepung ulat dan perlakuan CP menggunakan tepung belalang.

Perlakuan pada medium substitusi ulat (BP), memiliki kerapatan yang sama dengan kontrol (P0B). Pada kerapatan awal yang digunakan, yaitu  $10^{10}$ , meningkat menjadi  $10^{18}$  untuk semua perlakuan (BP1, BP2, BP3, BP4, dan BP5). Peningkatan populasi yang terjadi sebesar  $10^8$  kali sel. Peningkatan yang sama juga terjadi pada perlakuan medium substitusi belalang (CP), yaitu meningkat sebesar  $10^8$  dengan kerapatan akhir  $10^{18}$  untuk semua perlakuan (CP1, CP2, CP3, CP4 dan CP5) sama dengan kontrol (P0B).

#### Analisis Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Setiap 6 Jam Antar Perlakuan Pada Medium Substitusi Keong mas (A)

Berdasarkan analisis sidik ragam (Tabel 11), perlakuan konsentrasi medium substitusi keong mas pada pengamatan 6 jam, 18 jam, 24 jam, 30 jam, 36 jam dan 48 jam menunjukkan tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan *B.*

*subtilis*. Sedangkan pada pengamatan 12 jam dan 42 jam menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi medium berpengaruh terhadap pertumbuhan *B. subtilis*. Pada pengamatan 12 jam, kontrol NB (P0A) dapat menumbuhkan *B. subtilis* lebih baik dibandingkan dengan medium substitusi keong mas. Perlakuan AP1, AP2, AP3, AP4 dan AP5 memiliki kemampuan yang setara dalam menumbuhkan *B. subtilis*. Pada pengamatan 42 jam, perlakuan AP1 memiliki kemampuan terbaik dalam menumbuhkan *B. subtilis* dibandingkan kontrol NB (P0B), AP2, AP3, AP4 dan AP5.

#### **Analisis Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Setiap 6 Jam Antar Perlakuan Pada Medium Substitusi Ulat (B)**

Tabel 12 menunjukkan analisis sidik ragam perlakuan konsentrasi medium substitusi ulat. Pada pengamatan 12 jam dan 48 jam menunjukkan bahwa perlakuan medium substitusi tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan *B. subtilis*. Pengamatan 6 jam menunjukkan kontrol memiliki kemampuan yang baik untuk menumbuhkan, *B. subtilis* dibandingkan dengan BP1, BP2, BP3 dan BP5 tetapi setara dengan BP4. Pada pengamatan 18 jam dan 24 jam, BP 5 memiliki kemampuan terbaik dibandingkan perlakuan lainnya dan kontrol. Perlakuan BP1, BP2, BP3, BP dan BP 5 memiliki kemampuan yang setara untuk menumbuhkan *B. subtilis* serta lebih baik dari kontrol pada pengamatan 30 jam dan 42 jam. Sedangkan pada pengamatan 36 jam, BP5 memiliki kemampuan lebih baik dibandingkan dengan semua perlakuan dan kontrol.

#### **Analisis Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Setiap 6 Jam Antar Perlakuan Pada Medium Substitusi Belalang (C)**

Analisis sidik ragam pertumbuhan agens hayati *B. subtilis* setiap 6 jam antar perlakuan pada medium substitusi belalang dapat dilihat pada Tabel 13. Perlakuan CP1, CP2, CP3, CP4 dan CP5 pada pengamatan 12 jam, 18 jam, 42 jam dan 48 jam menunjukkan hasil tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan *B. subtilis*. Pada pengamatan 6 jam perlakuan kontrol (P0B) memiliki kemampuan terbaik dalam menumbuhkan *B. subtilis* dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Perlakuan CP3 memiliki kemampuan lebih baik dibandingkan CP1 dan CP2 tetapi

memiliki kemampuan setara dengan CP4 dan CP5. Pada pengamatan 24 jam, kontrol P0B memiliki kemampuan lebih baik dibandingkan dengan perlakuan CP3, CP4, dan CP5 tetapi memiliki kemampuan setara CP1 dan CP2.

Pada pengamatan 30 jam menunjukkan kontrol P0B memiliki kemampuan setara dengan CP4 dan lebih baik dari perlakuan CP1, CP2, CP3, dan CP5. Sedangkan perlakuan CP1, CP2, CP3, CP4, dan CP 5 memiliki kemampuan yang setara dalam menumbuhkan *B. subtilis*. Kemampuan kontrol P0B terus berlanjut pada pengamatan 36 jam, yaitu POB memiliki kemampuan lebih baik daripada CP1, CP2, CP3, dan CP4 serta memiliki kemampuan setara dengan CP5.

#### **Analisis Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Setiap 6 JamAntar Perlakuan pada Semua Jenis Medium Substitusi**

Analisis sidik ragam pertumbuhan agens hayati *B. subtilis* setiap 6 jam antar perlakuan pada semua jenis medium substitusi dapat dilihat pada Tabel 14. Pengamatan pertumbuhan jam ke 6 menunjukkan bahwa perlakuan AP2, dan AP5 memiliki kemampuan yang sama dan terendah diantara semua perkuan dan kontrol. Perlakuan AP1, AP3 AP4, BP2, BP3, BP5, dan semua perlakuan CP (CP1, CP2, CP3, CP4, dan CP5) memiliki kemampuan yang sama tetapi lebih rendah dibandingkan dengan BP1, BP4 dan P0B. Pada pertumbuhan 6 jam pertama *B. sublitisi* memiliki pertumbuhan tertinggi pada medium P0B yang setara kemampuannya dengan BP1 dan BP4.

Pada 6 jam kedua (12 jam) terjadi perubahan kemampuan medium. Semua perlakuan AP memiliki kemampuan berbeda nyata (lebih rendah) dengan CP1, CP3, CP5, kontrol dan semua perlakuan BP. Semua perlakuan BP, CP1 dan CP5 memiliki kemampuan yang setara dengan kontrol P0A dan lebih baik dari kontrol P0B. Kemampuan terendah dari semua perlakuan adalah AP1.

Data analisis ragam pertumbuhan jam ke 18 menunjukkan bahwa semua perlakuan AP setara dengan kontrol P0A dan berbeda nyata (lebih rendah) dibandingkan perlakuan CP1, CP3, CP4, CP5 dan semua perlakuan BP. Semua perlakuan CP memiliki kemampuan setara dengan kontrol P0A dan P0B. BP1 memiliki kemampuan setara dengan P0A dan P0B. BP2, BP3, BP4 dan BP5 memiliki kemampuan lebih baik daripada P0A, P0B dan semua perlakuan AP.

Tabel 11. Pertumbuhan Agens Hayati *B subtilis* Setiap 6 Jam Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Keong mas (A)

Perlakuan	Jumlah sel (Log x) Setiap 6 jam sekali (Jam)					
	6 tn	12	18 tn	24 tn	30 tn	36 tn
P0A (Kontrol)	13,69	15,08 b	15,63	16,78	16,72	16,30
AP1 Tepung Keong mas (4 gr/L)	13,65	13,82 a	15,22	16,53	16,95	16,46
AP2 Tepung Keong mas (6 gr/L)	13,64	14,21 a	14,90	16,98	16,79	16,38
AP3 Tepung Keong mas (8 gr/L)	13,73	14,04 a	15,14	17,00	16,83	16,21
AP4 Tepung Keong mas (10 gr/L)	14,31	14,04 a	15,25	17,03	16,81	16,43
AP5 Tepung Keong mas (12 gr/L)	13,24	14,01 a	15,05	16,94	16,89	16,35

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom pengamatan yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%; tn= tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%

Tabel 12. Pertumbuhan Agens Hayati *B subtilis* Setiap 6 Jam Antar Perlakuan Pada Medium Substitusi Ulat (B)

Perlakuan	Jumlah sel (Log x) Setiap 6 jam sekali (Jam)					
	6	12 tn	18	24	30	36
P0B (Kontrol)	14,88 c	14,82	15,93 a	16,40 a	18,22 a	17,83 c
BP1 Tepung Ulat (4 gr/L)	14,35 b	14,76	16,43 ab	18,03 b	18,96 b	17,59 b
BP2 Tepung Ulat (6 gr/L)	14,22 ab	14,88	16,69 bc	18,11 bc	18,96 b	17,92 c
BP3 Tepung Ulat (8 gr/L)	14,18 ab	15,03	16,80 bc	18,01 b	19,24 b	17,28 a
BP4 Tepung Ulat (10 gr/L)	14,50 bc	15,19	16,89 bc	18,06 b	19,08 b	17,30 a
BP5 Tepung Ulat (12 gr/L)	13,83 a	14,96	17,11 c	18,20 c	19,20 b	18,74 d

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom pengamatan yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%; tn= tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%

Tabel 13. Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Setiap 6 Jam Antar Perlakuan Pada Medium Substitusi Belalang (C)

Perlakuan	Jumlah sel (Log x) Setiap 6 jam sekali (Jam)					
	6	12 tn	18 tn	24	30	36
P0B (Kontrol)	14,88 d	14,82	15,93	16,40 c	18,22 b	17,83 c
CP1 Tepung Belalang (4 gr/L)	13,69 ab	15,03	16,24	16,23 bc	17,59 a	17,35 ab
CP2 Tepung Belalang (6 gr/L)	13,60 a	14,54	15,91	16,27 bc	17,64 a	17,14 ab
CP3 Tepung Belalang (8 gr/L)	14,12 c	14,79	16,18	16,05 ab	17,60 a	17,14 ab
CP4 Tepung Belalang (10 gr/L)	14,07 bc	14,62	16,21	15,83 a	17,90 ab	16,97 a
CP5 Tepung Belalang (12 gr/L)	13,98 abc	14,91	16,25	15,94 ab	17,73 a	17,48 bc

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom pengamatan yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%; tn= tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%.

