

**POTENSI *Bacillus* sp. ASAL TANAH KEBUN RAYA LIWA KABUPATEN
LAMPUNG BARAT SEBAGAI AGEN BIOKONTROL TERHADAP
SERANGGA**

(Skripsi)

Oleh

**SUCIANI MIFTAHUL JANAH
NPM. 1717021007**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

**POTENSI *Bacillus* sp. ASAL TANAH KEBUN RAYA LIWA KABUPATEN
LAMPUNG BARAT SEBAGAI AGEN BIOKONTROL TERHADAP
SERANGGA**

Oleh

SUCIANI MIFTAHUL JANAH

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

**Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

ABSTRAK

POTENSI *Bacillus* sp. ASAL TANAH KEBUN RAYA LIWA KABUPATEN LAMPUNG BARAT SEBAGAI AGEN BIOKONTROL TERHADAP SERANGGA

Oleh

SUCIANI MIFTAHUL JANAH

Kebun Raya Liwa (KRL) menjadi salah satu kawasan konservasi tanaman secara *ex-situ* dengan potensi kekayaan tumbuhan koleksi. Dalam menjalankan fungsinya sebagai tempat konservasi dan pariwisata maka diperlukan perawatan khusus pada koleksi tanaman agar mempertahankan kualitas tanaman serta daya tarik wisatawan. Salah satu faktor penurunan kualitas tanaman koleksi yaitu disebabkan oleh Organisme Pengganggu Tanaman (OPT) salah satunya serangga. Penanggulangan menggunakan pestisida kimia akan berdampak negatif terhadap ekosistem dan meningkatkan resistensi serangga. Oleh sebab itu, diperlukan cara penanggulangan alami (biokontrol) yang dapat menekan pertumbuhan OPT. Genus *Bacillus* telah banyak dilaporkan memiliki kemampuan menjadi agen biokontrol untuk menanggulangi populasi OPT. Tujuan dari penelitian ini diantaranya untuk mengetahui karakteristik *Bacillus* sp. dari tanah KRL melalui uji morfologi, fisiologi, dan biokimia serta mengetahui potensinya sebagai agen biokontrol terhadap serangga. Rancangan penelitian bersifat deskriptif kualitatif. Isolat bakteri dikarakterisasi secara makroskopik dan mikroskopik, uji enzimatik, uji fisiologis, dan uji biokimia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa seluruh isolat terdeteksi adanya kristal protein. Nilai indeks proteolitik tertinggi dihasilkan isolat TBA 7 sebesar 4,6 mm. Indeks kitinolitik tertinggi dihasilkan isolat TMA 26 sebesar 2,5 mm, dan indeks lipolitik tertinggi dihasilkan isolat TMA 26 dan TB 5 sebesar 2,6 mm. Ketujuh isolat memiliki kemampuan membunuh *Spodoptera frugiperda* dengan waktu kematian paling cepat pada hari ke-3. Hal tersebut dikarenakan kristal protein bekerja sama dengan enzim yang dihasilkan bakteri untuk mendegradasi tubuh serangga.

Kata Kunci: Kebun Raya Liwa, *Bacillus* sp., Biokontrol, Serangga.

ABSTRACT

THE POTENTIAL OF *Bacillus* sp. FROM LIWA BOTANICAL GARDEN, WEST LAMPUNG AS AN INSECT BIOCONTROL AGENT

By

SUCIANI MIFTAHUL JANA

Liwa Botanical Garden is one of the *ex-situ* conservation areas that have the potential collection of plant diversity. In carrying out its function as a place of preservation and tourism, special treatment for plant collection is necessary to maintain plant quality as well as tourists' attraction. Plant quality may decrease due to the existence of Plant Destroying Organisms, such as insects. The use of chemical-based pesticides would likely harm the ecosystem and increase the insects' resistance. Therefore, natural control methods (biocontrol) are highly needed for inhibiting the growth of destructive insects. *Bacillus* has been widely reported to have the ability to be a biocontrol agent to destroy the population of insects. This study aims to determine the characteristics of *Bacillus* sp. from the soil of KRL through morphological, physiological, and biochemical tests and determine its potential as a biocontrol agent against insects. The study design is descriptive qualitative. Bacterial isolation is characterized by macroscopic and microscopic morphology tests, enzymatic tests, physiological tests, and biochemical tests. The results showed that seven isolates detected the presence of protein crystals. The highest proteolytic index value produced by TBA 7 was 4,6 mm. The highest chitinolytic index produced by TMA 26 was 2,5 mm, and the highest lipolytic index was produced by TMA 26 and TB 5 with an inhibition zone of 2,6 mm. It was known that seven isolates had the ability to kill *Spodoptera frugiperda*, the fastest effect being shown on the third day. The existence of bacterial protein crystals and enzymes could degrade the insect's body.