Tabel 14. Analisis Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Medium Substitusi Setiap 6 jam

Perlakuan	Jumlah sel (Log x) Setiap 6 jam sekali (Jam)					
	6	12	18	24	30	36
P0A (Kontrol)	13,69 abcd	15,08 d	15,63 abc	16,78 de	16,72 a	16,30 a
P0B (Kontrol)	14,88 f	14,82 cd	15,93 bcd	16,40 c	18,22 d	17,83 fg
AP1 Tepung Keong mas (4 gr/L)	13,65 abcd	13,82 a	15,22 ab	16,53 cd	16,95 a	16,46 a
AP2 Tepung Keong mas (6 gr/L)	13,31 abc	14,21 abc	14,90 a	16,98 e	16,79 a	16,38 a
AP3 Tepung Keong mas (8 gr/L)	13,73 abcd	14,04 ab	15,14 ab	17,00 e	16,83 a	16,21 a
AP4 Tepung Keong mas (10 gr/L)	13,64 edef	14,04 ab	15,25 ab	17,03 e	16,81 a	16,43 a
AP5 Tepung Keong mas (12 gr/L)	13,24 a	14,01 ab	15,05 a	16,94 e	16,89 a	16,35 a
BP1 Tepung Ulat (4 gr/L)	14,35 def	14,76 cd	16,43 cdef	18,03 f	18,96 e	17,59 ef
BP2 Tepung Ulat (6 gr/L)	14,22 bcde	14,88 d	16,69 def	18,11 f	18,96 e	17,92 g
BP3 Tepung Ulat (8 gr/L)	14,18 bcde	15,03 d	16,80 ef	18,01 f	19,24 e	17,28 cd
BP4 Tepung Ulat (10 gr/L)	14,50 ef	15,19 d	16,89 ef	18,06 f	19,08 e	17,30 cde
BP5 Tepung Ulat (12 gr/L)	13,83 abcde	14,96 d	17,11 f	18,20 f	19,20 e	18,74 h
CPI Tepung Belalang (4 gr/L)	13,69 abed	15,03 d	16,24 cde	16,23 bc	17,59 b	17,35 cde
CP2 Tepung Belalang (6 gr/L)	13,60 ab	14,54 bcd	15,91 bcd	16,27 bc	17,64 bc	17,14 bc
CP3 Tepung Belalang (8 gr/L)	14,12 bcde	14,79 cd	16,18 cde	16,05 ab	17,60 b	17,14 bd
CP4 Tepung Belalang (10 gr/L)	14,07 bede	14,62 bcd	16,21 cde	15,83 a	17,90 c	16,97 b
CP5 Tepung Belalang (12 gr/L)	13,98 bede	14,91 d	16,25 cde	15,94 a	17,73 bc	17,48 de

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom pengamatan yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%. P0A dan P0B; menggunakan media Nutrient Broth (8 gr/L). P0A digunakan saat perlakuan medium keong mas dan P0B digunakan saat perlakuan medium ulat dan belalang.

Pada jam ke 24 terlihat perbedaan signifikan dibandingkan dengan pengamatan pada jam-jam yang lain. Perlakuan CP mempunyai kemampuan lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Semua perlakuan CP berbeda nyata (lebih rendah) dibandingkan kontrol P0A, AP2, AP3, AP4, AP5 dan semua perlakuan BP. Perlakuan AP2, AP3, AP4, AP5 memiliki kemampuan setara dengan kontrol P0A, tetapi berbeda nyata (lebih tinggi) dibandingkan kontrol P0B dan berbeda nyata dengan (lebih rendah) dibandingkan dengan semua perlakuan BP. Semua perlakuan BP memiliki kemampuan yang sama dan berbeda nyata (lebih tinggi) dibandingkan dengan kontrol P0A dan P0B.

Pengamatan jam ke 30 menunjukkan semua perlakuan AP memiliki kemampuan yang sama, baik antar sesama (semua perlakuan medium AP) maupun dengan kontrol P0A. Tetapi berbeda nyata (lebih rendah) dibandingkan kontrol P0B, semua perlakuan BP dan CP. Semua perlakuan CP berbeda nyata (lebih rendah) dibandingkan dengan kontrol P0B dan semua perlakuan BP. Semua perlakuan BP memiliki kemampuan yang sama dan berbeda nyata (lebih tinggi) dibandingkan kontrol P0B.

Analisis ragam jam ke 36 menunjukkan ragam data yang cukup banyak. Semua perlakuan AP mempunyai kemampuan yang sama dengan kontrol P0A dan berbeda nyata kemampuannya (lebih rendah) dibandingkan kontrol P0B, semua perlakuan BP dan CP. Perlakuan BP3 dan BP4 berbeda nyata (lebih rendah) dibandingkan kontrol P0B, BP2 dan BP5. Perlakuan BP1 dan BP2 memiliki kemampuan setara dengan kontrol P0B sedangkan perlakuan BP5 berbeda nyata (lebih tinggi) dibandingkan dengan kontrol P0B.

Pada jam ke 42 dapat diketahui bahwa ada perbedaan nyata antara perlakuan AP2, AP3, AP4, AP5 dan kontrol P0A (dengan kemampuan lebih rendah) dibandingkan AP1, semua perlakuan BP dan CP. Perlakuan BP3 dan semua perlakuan CP mempunyai kemampuan setara dengan kontrol P0B, sedangkan untuk perlakuan BP1, BP2, BP4 dan BP5 berbeda nyata dengan kontrol P0B, yaitu mempunyai kemampuan lebih tinggi dibandingkan kontrol P0B.

Pengamatan terakhir pada jam ke 48 menunjukkan perlakuan AP3 memiliki nilai terendah, setara kemampuannya dengan AP4, AP5 dan P0A. Tetapi AP3 memiliki kemampuan lebih rendah berbeda nyata dengan AP1, AP2, semua

perlakuan BP dan semua perlakuan CP. Semua perlakuan AP mempunyai kemampuan yang setara dengan kontrol P0A. Sedangkan semua perlakuan CP dan BP mempunyai kemampuan yang setara dengan kontrol P0B.

#### **4.1.2 Uji Antagonis Agens Hayati *B. subtilis* Hasil Perbanyakan Medium Substitusi dengan *Erwinia carotovora***

Berdasarkan hasil uji medium substitusi untuk perbanyakan agens hayati menggunakan *B. subtilis*, dilakukan uji antagonis *B. subtilis* terhadap *Erwinia carotovora* dengan mengambil 3 perlakuan konsentrasi tepung dari masing-masing medium yaitu P1 (4 gram tepung/L), P3 (8 gram tepung/L) dan P5 (12 gram tepung/L). Uji ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh medium substitusi terhadap aktivitas antagonis *B. subtilis* sebagai agens hayati. Hasil uji antagonis *B. subtilis* terhadap *E. carotovora* dapat dilihat pada Tabel 15.

Tabel 15. Rerata Uji Antagonis Agens Hayati *B. subtilis* Hasil Perbanyakan Medium Substitusi terhadap *Erwinia carotovora*

Perlakuan	Indeks Zona Bening (cm)
P0 Nutrient Broth (8 gr/L)	0,64 ab
AP1 Tepung Keong mas (4 gr/L)	0,63 ab
AP3 Tepung Keong mas (8 gr/L)	0,58 a
AP5 Tepung Keong mas (12 gr/L)	0,68 bc
BP1 Tepung Ulat (4 gr/L)	0,65 abc
BP3 Tepung Ulat (8 gr/L)	0,63 ab
BP5 Tepung Ulat (12 gr/L)	0,63 ab
CP1 Tepung Belalang (4 gr/L)	0,71 c
CP3 Tepung Belalang (8 gr/L)	0,65 abc
CP5 Tepung Belalang (12 gr/L)	0,63 ab

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%.

Hasil uji antagonis menunjukkan bahwa aktivitas antagonis *B. subtilis* terhadap *Erwinia carotovora* (penyebab penyakit busuk lunak umbi kentang) tetap ada setelah diperbanyak menggunakan medium substitusi. Indeks zona bening terbesar yang dihasilkan terjadi pada *B. subtilis* yang diperbanyak dengan medium substitusi CP1 (tepung belalang 4 gr/L) sebesar 0,71 cm. Sedangkan indeks zona bening terkecil terjadi pada *B. subtilis* yang diperbanyak pada medium substitusi AP3 (tepung belalang 8 gr/L) sebesar 0,58 cm. Perlakuan CP 1 menghasilkan aktivitas antagonis yang lebih baik dibandingkan dengan P0, AP1,

AP3, BP3, BP5, dan CP 5 tetapi memiliki kemampuan setara dengan AP5, BP1, dan CP3.

## 4.2 PEMBAHASAN

### 4.2.1 Uji Medium Substitusi untuk Perbanyakan Agens Hayati Menggunakan *B. subtilis*

#### Pertumbuhan *B. subtilis* pada Medium Substitusi

Pertumbuhan dapat didefinisikan sebagai pertambahan jumlah atau volume serta ukuran sel. Pada organisme prokariot seperti bakteri, pertumbuhan merupakan pertambahan volume dan ukuran sel dan juga sebagai pertambahan jumlah sel. Menurut Darkuni (2001) pertumbuhan bakteri pada umumnya akan dipengaruhi oleh faktor lingkungan yang memperlihatkan peningkatan jumlah sel yang berbedaan pada akhirnya memberikan gambaran pula terhadap kurva pertumbuhannya.

Kurva pertumbuhan *B. subtilis* pada Gambar 5, 6 dan 7 menunjukkan suatu pola yang saling menyerupai grafik pertumbuhan sigmoid. Sumarsih (2003) menyebutkan bahwa pertumbuhan sel bakteri biasanya mengikuti suatu pola pertumbuhan tertentu berupa kurva pertumbuhan sigmoid. Pola pada Gambar 5, Gambar 6 dan Gambar 7 membentuk fase-fase pertumbuhan bakteri yaitu fase eksponensial/log dan fase stationer. Menurut Purwoko (2007), terdapat 4 fase pertumbuhan bakteri ketika ditumbuhkan pada kultur curah (*batch culture*), yaitu fase adaptasi (*lag phase*), fase perbanyakan (*exponential phase*), fase statis (*stationer phase*), dan fase kematian (*death phase*).

Pada fase lag kurang terlihat karena pengamatan tidak dapat menunjukkan pertumbuhan bakteri pada selang waktu sebelum 6 jam pertama. Adanya perbedaan lama fase pada masing-masing pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh kemampuan metabolisme bakteri dan ketersediaan nutrisi pertumbuhan. Menurut Kurniawan (2011), peningkatan produksi enzim dengan melakukan rekayasa pada konsentrasi medium, pH medium, suhu, sumber karbon dan nitrogen menunjukkan bahwa *Bacillus sp.* TPT-20 melakukan adaptasi pada fase lag selama  $\pm 5$ . Volk dan Wheeler (1993) mengemukakan bahwa pada fase lag

(tenggang) ini berlangsung selama satu jam hingga beberapa hari bergantung pada jenis bakteri, umur biakan dan nutrien yang terdapat dalam medium.

Pada Gambar 5, 6 dan 7 fase eksponensial ditunjukkan dengan adanya garis naik menjauhi garis horizontal waktu (sumbu y) sebelum akhirnya mengalami penurunan. Peningkatan ini terlihat cukup drastis dan seimbang. Menurut Sumarsih (2003), peningkatan aktivitas laju eksponensial harus diimbangi oleh banyak faktor seperti faktor biologis dan non biologi. Faktor biologis misalnya: bentuk dan sifat mikroorganisme terhadap lingkungan yang ada, asosiasi kehidupan diantara organisme yang bersangkutan. Faktor non-biologis misalnya: kandungan hara di dalam medium kultur, suhu, kadar oksigen, cahaya, bahan kimia dan lainlain. Jika faktor-faktor tersebut optimal, maka peningkatan kurva akan tampak tajam atau semakin membentuk sudut tumpul terhadap garis horizontal waktu.