Keywords: Liwa Botanical Garden, *Bacillus* sp., Biocontrol, Insect.

Judul Skripsi

: **POTENSI *Bacillus* sp. ASAL TANAH KEBUN
RAYA LIWA KABUPATEN LAMPUNG
BARAT SEBAGAI AGEN BIOKONTROL
TERHADAP SERANGGA**

Nama Mahasiswa

: **Suciani Miftahul Janah**

Nomor Pokok Mahasiswa

: **1717021007**

Program Studi

: **Biologi**

Fakultas

: **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



1. **Komisi Pembimbing**

Pembimbing I

Pembimbing II


Dr. Kusuma Handayani, S.Si., M.Si.
NIP. 197808192008012018


Dra. Christina Nugroho Ekowati, M.Si.
NIP. 195808181985032001

2. **Ketua Jurusan Biologi**


Dr. Jani Master, S.Si., M.Si.
NIP. 198301312008121001

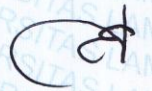
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Dr. Kusuma Handayani, S.Si., M.Si.



Sekretaris : Dra. Christina Nugroho Ekowati, M.Si.



Penguji Utama : Dr. Sumardi, M.Si.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, S.Si., M.T.
NIP.197407052000031001



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 31 Oktober 2022

**SURAT PERNYATAAN
KEASLIAN SKRIPSI**

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Suciani Miftahul Janah
NPM : 1717021007
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya dan sejujurnya bahwa, karya ilmiah saya yang menjadi syarat mencapai gelar Sarjana Sains dengan judul:

**“POTENSI *Bacillus* sp. ASAL TANAH KEBUN RAYA LIWA
KABUPATEN LAMPUNG BARAT SEBAGAI AGEN BIOKONTROL
TERHADAP SERANGGA”**

Bahwa keseluruhan dari karya ilmiah ini baik data, hasil analisis, maupun kajian ilmiahnya adalah benar hasil karya orisinal dari saya sendiri yang saya susun berdasarkan riset ilmiah melalui arahan komisi pembimbing dan pembahas. Karya ilmiah ini disusun dengan berpedoman pada norma dan etika penulisan yang berlaku. Saya memastikan bahwa karya ilmiah ini tidak berisi material yang telah dipublikasikan sebelumnya atau dengan kata lain hasil plagiasi, kecuali kajian teoritis yang digunakan sebagai acuan dalam penulisan karya ilmiah ini. Apabila di kemudian hari pernyataan yang saya buat ini terbukti tidak benar, maka saya bersedia bertanggung jawab dan menerima tuntutan hukum yang berlaku.

Bandar Lampung, 20 November 2022



Suciani Miftahul Janah
NPM. 1717021007

RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama Suciani Miftahul Janah atau akrab disapa dengan Suci atau Ani. Penulis lahir di Nambahrejo, Kecamatan Kotagajah, Kabupaten Lampung Tengah pada tanggal 15 Maret 2000. Penulis merupakan anak pertama dari dua bersaudara, dari pasangan Bapak Suratno dan Ibu Siti Maimunah.

Penulis mulai menempuh pendidikan di Taman Kanak-Kanak (TK) PGRI Nambahrejo pada tahun 2004-2005, dilanjutkan ke jenjang pendidikan dasar di SD Negeri 1 Nambahrejo pada tahun 2005-2011. Kemudian penulis melanjutkan pendidikan di Sekolah Menengah Pertama (SMP) Negeri 1 Punggur pada tahun 2011-2014. Penulis menempuh jenjang Sekolah Menengah Atas (SMA) Negeri 1 Kotagajah pada tahun 2014-2017. Pada tahun 2017, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN).

Selama menempuh pendidikan sebagai mahasiswa, penulis berpartisipasi dalam organisasi kemahasiswaan dan menjadi salah satu anggota bidang sains dan teknologi (SAINTEK) di Himpunan mahasiswa Biologi (HIMBIO) FMIPA Universitas Lampung periode 2018-2019. Penulis juga aktif menjadi salah satu asisten Laboratorium Mikrobiologi pada mata kuliah Mikrobiologi Pangan dan Industri.

Pada tahun 2018, penulis mengikuti kegiatan Karya Wisata Ilmiah (KWI) di Desa Gunung Rejo, Kecamatan Way Ratai, Kabupaten Pesawaran selama satu minggu. Pada bulan Januari sampai dengan Februari 2020, penulis melaksanakan kegiatan Kerja Praktik (KP) di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Abdul Moeloek Bandar Lampung dan menghasilkan karya ilmiah berupa laporan kerja praktik yang berjudul “**Analisis Pola Sensitivitas Bakteri *Staphylococcus aureus* terhadap Antibiotik dari Sampel Darah dan Sputum pada Pasien di RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Provinsi Lampung**”. Setelah menyelesaikan Kerja Praktik (KP), penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Nambahrejo, Kecamatan Kotagajah, Kabupaten Lampung tengah pada Bulan Juli sampai dengan Agustus 2020.

PERSEMBAHAN

Alhamdulillah rabbi'l'alamin, puji dan syukur kehadiran Allah SWT atas segala nikmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Sholawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW. Karya tulis ilmiah ini saya persembahkan sebagai bentuk pencapaian atas wujud tanggung jawab dan harapan tulus dari keluarga tercinta serta pihak-pihak lain yang berjasa dan terlibat dalam perjalanan hidup saya, khususnya kepada:

Kedua orang tuaku, Bapak Suratno dan Ibu Siti Maimunah

Terimakasih bapak dan ibu telah menjadi sosok yang paling berjasa dalam hidupku, yang mendukung impian serta cita-citaku, dan yang tak pernah berhenti melangitkan do'a untukku.

Adikku, Desti Agni Fauziah

Terimakasih kepada adikku tersayang yang telah menjadi penyemangat dalam hidupku dan selalu memberikan do'a serta dukungan kepadaku.

Bapak dan Ibu Dosen

Terimakasih bapak dan ibu dosen pembimbing yang senantiasa sabar dalam membimbing dan memotivasi sehingga dapat terselesaikan penulisan skripsi ini.

Sahabat-sahabatku

Terimakasih senantiasa memberikanku dukungan dan motivasi di setiap langkah perjalananku.

Almamaterku tercinta

Universitas Lampung

MOTTO

“A person can leave you tomorrow, but what you build for yourself is forever”
(Henry Manampiring, The Alpha Girl's Guide Book)

*“You can't go back and change the beginning, but you can start where you are
and change the ending”*
(C.S. Lewis)

“Don't be afraid, I am with you all the time, listening and seeing”
(Qur'an 20:46)

“Kamu tidak hancur, kamu sedang dibentuk”
(Anonim)

“You never fail, until you stop trying”
(Albert Einstein)

“Don't lose hope, nor be sad”
(Quran 3:139)

SANWACANA

Alhamdulillahirabbil'alamin, puji dan syukur kehadirat Allah SWT atas segala karunia, cinta, dan kasih sayang-Nya, sehingga penulis diberikan kesehatan, kekuatan, serta kesabaran dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini dengan judul '**Potensi *Bacillus* sp. Asal Tanah Kebun Raya Liwa Kabupaten Lampung Barat sebagai Agen Biokontrol terhadap serangga**' sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di Universitas Lampung.