Fase eksponensial atau log bakteri terlihat mulai jam ke 6 pada masing-masing medium. Penelitian Kurniawan (2011) menunjukkan bakteri *Bacillus sp.* TPT-20 memasuki fase eksponensial (log) pada jam ke 6 sampai jam ke 12. Pada fase ini sel mulai membelah dengan kecepatan yang tinggi dan dapat dikatakan pada fase ini bakteri mengalami pertumbuhan yang eksponensial. Kosim dan Putra (2010) mengemukakan bahwa pada fase log bakteri mengalami pertumbuhan eksponensial dengan kebutuhan akan energi pada bakteri lebih tinggi dibandingkan pada fase lainnya dan pada fase ini sel banyak menghasilkan zat-zat metabolit yang dibutuhkan dalam memenuhi kebutuhannya. Pada fase log/eksponensial, sel akan membelah dengan laju yang konstan dimana massa menjadi dua kali lipat dengan laju yang sama, aktivitas metabolit konstan dan keadaan pertumbuhan yang seimbang (Pelczar *et al.*, 2008).

Fase stationer pada kurva pertumbuhan *B. subtilis* berbentuk menyerupai garis horizontal yang menandakan tidak ada kenaikan pertumbuhan. Menurut Dwidjoseputro (2005), fase ini menunjukan jumlah bakteri yang berbiak sama dengan jumlah bakteri yang mati, sehingga kurva menunjukan garis yang hampir horizontal. Pada fase ini terjadi penumpukan produk beracun dan atau kehabisan nutrien. Beberapa sel mati sedangkan yang lain tumbuh dan membelah. Jumlah sel hidup menjadi tetap (Pelczar *et al.*, 2008).

Fase kematian ditunjukkan dengan adanya garis turun setelah fase stationer atau setelah eksponensial. Menurut Pelczar *et al.* (2008), pada fase ini sel menjadi mati lebih cepat dari pada terbentuknya sel-sel baru. Laju kematian mengalami percepatan menjadi eksponensial bergantung pada spesiesnya. Semua sel mati dalam waktu beberapa hari atau beberapa bulan. Penyebab utama kematian adalah autolisis sel dan penurunan energi seluler. Beberapa bakteri hanya mampu bertahan beberapa jam selama fase statis dan akhirnya masuk ke dalam fase kematian, sementara itu beberapa bakteri hanya mampu bertahan sampai harian dan mingguan pada fase statis dan akhirnya masuk ke fase kematian. Beberapa bakteri bahkan mampu bertahan sampai puluhan tahun sebelum mati, yaitu dengan mengubah sel menjadi spora (Purwoko, 2007)

### Laju Pertumbuhan dan Waktu Generasi *B. subtilis* pada Medium Substitusi

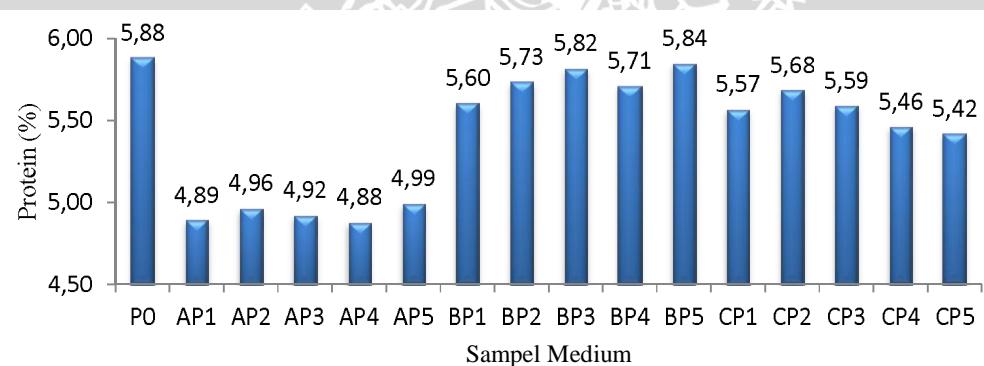
Waktu generasi menunjukkan lamanya suatu bakteri untuk membelah menjadi 2 sel sempurna. Konstanta laju pertumbuhan menunjukkan banyaknya bakteri yang tumbuh per unit waktu pada kultur yang tumbuh secara eksponensial. Bakteri membutuhkan waktu pembelahan (doubling time/waktu generasi) setiap 15-29 menit. Waktu generasi dan konstanta laju pertumbuhan *B. subtilis* untuk masing-masing perlakuan memiliki rentang antara 24 – 26,6 menit dan 1,5 - 1,7 jam<sup>-1</sup> setelah diperbanyak menggunakan medium substitusi. Menurut Maryanti *et al.*,(2009), waktu generasi *Bacillus subtilis* 33, 43 menit dan konstanta laju pertumbuhan (k) 1,15. jam<sup>-1</sup>. Nilai waktu generasi (g) dan konstanta laju pertumbuhan (k) untuk *Bacillus subtilis* adalah 45,04 menit dan 0,92 jam<sup>-1</sup> (Dwipayana *et al.*, 2009). Perbedaan nilai ini didasarkan pada kemampuan metabolisme masing-masing bakteri (Dwipayana *et al.*, 2009).

### Analisis Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* pada Medium Substitusi antar Perlakuan Setiap 6 jam

Media adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran zat-zat hara (nutrien) yang berguna untuk membiakkan bakteri.Melalui penggunaan bermacam-macam media dapat dilakukan isolasi, perbanyakan, pengujian sifat fisiologis dan perhitungan sejumlah bakteri. Menurut Sutedjo (1990), mikroba dapat tumbuh

baik dalam suatu media dengan syarat: mengandung semua zat hara yang mudah digunakan oleh mikroba, mempunyai tekanan osmosis, tegangan permukaan dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba yang akan tumbuh, tidak mengandung zat-zat penghambat pertumbuhan mikroba, dan berada dalam keadaan steril.

Analisis pertumbuhan agens hayati *B. subtilis* antar perlakuan pada medium yang sama menunjukkan hasil tidak berpengaruh. Perlakuan AP1, AP2, AP3, AP4 dan AP 5 pada medium keong mas memiliki kemampuan yang setara dalam menumbuhkan *B. subtilis*. Berdasarkan uji protein medium keong mas cair memiliki rerata protein yang sama <4% (Gambar 10). Perlakuan BP1, BP2, BP3, BP4 dan BP5 pada medium ulat secara umum dapat dikatakan memiliki kemampuan yang sama dalam menumbuhkan *B. subtilis*. Berdasarkan uji protein medium ulat cair memiliki rerata protein yang sama <5% (Gambar 10). Demikian juga dengan CP1, CP2, CP3, CP4, dan CP5 pada medium belalang memiliki kemampuan yang setara dalam menumbuhkan *B. subtilis*, rerata protein <5% (Gambar 10).



Gambar 10.Grafik Rerata Nilai Protein Medium Substitusi Cair. P0: *Nutrient Broth* (8gr/L); AP1: Tepung keong mas (4 gr/L); AP2: Tepung Keong mas (6 gr/L); AP3: Tepung keong mas (8 gr/L); AP4: Tepung Keong mas (10 gr/L); AP5: Tepung keong mas (12 gr/L); BP1: Tepung Ulat (4 gr/L); BP2: Tepung Ulat (6 gr/L); BP3: Tepung Ulat (8 gr/L); BP4: Tepung Ulat (10 gr/L); BP5: Tepung Ulat (12 gr/L); CP1: Tepung Belalang (4 gr/L); CP2: Tepung Belalang (6 gr/L); CP3: Tepung Belalang (8 gr/L); CP4: Tepung Belalang (10 gr/L); CP5: Tepung Belalang (12 gr/L). Berdasarkan Lampiran 45.

Bakteri membutuhkan sumber energi, sumber karbon dan beberapa nutrisi untuk tumbuh. Selain itu bakteri juga membutuhkan kondisi fisik yang sesuai pada media tumbuhnya seperti konsentrasi O<sub>2</sub>, temperature dan pH (Todar, 2014).

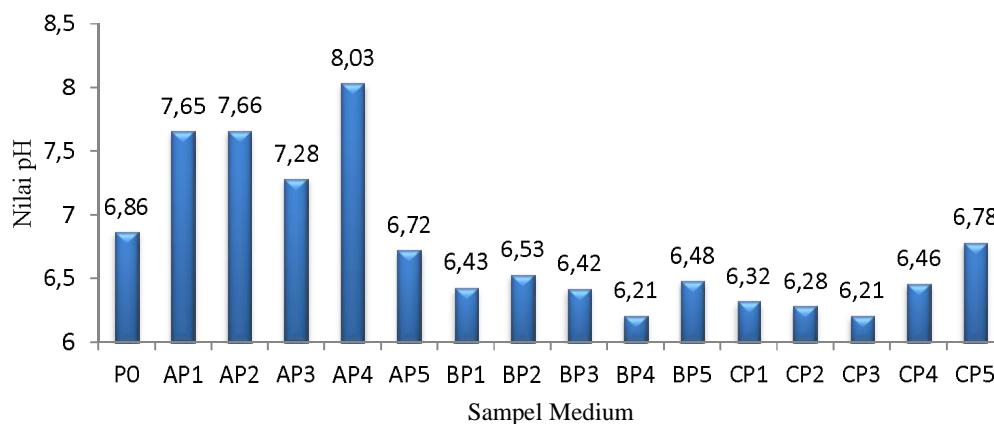
Bakteri membutuhkan sejumlah kecil senyawa organik tertentu untuk pertumbuhan sebagai zat penting yang tidak mampu disintesis dari nutrisi yang tersedia, senyawa tersebut disebut sebagai faktor pertumbuhan. Faktor pertumbuhan diperlukan dalam jumlah kecil oleh sel-sel untuk berperan dalam biosintesis. Kebutuhannya dikelola pada jalur metabolisme dalam sel. Menurut Todar (2014), faktor pertumbuhan dibagi menjadi 3 yaitu, (1) purin dan pirimidin untuk sintesis asan nukleat (DNA atau RNA); (2) asam amino untuk sintesis protein; dan (3) vitamin sebagai koenzim. Pada medium *Nutrient broth* memiliki komposisi 3 gram beef extract dan 5 gram pepton per liter aquades. Beef extract berfungsi sebagai sumber vitamin dan faktor pertumbuhan lainnya sedangkan pepton berfungsi sebagai sumber asam amino, N, S, dan P. Pada medium substitusi, kebutuhan beef extract dipenuhi dengan kandungan lemak, pepton digantikan oleh kandungan protein.

Tabel 14 menunjukkan bahwa perlakuan jenis-jenis medium substitusi berpengaruh terhadap kemampuan menumbuhkan bakteri. Medium keong mas (A) memiliki kemampuan terendah dibandingkan dengan medium ulat (B) dan belalang (C). Sedangkan medium ulat (B) dan medium belalang (C) memiliki kemampuan yang setara meskipun sebenarnya medium ulat (B) memiliki kemampuan lebih tinggi dari pada medium belalang (C) walaupun tidak berbeda nyata. Berdasarkan Gambar 10, dapat diketahui bahwa kandungan protein medium AP untuk semua perlakuan adalah <5% dibandingkan medium BP dan CP semua perlakuan yang memiliki kandungan >5%.