Penulis menyadari bahwa selama proses penyusunan skripsi ini masih banyak terdapat kekurangan. Penyusunan skripsi ini tak luput dari bantuan dan bimbingan berbagai pihak, sehingga pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, S.Si., M.T. sebagai Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung;
2. Bapak Dr. Jani Master, M.Si. sebagai Ketua Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung;
3. Ibu Dr. Kusuma Handayani, S.Si., M.Si. sebagai Kepala Program Studi S1 Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung sekaligus pembimbing I yang telah bersedia memberikan topik, pengarahan, serta pendanaan selama penelitian, terimakasih atas kesabaran ibu dalam membimbing sekaligus memberikan masukan selama proses penyusunan skripsi ini;
4. Ibu Dra. Christina Nugroho Ekowati, M.Si. sebagai pembimbing II sekaligus pembimbing akademik yang telah bersedia membimbing dan memberikan masukan selama proses penyusunan skripsi ini, terimakasih telah

memberikan arahan akademik untuk menapaki tahapan demi tahapan selama menjadi mahasiswa;

5. Bapak Dr. Sumardi, M.Si. sebagai pembahas skripsi yang telah bersedia memberikan masukan, arahan, serta ilmu pengetahuan dalam setiap bimbingan terkait perbaikan yang membangun penyusunan skripsi ini;
6. Kedua orang tua tercinta, Bapak Suratno dan Ibu Siti Maimunah yang telah memberikan cinta dan kasih sayang serta dukungan spiritual, moral, dan materi, terimakasih atas segala do'a yang telah dilantunkan sehingga penulis dapat kuat bertahan sehingga dapat menyelesaikan tanggung jawabnya sebagai mahasiswa;
7. Adik tersayang, Desti Agni Fuziah yang selalu memberikan semangat dan menghibur penulis;
8. Nenekku tersayang, Sanis (Alm.) yang selalu memberi kehangatan dan nasihat kepada penulis terlebih selama masa perkuliahan berlangsung, serta menjadi pendengar yang baik semasa hidupnya;
9. Pandu Kurniawan Khoiruddin, yang telah banyak membantu penulis baik dalam proses penelitian maupun penyusunan skripsi. *Thank you for always being the most reliable and supportive people, thank you for being there when I needed you the most;*
10. Rekan satu tim penelitian 'BKS': Indriani, Lisa Maryati, Vidia Royanti, Fadlina Athfin, dan Ria Novitasari yang saling menguatkan dan berjuang bersama dalam menyelesaikan penelitian;
11. Teman- temanku tersayang: Reni Rahmawati, Feni Yulinda, Mesy Miranda AR., Ulin Ni'mah Setiawati, Dias Anggit Pradini, Vidia Royanti, Indriani, Fadlina Athfin, dan Indah Stellawati yang telah bersedia menjadi tempat berbagi cerita dan keluh kesah serta mendukung setiap tahap dalam penyusunan skripsi ini;
12. Ibu Oni Mastuti, S.Si. dan teman-teman penelitian Mikrobiologi 2017 '*Mintuy*' yang telah membantu selama proses penelitian di Laboratorium Mikrobiologi;
13. Teman-teman Biologi Angkatan 2017 yang memberikan dukungan kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini;

14. Semua pihak yang terlibat dan tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah membantu selama proses penelitian dan penyusunan skripsi ini;
15. *Last but not least, I wanna thank me for believing in me, for doing all this hard work, for having no days off, for never quitting, for just being me at all times.*

Penulis menyadari keterbatasan kemampuan dan pengetahuan dalam penyusunan skripsi ini, sehingga masih banyak kekurangan yang terdapat di dalam skripsi ini. Namun, penulis berharap skripsi ini dapat diterima dan memberikan manfaat bagi pembaca.

Bandar Lampung, 20 November 2022

Penulis,

Suciani Miftahul Janah

DAFTAR ISI

	Halaman
PERSEMBAHAN	i
MOTTO	ii
SANWACANA	iii
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang dan Masalah	1
1.2 Tujuan	3
1.3 Kerangka Pemikiran.....	3
1.4 Hipotesis.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Gambaran Umum Kebun Raya Liwa	5
2.2 <i>Bacillus</i> sp.	7
2.2.1 Deskripsi dan Klasifikasi <i>Bacillus</i> sp.....	7
2.2.2 Proses Sporulasi	9
2.2.3 Kristal Protein	10
2.3 Karakter Enzimatik <i>Bacillus</i> sp.....	14
2.3.1 Enzim Protease.....	14
2.3.2 Enzim Kitinase	15
2.3.3 Enzim Lipase.....	16
2.4 <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae).....	17
2.5 Tanaman Transgenik	19
III. METODE PENELITIAN	22