Analisis ragam menunjukkan bahwa medium substitusi AP (keong mas), BP (ulat) dan CP (belalang) menunjukkan kemampuan yang setara dengan kontrol P0A dan P0B. Medium substitusi terbaik yang mampu menumbuhkan *B. subtilis* adalah semua medium BP (ulat). Berdasarkan Tabel 6, kandungan tepung medium substitusi belalang (CP) memiliki kandungan protein yang paling tinggi tetapi memiliki kandungan karbohidrat paling rendah. Sedangkan tepung medium substitusi ulat (BP) memiliki kandungan protein dan karbohidrat pertengahan dibandingkan dengan medium substitusi keong mas (AP) dan belalang (CP). Klimovet. al. (1988) mengemukakan bahwa karbohidrat yang berada dalam medium dapat menyebabkan terjadinya peningkatan pertumbuhan

mikroorganisme, tetapi jika berada dalam jumlah yang banyak mempunyai efek negatif terhadap produksi enzim. Agustien (2010) menyatakan bahwa formulasi medium yang baik sangat penting untuk mendapatkan hasil yang maksimal.

Faktor berikutnya adalah pH medium. Nilai pH untuk masing-masing perlakuan medium cair dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Nilai pH Medium Substitusi. P0: *Nutrient Broth* (8gr/L); AP1: Tepung Keong mas (4 gr/L); AP2: Tepung Keong mas (6 gr/L); AP3: Tepung Keong mas (8 gr/L); AP4: Tepung Keong mas (10 gr/L); AP5: Tepung Keong mas (12 gr/L); BP1: Tepung Ulat (4 gr/L); BP2: Tepung Ulat (6 gr/L); BP3: Tepung Ulat (8 gr/L); BP4: Tepung Ulat (10 gr/L); BP5: Tepung Ulat (12 gr/L); CP1: Tepung Belalang (4 gr/L); CP2: Tepung Belalang (6 gr/L); CP3: Tepung Belalang (8 gr/L); CP4: Tepung Belalang (10 gr/L); CP5: Tepung Belalang (12 gr/L); Medium diukur menggunakan pH meter pada suhu ruang dengan buffer pH 4 dan pH 7.

Gambar 11 menunjukkan bahwa, medium AP (keong mas) semua perlakuan mempunyai pH rata-rata pH 7-8, sedangkan medium BP (ulat) dan CP (belalang) mempunyai pH 6-7. Beberapa faktor utama yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme meliputi suplai zat gizi, waktu, suhu, air, pH dan tersedianya oksigen (Buckle, 1985). Menurut Volk *et al* (1993), beberapa bakteri tumbuh pada pH 6, tidak jarang dijumpai organisme yang tumbuh baik pada pH 4 atau 5 dan sangat jarang suatu organisme dapat bertahan dengan baik pada pH 4.

Perbedaan nilai pH pada suatu medium menunjukkan perubahan konsentrasi ion hidrogen ( $H^+$ ) pada medium (Todar, 2014). Acumedia (2010) berdasarkan American Public Health Association (APHA), menetapkan standar nilai pH *Nutrient Broth* adalah  $\pm 6,8$ . Pengukuran pH *Nutrient Broth* pada

penelitian ini menunjukkan hasil yang sama yaitu, 6.86. Hal serupa juga ditemui pada medium ulat dan belalang yang mempunyai kisaran pH 6.21-6.78 mendekati pH *Nutrient Broth*. Sedangkan medium keong mas memiliki pH lebih tinggi yaitu antara 6.72-8.03. Agens hayati *B. subtilis* dapat tumbuh pada pH 6-11, dan optimum pada pH 7 (Sethi, 2013).

#### **4.1.2 Uji Antagonis *B. subtilis* Hasil Perbanyakan Medium Substitusi dengan *Erwinia carotovora***

Bakteri *B. subtilis* mampumem produksi racun bagi patogen tanaman untuk melawan cendawan patogen, mengontrol hama dan penyakit tumbuhan dengan memproduksi siderofor, kitinase, selulase, antibiotika, sianida (Soesanto 2008). *Bacillus subtilis* M40 yang mampu memproduksi antibiotika berlebihan penghambat pertumbuhan patogen tanaman *B. cinerea*, *R. solanacearum*, dan *E. carotovora* (Supartono,*et al.*, 2011). Uji antagonis agens hayati *B. subtilis* hasil perbanyakan medium substitusi menunjukkan adanya zona bening sebagai tanda bahwa agens hayati *B. subtilis* masih memiliki aktivitas antagonis setelah diperbanyak dengan medium substitusi. Menurut Supriadi (2006) bakteri agens hayati *B. subtilis* ini menghasilkan beberapa senyawa antibiotik seperti basitrasin, basilin, basilomisin B, difisidin, oksidifisidin, lesitinase, dan subtilisin. Bakteri ini dapat menghasilkan beberapa peptida yang berperan sebagai antibiotik dan antifungi, seperti: subtilin, aterimin, basitrasin, subtilosin, mikobasillin, subsporin, ituirin, serexin, surfaktin, basillomicin,basillisin, asam 10 sianida, fengimisin, dan basillisosin (Schaechter, 2004).

*B. subtili* smempunya mekanisme antagonistik yang lebih cenderung pada kemampuan memproduksi antibiotik (Campbell, 1989). Menurut Morin & Gormin (1995) dalam Prataman *et al* (2013), *B. subtilis* menghasilkan senyawa antibiotik aterimin dan basitasin yang lebihefektif terhadap patogen dibandingkan dengan senyawa antibiotik tetrasilin dan oksitetrasilin.

Berdasarkan penelitian Javandira (2012), *B. subtilis* menunjukkan potensi menghambat pertumbuhan patogen *E. carotovora* dengan menghasilkan zona bening, yaitu sekitar 0,35 cm – 0,45 cm. Indeks zona bening yang dihasilkan agens hayati *B. subtilis* menggunakan medium substitusi berkisar antara 0,5- 0,7

cm. Perbedaan nilai indeks zona bening diduga disebabkan oleh perbedaan konsentrasi *B. subtilis* yang digunakan pada penelitian.

### 4.3 ANALISIS EKONOMI

Penggunaan medium substitusi dalam penelitian ini cukup menghemat biaya penelitian. Tabel 16 menunjukkan Analisis ekonomi penghematan biaya penelitian untuk penggunaan medium tumbuh bakteri. Perhitungan menggunakan contoh kebutuhan pada penelitian ini.

Tabel 16. Perbandingan Biaya Medium Tumbuh Bakteri Agens Hayati

Uji	Kebutuhan	Penggunaan pada penelitian (Rp)		Penggunaan pada umumnya (Rp)	
		Medium Substitusi	Agar	Nutrient Broth (NB)	Nutrient Agar (NA)
Uji pertumbuhan Agens hayati					
• Cair	150 mL		0,-	4.800,-	0,-
• Padat	6 L	150.000,-*	42.000,-	0,-	600.000,-
Uji aktivitas antagonis (padat)	2 L		14.000,-	0,-	200.000,-
Total		150.000,-	56.000,-	4.800,-	800.000,-

Keterangan: \*Merupakan total biaya pembuatan tepung medium substitusi (sewa oven Rp 50.000,- dan pembelian belalang Rp 100.000,-). Rincian harga dan kebutuhan dapat dilihat pada Lampiran 10.

Tabel 16 menunjukkan bahwa biaya total pembuatan medium substitusi diperoleh melalui penambahan total biaya medium substitusi dan agar, yaitu sebesar Rp 206.000,-. Biaya total penggunaan medium pada umumnya diperoleh melalui penjumlahan biaya pemakaian *Nutrient Broth* dan *Nutrient Agar*, yaitu sebesar Rp 804.800,-. Penggunaan medium substitusi menghabiskan biaya yang lebih sedikit dibandingkan penggunaan medium pada umumnya. Selisih kedua biaya, yaitu sebesar Rp 598.800,-.

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

1. Medium substitusi keong mas, ulat dan belalang dapat dijadikan pengganti *Nutrient Broth* untuk perbanyak *B. subtilis*.
2. Agens hidup *B. subtilis* yang diperbanyak menggunakan medium substitusi keong mas, ulat dan belalang tetap memiliki aktivitas antagonis terhadap *E. carotovora*.
3. Waktu generasi yang dibutuhkan *B. subtilis* antara 24,0 – 26,6 menit dengan konstanta laju pertumbuhan antara  $1,5 - 2,7 \text{ jam}^{-1}$ .

### 5.2 Saran

Medium substitusi yang paling mudah untuk digunakan adalah medium ulat (bahan lebih terjangkau) dengan konsentrasi 4 gram tepung ulat/L untuk medium cair dan 8 gram tepung ulat/L untuk medium padat ditambah 20 gram agar teknis. Penggunaan medium substitusi keong mas, ulat dan belalang sangat potensial untuk dikembangkan sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menyempurnakan penelitian ini. Saran pengembangan penelitian kedepan sebagai berikut:

1. Uji daya tahan penyimpanan medium substitusi keong mas, ulat dan belalang.
2. Uji medium substitusi keong mas, ulat dan belalang untuk pertumbuhan berbagai jenis bakteri.
3. Uji antibiosis bakteri yang ditumbuhkan pada medium substitusi untuk mengetahui aktivitas metabolisme sekundernya.
4. Variasi cara pembuatan medium substitusi keong mas, ulat dan belalang yang lebih efektif sehingga lebih mudah digunakan dan mempunyai fleksibilitas yang tinggi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Acumedia, 2010. Nutrient Broth. PI7146. R3v 01.Nov.  
[http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7146\\_PI.pdf](http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7146_PI.pdf).
- Addy, H. S. 2007. Pengaruh Sumber Mineral Terhadap Penekanan *Erwinia carotovora* oleh *Psudomonas pendar-fluor* Secara In Vitro. Jurnal HPT Tropika. Volume 7 (2).
- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology 5 Edition. Elsevier Academic Press. United States of America. Hal 616-686.
- Buckle, K.A, 1985, Ilmu Pangan, Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.
- Budiyono, S.2006. Teknik Mengendalikan Keong Mas pada Tanaman. Jurnal Ilmu-ilmu Pertanian 2 (2): 128-133.
- Burmeister, H . 1838. *Valanga nigricorni* [shttp://zipcodezoo.com/Animals/V/Valanga\\_nigricornis/](http://zipcodezoo.com/Animals/V/Valanga_nigricornis/) Diakses 6 Juni 2014
- Campbell, R. 1989. Biological Control of Microbial Plant Pathogens. Cambridge University Press. Cambridge
- Cazzaniga, N. J. 2002. Pomacea canaliculata: Harmless and Useless in Its Natural Realm (Argentina). In Joshi. R. C. And L.S Sebastian (Ed.), Global Advances in Ecology and Management of Golden Apple Snail. Phil Rice, Ingneria DICTUC and FAO.3-23.
- Chailani, S.R. 2010. Penyakit-Penyakit Pasca Panen Tanaman Pangan. UB Press. Malang. Hal 22-23. 152.
- Darkuni, N. 2001. Mikrobiologi. JICA.Malang.
- Daryatmo, J. 2004. Pengaruh Konsentrasi NaOH dan Waktu Hidrolisis pada Tepung Belalang Kembara (*Locusta sp*) Terhadap Degradasinya Secara *In Vitro*. J. Indon. Anim.Agric 29 (3).
- Direktorat Perlindungan Tanaman. 2008. Luas Serangan Siput Murbai pada Tanaman Padi Tahun 1997-2006, Rerata 10 Tahun dan Tahun 2007. Direktorat Jendral Tanaman Pangan. Jakarta.
- Dwidjoseputro.2005. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Djambatan. Jakarta.
- Dwipayana dan Ariesyady, H.D. 2009.Identifikasi Keberagaman Bakteri pada Lumpur Hasil Pengolah Limbah Cat dengan Teknik Konvensional. LAPI ITB. Bandung.