3.1 Waktu dan Tempat	22
3.2 Alat dan Bahan	22
3.3 Metode	23
3.4 Pelaksanaan	24
3.4.1 Peremajaan <i>Bacillus</i> sp.	24
3.4.2 Pengamatan Morfologi Kristal Protein	24
3.4.3 Karakter Morfologi <i>Bacillus</i> sp.	25
3.4.4 Uji Fisiologi	26
3.4.4.1 Uji Kebutuhan Oksigen (O ₂)	26
3.4.4.2 Uji Katalase	27
3.4.4.3 Uji Motilitas	28
3.4.5 Uji Biokimia	29
3.4.6 Uji Enzimatik	29
3.4.6.1 Enzim Protease	29
3.4.6.2 Enzim Kitinase	30
3.4.6.3 Enzim Lipase	31
3.4.6.4 Perhitungan Nilai Indeks Enzimatik	31
3.4.7 Uji Bioassay pada Hewan Model Larva <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	32
3.5 Diagram Alir Penelitian	33
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	34
4.1 Hasil	34
4.1.1 Pengamatan Morfologi <i>Bacillus</i> sp.	34
4.1.1.1 Pengamatan Morfologi Kristal Protein	34
4.1.1.2 Pengamatan Morfologi secara Makroskopik	36
4.1.1.3 Pengamatan Morfologi secara Mikroskopik	38
4.1.2 Karakter Fisiologi	40
4.1.3 Karakter Biokimia	42
4.1.4 Karakter Enzimatik	46
4.1.5 Bioassay pada Hewan Model Larva <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	49
4.2 Pembahasan	51
4.2.1 Pengamatan Morfologi <i>Bacillus</i> sp.	51
4.2.1.1 Pengamatan Morfologi Kristal Protein	51
4.2.1.2 Pengamatan Morfologi secara Makroskopik	54
4.2.1.3 Pengamatan Morfologi secara Mikroskopik	54
4.2.2 Karakter Fisiologi	55
4.2.3 Karakter Biokimia	57
4.2.4 Karakter Enzimatik	62
4.2.5 Bioassay pada Hewan Model Larva <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	67

V. SIMPULAN DAN SARAN.....	69
5.1 Simpulan	69
5.2 Saran	70
DAFTAR PUSTAKA	71
LAMPIRAN.....	87
Gambar 28-49.....	88-102

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Pengamatan Morfologi Kristal Protein	35
2. Hasil Pengamatan Morfologi secara Makroskopik	37
3. Hasil Pengamatan Morfologi secara Mikroskopik.....	40
4. Hasil Pengamatan Uji Fisiologi	42
5. Hasil Uji Fermentasi Karbohidrat	45
6. Karakter Enzimatik secara Kualitatif	48
7. Rata-Rata Nilai Indeks Enzimatik.....	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Lokasi Kebun Raya Liwa (Rofiq dkk., 2021)	6
2. Morfologi <i>Bacillus</i> sp. (Zivanovic <i>et al.</i> , 2018).....	8
3. Siklus Sporulasi Bakteri (Ray, 2004)	10
4. Mikrograf Elektron Badan Parasporal dari <i>Bacillus thuringiensis</i> (Moazami, 2017)	11
5. Pembentukan Kristal Parasporal <i>Bacillus thuringiensis</i> dan <i>Lysinibacillus sphaericus</i> (Regis <i>et al.</i> , 2001)	12
6. Ringkasan Spektrum Inang δ -endotoksin <i>Bacillus thuringiensis</i> Terhadap Serangga Target (Palma <i>et al.</i> , 2014)	13
7. Karakter Morfologi <i>Spodoptera frugiperda</i> (Trisyono <i>et al.</i> , 2019)	17
8. Serangan yang Diakibatkan oleh <i>Spodoptera frugiperda</i> pada Tanaman Jagung (Ariska dkk., 2021)	18
9. Metode Transfer Gen Menggunakan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Yan <i>et al.</i> , 2022).	21
10. Morfologi Koloni Bakteri (American Type Culture Collection, 2015)	26
11. Pola Pertumbuhan Bakteri Berdasarkan Kebutuhan O ₂ (Nurmayasari,2010)	27
12. Tipe Pertumbuhan Bakteri pada Medium Agar Tegak (Nurmayasari, 2010)	28