- Goto, M. 1990. Fundamental of Bacterial Plant Pathology.Faculty of Agriculture Shizuoka, University Shizuoka.Academic Press, INC. Japan.
- Habazar, T. dan Yaherwandi. 2006. Pengendalian Hayati Hama dan PenyakitTumbuhan. Andalas University Press. Padang. hal 100-137.
- Hamzati, N. S 2011. Erionota thrax - Ulat - Tirtorahayu 2. [http://www.fobi.web.id/v/lerido/f-hes/eri-thr/Erionota-thrax\\_Ulat\\_Tirtorahayu\\_NSH\\_001.jpg.html](http://www.fobi.web.id/v/lerido/f-hes/eri-thr/Erionota-thrax_Ulat_Tirtorahayu_NSH_001.jpg.html) Diakses 6 Juni 2014
- Hara, H. dan Ono,K. 1991. Effect of Weakly-Virulent Bacteriocin-Producing Strain of *Pseudomonas slanacearum* on the Protection of Tobacco Plant from Bacterial Wilt. Ann. Phytopathology Society. Japan (57): 24-31.
- Hendarsih –Suharto dan Kurniawati, N. 2002. Prospek Moluskasi Nabati dalam Pengendalian Siput Murbai:. Berita Puslitbang 24:11-12
- Jackman, J.A. 2005. Snail and Slugs.Agro Life Extension. [https://insects.tamu.edu/extension/publications/epubs/eee\\_00026.cfm](https://insects.tamu.edu/extension/publications/epubs/eee_00026.cfm) Diakses 6 Juni 2014
- Javandira, C. 2012. Pengendalian Penyakit Busuk Lunak Umbi Kentang (*Erwinia carotovora*) dengan Memanfaatkan Agens Hayati *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens*. Skripsi Jurusan HPT. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang.
- Kalshoven L.G.E. 1981. The Pest of Crops in Indonesia.Laan PA van der, penerjemah. Jakarta: Ichtiar Baruvan Hoeve. Terjemahan dari: De Plagen van de Cultuurgewassen in Infonesie.
- Klimov, N. A., V. T. Batarin, O. V. Rybalchenko dan O. A. Andreev. 1988. Formation of extracellular protease by cells of thermophilic bacteria. Microbiology 57: 579-585.
- Kosim, M., dan Putra, S. R. 2010. Pengaruh Suhu Pada Protease Dari Bacillus subtilis. Prosiding Skripsi Semester Genap 2009-2010. Jurusan Kimia FMIPA ITS Surabaya.
- Koswara, S. 2005. Serangga sebagai Bahan Makanan. [http://web.ipb.ac.id/atpg/de/pubde\\_tknprcss.php](http://web.ipb.ac.id/atpg/de/pubde_tknprcss.php) Diakses 20 Februari 2013
- Kurniawan, H.M. 2011. Isolasi dan Optimasi Ekstrinsik Bakteri Termoroteolitik Isolat Sumber Air Panas. Semurup Kabupaten Kerinci. Jambi. Skripsi
- Kusmaryani. 2005. Protein Belalang Lebih Tinggi dari pada Udang. <http://www.smallcrab.com/kesehatan/25-healthy/292-protein-belalang-lebih-tiggi-dari-udang>. Diakses 10 Februari 2013

- Linnaeus. 1976. *Erionata thrax* (Banana Skipper). <http://eol.org/pages/184845/overview>. Diakses 11 Oktober 2013.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., dan Parker, P. 2003. Biology of Microorganism.10<sup>th</sup> Edition. Prentice Hall. USA.
- Maryanti, B. dan Ariesyady, H. D. 2009. Identifikasi Keberagaman Bakteri pada Commercial Seed Pengolah Limbah Cair Cat. LAPI ITB. Bandung.
- Muis, A. 2007. Pengelolaan Penyakit Busuk Pelelah (*Rhizoctonia solani* Kuhn) pada Tanaman Jagung. Jurnal Litbang Pertanian 26 (3).
- Novianti. 2008. Hama Penggulung Daun Pisang *Erionata thrax* Linnaeus (Lepidoptera: Hesperiidae) dan Musuh Alamnya di Tempat-tempat dengan Ketinggian Berbeda. Program Studi Hama dan Penyakit Tumbuhan. Fakultas Pertanian IPB. Skripsi
- Nurjanah; Fitrial, Y.; Suwandi, R., dan Daritri, E.S. 1996. Pembuatan Kerupuk Keong Mas (*Pomacea sp.*) dengan Penambahan Tepung Beras Ketan dan Udang. Buletin Teknologi Hasil Perikanan Vol. II (2): 43-51.
- Pagarra, H. 2008. Pengaruh Lama Pengeringan terhadap Kadar Protein Ulat Sagu (*R. Ferragineus*) Influence of draining duration to protein rate of sago caterpillar (*R. Ferragineus*). Bionature Vol. 9 (1): 55-60.
- Pambudi, N. D. 2011. Pengaruh Metode Pengolahan Terhadap Kelarutan Mineral Keong Mas (*Pomacea canaliculata*) Dari Perairan Situ Gede, Bogor. Skripsi. Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan ITB. Bogor.
- Pelczar, M. J. dan Chan, E.C.S. 2006. Elements of Microbiology. Mc Graw Hill Book Company. New York.
- Pelczar, Michel J dan E.C.S Chan. 2008. Dasar – Dasar Mikrobiologi. UI. Jakarta.
- Pratama, S.W; Sukamto, S.; Asyiah, A.N.; dan Ervina, Y.V. 2013 Penghambatan Jamur Patogen Kakao *Phytophthora palmivora* oleh *Pseudomonas flourescense* dan *Bacillus subtilis*. Jurnal Pelita Perkebunan 29 (2) : 120-127
- Punnadee, S dan Sumphanthamitr, P. 2014. <http://khaophrathaew.org/Biodiversity Fauna Oth8.html> Diakses tanggal 1 Juni 2014
- Purwoko, T. 2007. Fisiologi Mikroba. PT Bumi Aksara. Jakarta.
- Sahala, S. 2005. Pengendalian Hama Belalang Kembara (*Locusta Migratoria*) Dengan Menggunakan Gelombang Ultrasonik di Kalimantan Barat. Universitas Tanjungpura. Sripsi

- Sanayei Y, Ismail N, Teng TT, dan Morad N. 2010. Studies on flocculating activity of bioflocculant from closed drainage system (CDS) and its application in reactive dyeremoval. *Int. J. Chem.* 2, 168–173.
- Sanjaya, P. dan Pembuka, S.R. 2010. Budidaya Belalang Kayu Aatas Kesulitan Ketersiaannya di Gunung Kidul. <http://Media Indonesia.com>. Diakses 10 Januari 2013.
- Satuhu S, dan Supriyadi, H. 1999. Pisang: Budidaya, Pengolahan, dan Prospek Pasar. Penebar Swadaya.Jakarta.
- Schaad, N., J. Jones dan W. Chun. 2001. Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3<sup>rd</sup> Edition. APS Press. Amerika: 60p
- Schaechter, M. 2004. The Desk Encyclopedia of Microbiology. Elsevier Academic Press.California USA
- Sethi, S., Datta, A., Gupta, B.L., dan Gupta, S. 2013. Optimization of Cellulase Production From Bacteria Isolated from Soil. Biotechnology. Hindawi Publishing Corporation.
- Setiadi dan Suryadi. 2007. Kentang Varietas dan Pembudidayaan.Penebar Swaday. Jakarta.
- Soesanto L. 2008. Pengantar Pengendalian Hayati Penyakit Tanaman. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Sreekumar, G. dan Soundarajan, K. 2010 Temperature Adaptation Study on Probiotic *Bacillus subtilis* SK09 Based on its Extracellular Proteins. *Journal of Food Science and Technology* 2(5): 246-249.
- Sudarmo, S. 2000. Tembakau.Pengendalian Hama dan Penyakit.Kanisius. Yogyakarta.
- Sumarsih, S. 2003, Mikrobiologi Dasar. Jurusan Ilmu Tanah Fakultas Pertanian Upn Veteran.Yogyakarta.
- Supartono; Wijayati, N.; Herlina, L; dan Ratnaningsih, E. 2011. Produksi Antibitika oleh *Bacillus subtilis* M10 dalam Media Urea-Serbitol. *Jurnal Reaktor* 13 (3): 185-193.
- Supriadi.2006. Analisis Resiko Agens Hayati untuk Pengendalian Patogen Pada Tanaman. *Jurnal Litbang Pertanian* 25(3).
- Sutedjo, M. 1990. Pupuk dan Cara Pemupukan.PT. Bini Aksara. Jakarta.
- Taniguchi, M., Kato, K., Shimauchi, A., Xu, P., Fujita, K., Tanaka, T., Tarui, Y., dan Hirasawa, E. 2005. Physicochemical Properties of Cross-linked poly-gama-glutamical Acid and Its Flocculating Activity Agants Koalin Suspension. *Journal Biosci. Bioeng* 99: 130-135.

Todar, Kenneth. 2014. Nutrition and Growth of Backteria.  
<http://www.textbookofbacteriology.net> Diakses 9 Juni 2014.