13.	Diagram Alir Penelitian	33
14.	Morfologi Kristal Protein Menggunakan Perbesaran 1000x	34
15.	Pengamatan Morfologi Koloni Isolat TSR 6 pada Medium <i>Nutrient Agar</i> (NA)	36
16.	Pengecatan Gram Isolat TMA 26 dan TBA 7 dengan Perbesaran 1000x.....	38
17.	Pengamatan Mikroskopik Pengecatan Endospora pada Isolat TBA 4 dengan Perbesaran 1000x.....	39
18.	Pengamatan Mikroskopik Pengecatan Endopora pada Isolat TB 7 dengan Perbesaran 1000x.....	39
19.	Uji Katalase	41
20.	Hasil Uji Fermentasi Glukosa	43
21.	Hasil Uji Fermentasi Sukrosa	44
22.	Hasil Uji Fermentasi Laktosa.....	44
23.	Uji Kualitatif Enzim Protease pada Isolat TBA 4.....	46
24.	Uji Kualitatif Enzim Kitinase pada Isolat TB 5	47
25.	Uji Kualitatif Enzim Lipase pada Isolat BP 14.....	47
26.	Respon Tubuh Larva <i>Spodoptera frugiperda</i> Instar 3 yang Terinfeksi Isolat <i>Bacillus</i> sp.....	50
27.	Jumlah dan Waktu Kematian Larva <i>Spodoptera frugiperda</i>	50
28.	Morfologi Kristal Protein.....	88
29.	Morfologi Kristal Protein.....	89
30.	Hasil Pengecatan Gram.	90

31.	Hasil Pengecatan Gram	91
32.	Hasil Pengecatan Spora.....	91
33.	Hasil Pengecatan Spora.....	92
34.	Hasil Uji Katalase	92
35.	Hasil Uji Katalase	93
36.	Hasil Uji Fermentasi Glukosa	94
37.	Hasil Uji Fermentasi Glukosa	95
38.	Hasil Uji Fermentasi Sukrosa	95
39.	Hasil Uji Fermentasi Sukrosa	96
40.	Hasil Uji Fermentasi Laktosa.....	96
41.	Hasil Uji Fermentasi Laktosa.....	97
42.	Hasil Uji Enzim Protease	98
43.	Hasil Uji Enzim Protease	99
44.	Hasil Uji Enzim Lipase	99
45.	Hasil Uji Enzim Lipase	100
46.	Hasil Uji Enzim Kitinase	100
47.	Hasil Uji Enzim Kitinase	101
48.	Hasil Uji Bioassay terhadap Larva <i>Spodoptera frugiperda</i>	101
49.	Hasil Uji Bioassay terhadap Larva <i>Spodoptera frugiperda</i>	102

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang dan Masalah

Kebun Raya Liwa (KRL) merupakan destinasi yang sedang dikembangkan sebagai objek wisata dan kreasi serta kawasan konservasi tumbuhan secara *ex-situ* yang terletak pada ketinggian 800-900 mdpl di Desa Kubu Perahu, Kecamatan Balik Bukit, Kabupaten Lampung Barat (Suyadi, 2017). Kebun Raya Liwa yang baru diresmikan pada tahun 2017 merupakan kebun raya yang merepresentasikan vegetasi di Taman Nasional Bukit Barisan Selatan (TNBBS). Dalam memaksimalkan potensinya, perlu dilakukan kajian yang mendukung pemeliharaan tanaman koleksi dari serangan Organisme Pengganggu Tanaman (OPT) berupa serangga (Suyadi, 2017; Ningrum dkk., 2020).

Purnomo (2015) memaparkan bahwa beberapa serangga menyebabkan kerusakan pada tanaman hias. Salah satu tanaman hias yang rentan terserang adalah anggrek. Beberapa serangga yang menyerang anggrek diantaranya yaitu tungau/kutu perisai, semut hitam, belalang kecil, trips, *red spinder*, kepik, ulat daun dan kutu tudung (Nisa, 2018). Pengendalian Organisme Pengganggu Tanaman (OPT) di Indonesia (95,29%) masih bergantung pada pestisida kimia. Hal ini disebabkan karena penggunaannya yang dianggap efektif, mudah, dan ekonomis. Selain berdampak buruk bagi kesehatan karena dipengaruhi daya racun, pestisida juga akan berdampak buruk bagi tanaman yaitu akan meninggalkan residu pada tanaman tersebut. Sementara

residu yang terakumulasi di dalam tanah akan berpengaruh terhadap organisme tanah serta tanaman disekitarnya sehingga berpotensi mencemari lingkungan sekitar (Handayani dkk., 2017; Surachman *et al.*, 2017).