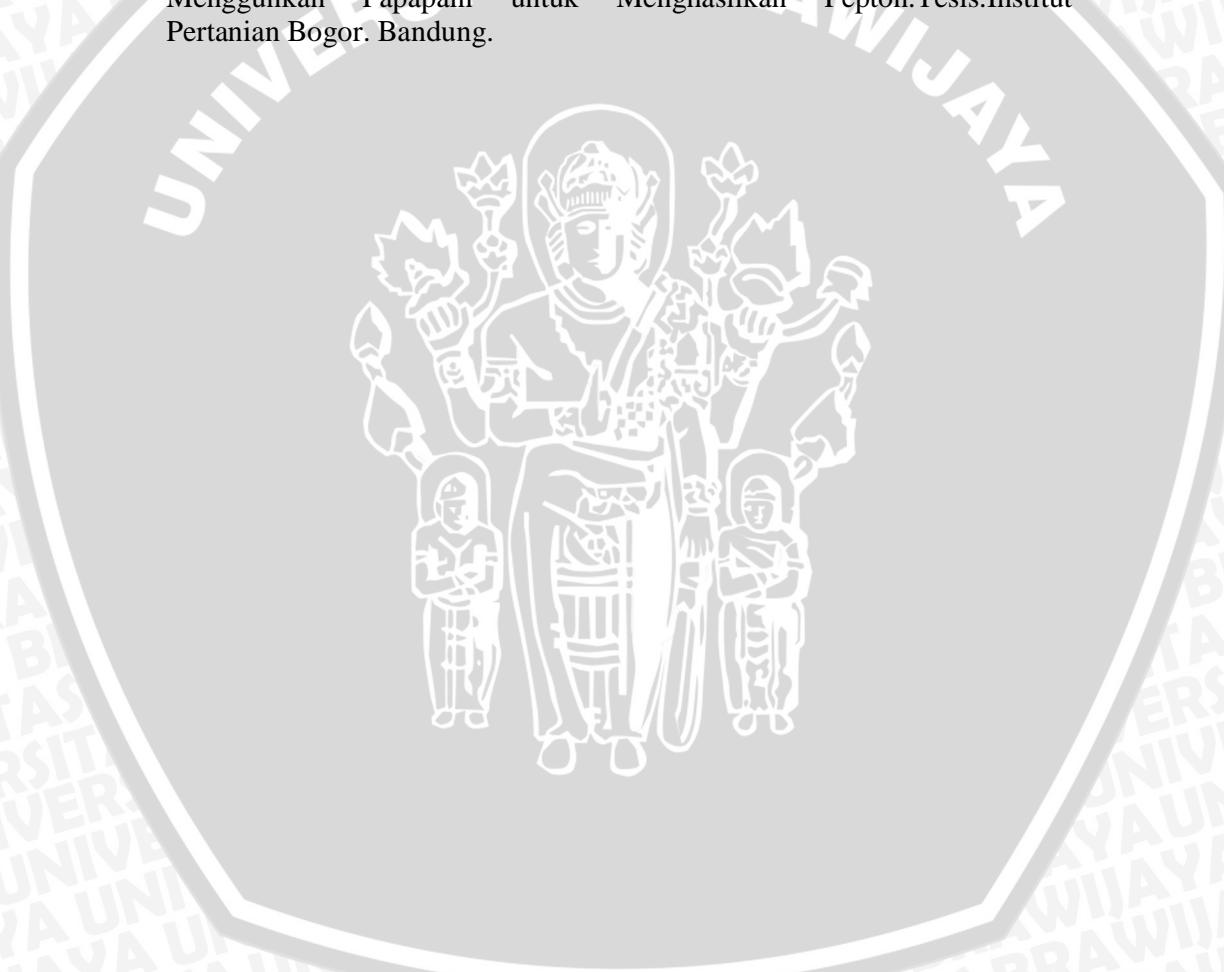
Vanneste. J. L. 1996. Biological Control of Soft Rot on Calla and Potatoes. The Horticulture and Food Research Institute of New Zealand. New Zealand.

Volk dan Wheeler. 1993. Mikrobiologi Dasar jilid 1. Erlangga. Jakarta.

Wakimoto, S. et al. 1986. Production of antibiotics by Plant Pathogenic Pseudomonas. Ann. Phytopathology Society. Japan ( 52 ): 835-842.

Waluyo, L. 2010. Teknik Metode Dasar Mikrobiologi. UMM Pres. Malang.

Wardana, 2008. Hidrolisis Protein Keong Mas (*Pamocea canaliculata Lamarck*) Menggunakan Papapain untuk Menghasilkan Pepton. Tesis. Institut Pertanian Bogor. Bandung.



## LAMPIRAN

**Lampiran 1.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* antar Perlakuan pada Medium Substitusi Keong mas (A) Jam ke 6

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	1,759	0,352	1,505tn	1,95%	2,58%
2	Galat	12	2,805	0,234			
3	Total	17	4,563				

Keterangan: \*\* = sangat berbeda nyata, \* = berbeda nyata, tn= tidak berbeda nyata

**Lampiran 2.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Keong mas (A) Jam ke 12

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	3,040	0,608	4,146*	3,11%	5,06%
2	Galat	12	1,760	0,147			
3	Total	17	4,800				

**Lampiran 3.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Keong mas (A) Jam ke 18

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	0,905	0,181	0,714tn	3,11%	5,06%
2	Galat	12	3,042	0,253			
3	Total	17	3,947				

**Lampiran 4.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Keong mas (A) Jam ke 24

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	0,550	0,110	2,642tn	3,11%	5,06%
2	Galat	12	0,500	0,042			
3	Total	17	1,050				

**Lampiran 5.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Keong mas (A) Jam ke 30

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	0,101	0,020	2,185tn	3,11%	5,06%
2	Galat	12	0,110	0,009			
3	Total	17	0,211				

**Lampiran 6.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Keong mas (A) Jam ke 36

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	0,127	0,025	1,598tn	3,11%	5,06%
2	Galat	12	0,190	0,016			
3	Total	17	0,317				

**Lampiran 7.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Keong mas (A) Jam ke 42

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	1,627	0,325	3,980*	3,11%	5,06%
2	Galat	12	0,981	0,082			
3	Total	17	2,608				

**Lampiran 8.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Keong mas (A) Jam ke 48

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	1,336	0,267	1,880tn	3,11%	5,06%
2	Galat	12	1,706	0,142			
3	Total	17	3,042				

**Lampiran 9.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Ulat (B) Jam ke 6

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	1,862	0,372	6,010**	3,11%	5,06%
2	Galat	12	0,744	0,062			
3	Total	17	2,606				

**Lampiran 10.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Ulat (B) Jam ke 12

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	0,359	0,072	0,554tn	3,11%	5,06%
2	Galat	12	1,557	0,130			
3	Total	17	1,916				

**Lampiran 11.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Ulat (B) Jam ke 18

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	2,588	0,518	5,239**	3,11%	5,06%
2	Galat	12	1,185	0,099			
3	Total	17	3,773				

**Lampiran 12.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Ulat (B) Jam ke 24

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	7,151	1,430	300,385**	3,11%	5,06%
2	Galat	12	0,57	0,005			
3	Total	17	7,208				

**Lampiran 13.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Ulat (B) Jam ke 30

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	2,092	0,418	11,406**	3,11%	5,06%
2	Galat	12	0,440	0,037			
3	Total	17	2,532				

**Lampiran 14.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Ulat (B) Jam ke 36

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	4,404	0,881	92,223**	3,11%	5,06%
2	Galat	12	0,115	0,010			
3	Total	17	4,518				

**Lampiran 15.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Ulat (B) Jam ke 42

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	0,984	0,197	13,918**	3,11%	5,06%
2	Galat	12	0,170	0,014			
3	Total	17	1,154				

**Lampiran 16.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Ulat (B) Jam ke 48

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	0,110	0,022	0,443tn	3,11%	5,06%
2	Galat	12	0,598	0,050			
3	Total	17	0,708				

**Lampiran 17.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Belalang (C) Jam ke 6

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	3,119	0,624	12,317**	3,11%	5,06%
2	Galat	12	0,608	0,051			
3	Total	17	3,726				

**Lampiran 18.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Belalang (C) Jam ke 12

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	0,506	0,101	1,244tn	3,11%	5,06%
2	Galat	12	0,976	0,081			
3	Total	17	1,481				

**Lampiran 19.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Belalang (C) Jam ke 18

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	0,363	0,073	0,337tn	3,11%	5,06%
2	Galat	12	2,586	0,216			
3	Total	17	2,949				

**Lampiran 20.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Belalang (C) Jam ke 24

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	0,699	0,140	4,247*	3,11%	5,06%
2	Galat	12	0,395	0,033			
3	Total	17	1,094				

**Lampiran 21.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Belalang (C) Jam ke 30

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	0,909	0,182	3,851*	3,11%	5,06%
2	Galat	12	0,566	0,047			
3	Total	17	1,475				

**Lampiran 22.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Belalang (C) Jam ke 36

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	1,432	0,286	5,246**	3,11%	5,06%
2	Galat	12	0,655	0,055			
3	Total	17	2,087				

**Lampiran 23.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Belalang (C) Jam ke 42

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	0,404	0,081	0,878tn	3,11%	5,06%
2	Galat	12	1,105	0,092			
3	Total	17	1,509				

**Lampiran 24.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan Agens Hayati *B. subtilis* Antar Perlakuan pada Medium Substitusi Belalang (C) Jam ke 48

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	5	0,231	0,046	0,475tn	3,11%	5,06%
2	Galat	12	1,168	0,097			
3	Total	17	1,399				

**Lampiran 25.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan *B. subtilis* pada Medium Substitusi Jam Pengamatan ke 6

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	16	7,882	0,493	4,044**	1,95%	2,58%
2	Galat	34	4,142	0,122			
3	Total	50	12,024				

Keterangan: \*\* = sangat berbeda nyata, \* = berbeda nyata, tn= tidak berbeda nyata

**Lampiran 26.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan *B. subtilis* pada Medium Substitusi Jam Pengamatan ke 12

No	SK	Db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	16	9,301	0,581	4,650**	1,95%	2,58%
2	Galat	34	4,250	0,125			
3	Total	50	13,551				

**Lampiran 27.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan *B. subtilis* pada Medium Substitusi Jam Pengamatan ke 18

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	16	23,159	1,447	7,671**	1,95%	2,58%
2	Galat	34	6,415	0,189			
3	Total	50	29,574				

**Lampiran 28.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan *B. subtilis* pada Medium Substitusi Jam Pengamatan ke 24

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	16	33,078	2,067	74,840**	1,95%	2,58%
2	Galat	34	0,939	0,028			
3	Total	50	34,017				

**Lampiran 29.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan *B. subtilis* pada Medium Substitusi Jam Pengamatan ke 30

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	16	42,921	2,683	100,102**	1,95%	2,58%
2	Galat	34	0,911	0,027			
3	Total	50	43,832				

**Lampiran 30.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan *B. subtilis* pada Medium Substitusi Jam Pengamatan ke 36

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	16	23,507	1,469	52,818**	1,95%	2,58%
2	Galat	34	0,946	0,028			
3	Total	50	24,452				

**Lampiran 31.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan *B. subtilis* pada Medium Substitusi Jam Pengamatan ke 42

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	16	32,560	2,035	30,781**	1,95%	2,58%
2	Galat	34	2,248	0,066			
3	Total	50	34,808				

**Lampiran 32.** Tabel Analisis Ragam Pertumbuhan *B. subtilis* pada Medium Substitusi Jam Pengamatan ke 48

No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	16	50,839	3,177	34,051**	1,95%	2,58%
2	Galat	34	3,173	0,093			
3	Total	50	54,012				

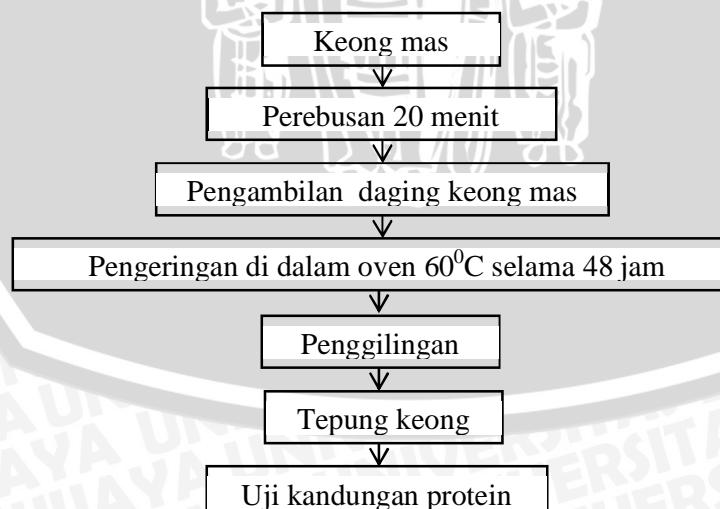
**Lampiran 33.** Tabel Analisis Ragam Indeks Zona Bening

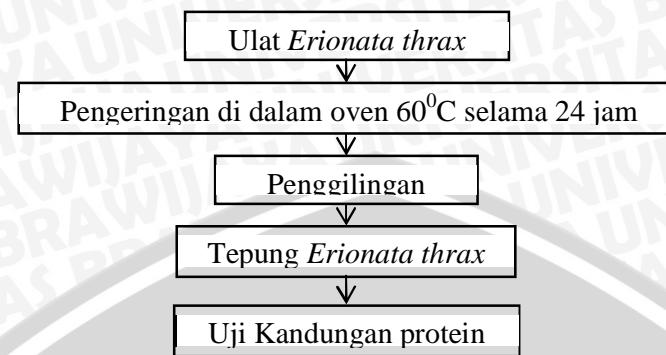
No	SK	db	JK	KT	Fhit.	Ftabel	
						5%	1%
1	Perlakuan	9	0,031	0,003	2,397*	2,39%	3,46%
2	Galat	20	0,029	0,001			
3	Total	29	0,060				

**Lampiran 34.** Tabel Harga Medium Perbanyakkan Agens Hayati Bakteri

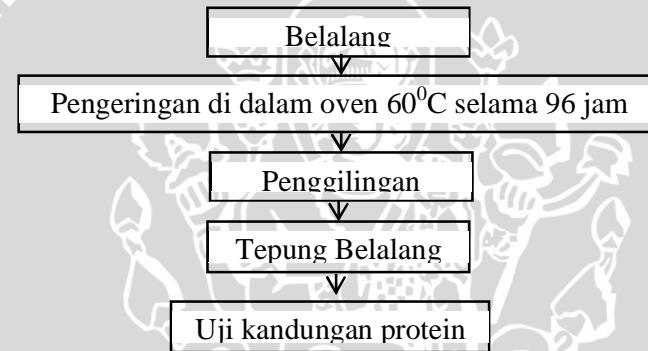
No	Jenis Medium	Kebutuhan (gr/L)	Harga satuan (Rp)	Total (Rp)
1	<i>Nutrient Agar</i> (NA)	20	5.000,-	100.000,-
2	<i>Nutrient Broth</i> (NB) cair	8	4.000,-	32.000,-
3	<i>Nutrient Broth</i> padat ➔ + agar	8 20	4.000,- 350,-	39.000,-
4	Medium Keong mas cair (A)	8	0,-*	0,-
5	Medium Ulat cair (B)	8	0,-*	0,-
6	Medium Belalang cair (C)	8	0,-*	0,-
7	Medium Keong mas padat (AA) ➔ Medium cair + agar	8 20	0,-* 350,-	7.000,-
8	Medium Ulat padat (BA) ➔ Medium cair + agar	8 20	0,-* 350,-	7.000,-
9	Medium Belalang padat (CA) ➔ Medium cair + agar	8 20	0,-* 350,-	7.000,-

Keterangan: Perbandingan dilakukan berdasarkan konsentrasi kebutuhan medium per liter aquades yang dibutuhkan untuk membuat 1 liter medium. Kebutuhan medium substitusi menggunakan standar konsentrasi medium *Nutrient Broth* (cair 8 gram/L, jika dipadatkan ditambah 20 gram agar/L). Standar harga yang digunakan berdasarkan harga di Toko kimia. \*Total biaya pembuatan tepung medium substitusi adalah Rp 150.000,- (Sewa oven Rp 50.000,- dan pembelian belalang Rp 100.000,-)

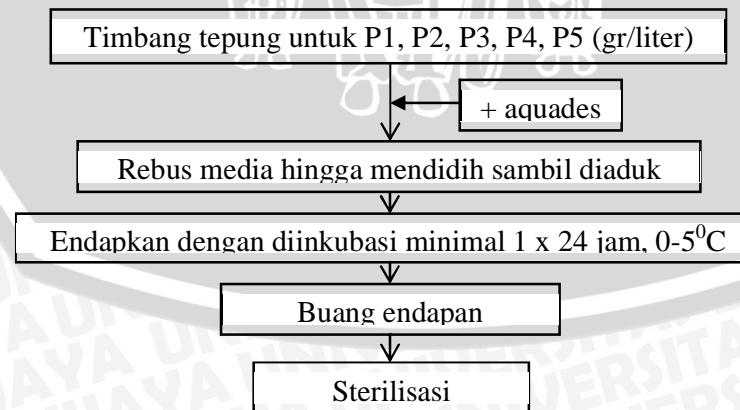
**Lampiran 35.** Gambar Diagram alir pembuatan tepung keong mas (Wardana, 2008)



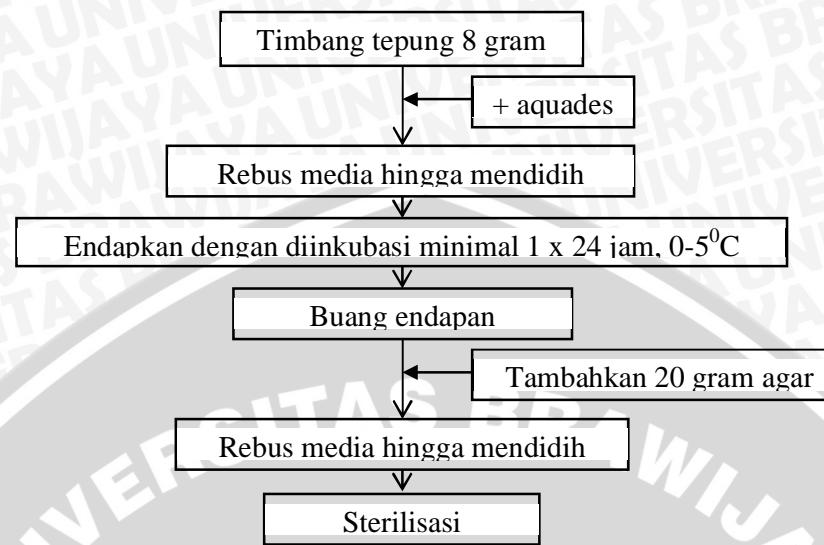
Lampiran 36. Gambar Diagram Alir Pembuatan Tepung Ulat (Pagarra, 2008)



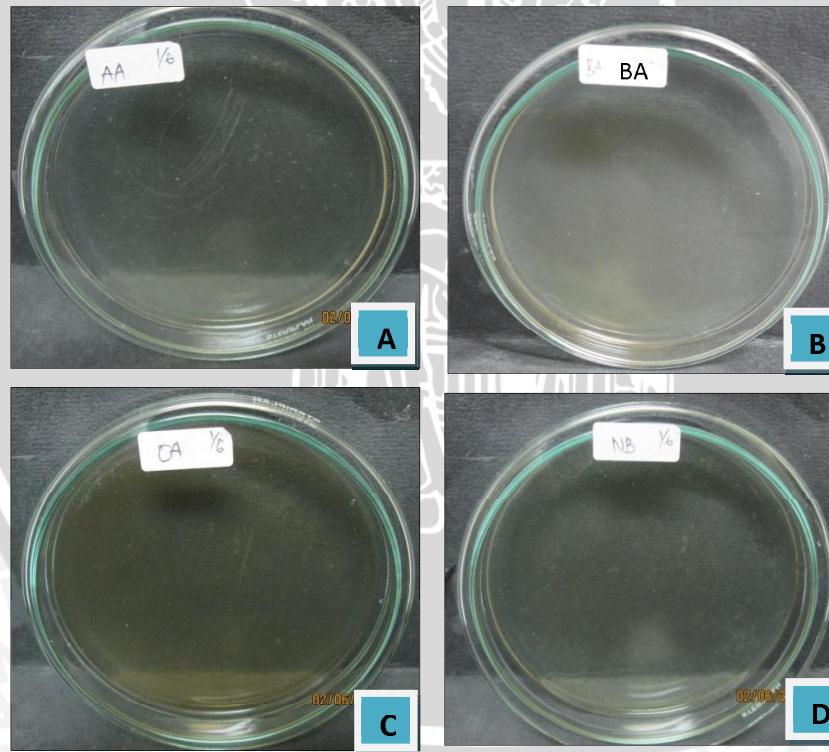
Lampiran 37. Gambar Diagram Alir Pembuatan Tepung Belalang (Daryatmo, 2004)



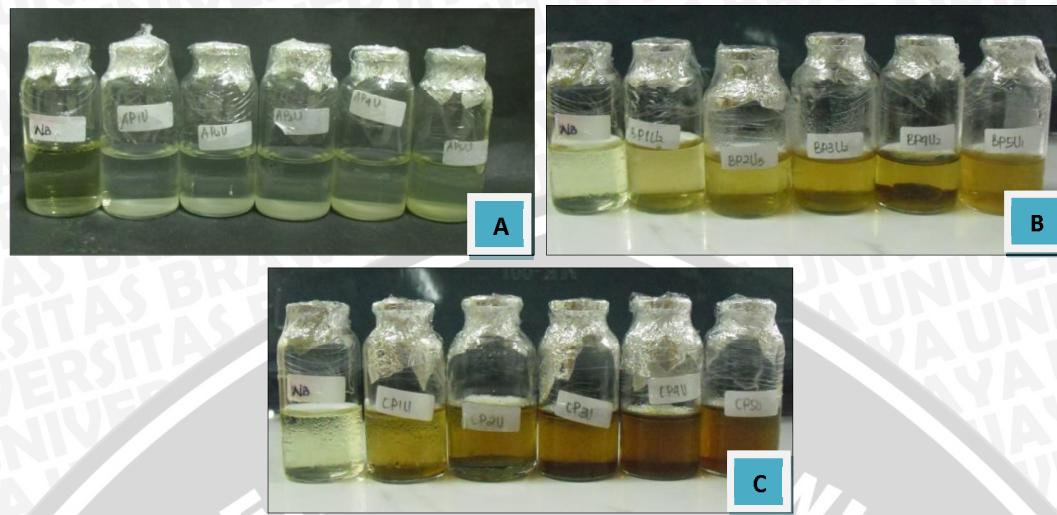
Lampiran 38.Gambar Diagram Alir Pembuatan Medium Substitusi Cair



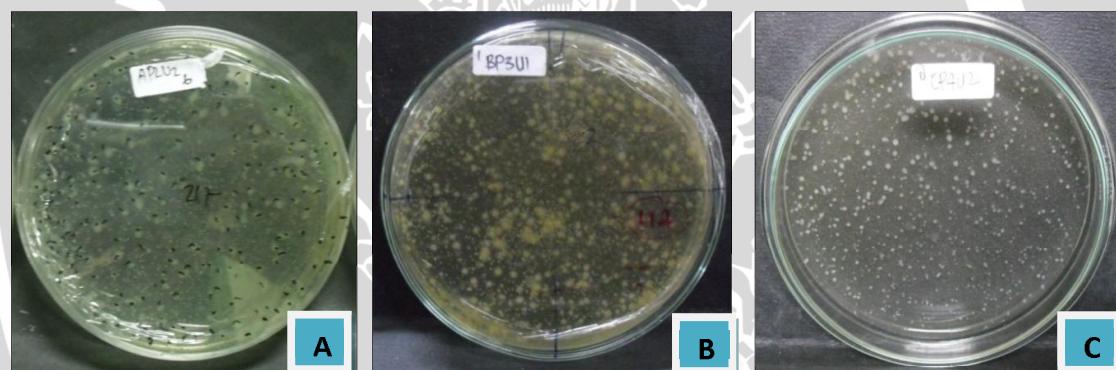
Lampiran 39. Gambar Diagram Alir Pembuatan Medium Substitusi Padat



Lampiran 40. Gambar Medium Substitusi Padat. (A) Medium Keong mas; (B) Medium Ulat; (C) Medium Belalang; (D) *Nutrient Broth* padat (NB + agar)



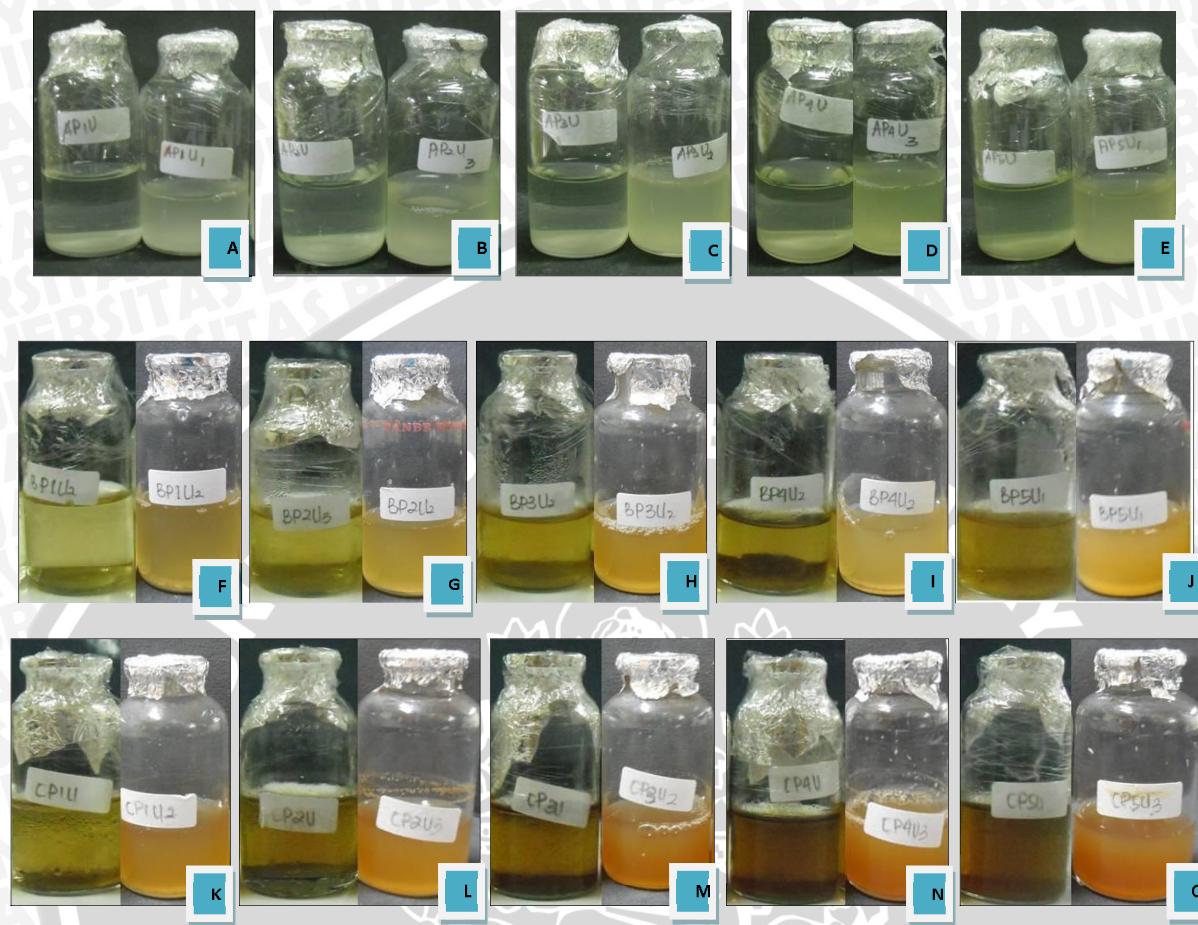
**Lampiran 41.** Gambar Medium Substitusi Cair.(A) Medium Keong mas (5 perlakuan); (B) Medium Ulat (5 perlakuan); (C) Medium Belalang (5 perlakuan).



**Lampiran 42.** Gambar Koloni *B. subtilis* pada Medium Substitusi. (A) *B. subtilis* pada Medium Keong mas; (B) *B. subtilis* pada Medium Ulat; (C) *B. subtilis* pada Medium Belalang.



**Lampiran 43.** Gambar Hama. (A) Keong mas (*Pomacea canaliculata*); (B) Ulat penggulung daun pisang (*Erionota thrax*); (C) Belalang (*Valanga nigricornis*)



**Lampiran 44.** Gambar Perbandingan Medium Substitusi Sebelum dan Sesudah Perbanyakkan *B. subtilis* dengan di *Gojok*48 jam. (A) Medium AP1 (keong mas 4 gr/L); (B) Medium AP2 (keong mas 6 gr/L); (C) Medium AP3 (keong mas 8 gr/L); (D) Medium AP4 (keong mas 10 gr/L); (E)pada Medium AP5 (keong mas 12 gr/L); (F) Medium BP1 (ulat 4 gr/L); (G) Medium BP2 (ulat 6 gr/L); (H) Medium BP3 (ulat 8 gr/L); (I) Medium BP4 (ulat 10 gr/L); (J)pada Medium BP5 (ulat g 12 gr/L); (K) Medium CP1 (belalang 4 gr/L); (L) Medium CP2 (belalang 6 gr/L); (M) Medium CP3 (belalang 8 gr/L); (N) Medium CP4 (belalang 10 gr/L); (O)pada Medium CP5 (belalang 12 gr/L).

**Lampiran 45.** Laporan Analisis Medium Substitusi**UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH MALANG**  
**LABORATORIUM KIMIA**

Jl. Raya Tlogomas No. 246 Telp. 0341-464318 Psw. 152 Malang 65144

**LAPORAN ANALISIS**No. Surat : 129 /LK-B/V/2014

Contoh disampaikan oleh pelanggan dengan keterangan sebagai berikut:

Pelanggan : Anisa Nurfitriyah  
0910483081  
Fakultas Pertanian/HPT Bakteriologi  
Universitas Brawijaya Malang

Jenis Contoh : Tepung dan media cair

Tgl. Penerimaan : 1 Mei 2014

Analisis/Uji yang diminta : Protein, lemak, serat, abu, air dan BETN

Metode Analisis : - *Semi micro kjeldahl* (Protein)  
- *Soxhlet* (Lemak)  
- *Acid alkali digestion* (Serat)  
- *Furnace* (Abu)  
- *Oven* (Air)  
- *Calculation based on nutrient* (BETN)

Hasil Analisis : Terlampir

Malang, 24 Mei 2014  
Kepada Laboratorium  
  
Dr. Nurul Mahmudati, Dra, MKes

Lampiran Surat No. 19/LK-B/V/2014

**1. Hasil Analisis Kimia Sampel Tepung**

Sampel	Ulangan	Protein (%)	Lemak (%)	Serat (%)	Abu (%)	Air (%)	BETN (%)
A (keong)	1	45.345	2.987	16.436	10.602	8.462	24.631
	2	45.419	2.941	16.675	10.862	8.670	24.103
B (ulat)	1	57.268	4.672	12.810	10.179	7.100	15.071
	2	58.251	4.582	12.706	10.159	7.321	14.303
C (belalang)	1	61.851	3.285	18.024	11.966	9.434	4.873
	2	62.473	3.223	18.146	11.914	9.721	4.244

**2. Hasil Analisis Kimia Sampel Media Cair**

Sampel	Ulangan	Protein (%)
AP1	1	4.875
	2	4.904
AP2	1	4.975
	2	4.946
AP3	1	4.904
	2	4.932
AP4	1	4.847
	2	4.904
AP5	1	5.003
	2	4.975
BP1	1	5.587
	2	5.616
BP2	1	5.744
	2	5.715
BP3	1	5.801
	2	5.829
BP4	1	5.715
	2	5.701
BP5	1	5.844
	2	5.844
CP1	1	5.573
	2	5.559
CP2	1	5.687
	2	5.673
CP3	1	5.601
	2	5.573

Sampel	Ulangan	Protein (%)
CP4	1	5.473
	2	5.445
CP5	1	5.402
	2	5.431
NB	1	5.872
	2	5.886

**3. Hasil Analisis Kimia Sampel Tepung**

Sampel	Ulangan	Protein (%)
B (kepompong)	1	59.889
	2	59.871
C (belalang hijau)	1	68.820
	2	68.249