Strategi alternatif yang dapat digunakan untuk mengurangi dampak negatif dari pemakaian pestisida kimia adalah pengendalian hayati (Amrullah, 2019). Pengendalian hayati (biokontrol) adalah pengendalian yang dilakukan oleh agen hayati terhadap organisme pengganggu tanaman (OPT). Agen hayati yang digunakan berupa mikroorganisme, salah satunya bakteri. Alasan penggunaan bakteri sebagai agen biokontrol dikarenakan bakteri lebih mudah diuraikan karena komponen bakteri seperti lipid, selulosa dan kitin mudah terdegradasi oleh mikroorganisme lain sehingga tidak mencemari lingkungan. Kelebihan biokontrol yaitu aman bagi tanaman non-target, lingkungan dan manusia (Sopialena, 2018).

Marga *Bacillus* menjadi salah satu bakteri yang cukup banyak digunakan pada pengendalian Organisme Pengganggu Tanaman (OPT). Beberapa spesies *Bacillus* sp. telah banyak dilaporkan sebagai agen biokontrol diantaranya *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus papillae*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus pumilus*, *Brevibacillus laterosporus*, dan lain-lain (Mampallil *et al.*, 2017). Beberapa penelitian telah membuktikan kemampuan *Bacillus* sp. sebagai agen biokontrol. Djereng dkk. (2017) melaporkan bahwa isolat *Bacillus* sp. B3 mampu menghambat penyakit layu bakteri pada tanaman cabai yang disebabkan oleh patogen *Ralstonia* sp. dengan insiden penurunan infeksi sebesar $\pm 100\%$. Penelitian yang dilakukan oleh Muis (2016) melaporkan bahwa *Bacillus subtilis* efektif mengendalikan patogen tular tanah pada jagung. Zulfiana dkk. (2017) juga melaporkan bahwa pemberian racun umpan pada beberapa stadium instar *Spodoptera litura* dengan *Bacillus thuringiensis* menghasilkan mortalitas larva tertinggi pada stadium instar 3 yaitu sebesar 80%. Penelitian lain juga dilakukan oleh Indriani dan Pujiastuti (2020) bahwa perlakuan dengan penambahan 20 mL suspensi *Bacillus*

thuringiensis memiliki tingkat mortalitas sebesar 88% terhadap *Spodoptera frugiperda* dengan waktu kematian 36 jam.

Beberapa penelitian mengenai potensi *Bacillus* sp. sebagai agen biokontrol telah banyak dilakukan namun belum ada pengkajian lebih lanjut mengenai potensi *Bacillus* sp. yang diisolasi Tanah Kebun Raya Liwa. Oleh karena itu, melalui penelitian ini perlu diketahui karakteristik *Bacillus* sp. melalui beberapa uji seperti uji morfologi, fisiologi dan biokimia serta potensinya sebagai agen biokontrol terhadap serangga.

1.2. Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui karakteristik *Bacillus* sp. asal tanah Kebun Raya Liwa melalui uji morfologi, uji fisiologi, dan uji biokimia
2. Mengetahui potensi *Bacillus* sp. asal tanah Kebun Raya Liwa sebagai agen biokontrol terhadap serangga

1.3. Kerangka Pemikiran

Kondisi topografi Kebun Raya Liwa sangat bervariasi dengan kontur dan ketinggian tanah yang berbeda-beda sehingga menjadikannya berbukit dan membentuk sumber air pada beberapa tempat. Kebun Raya Liwa merupakan daerah dataran tinggi dengan temperatur 17-30⁰ C sehingga memiliki iklim dengan curah hujan yang tinggi. Beberapa faktor lingkungan tersebut mendukung kesuburan tanah di Kebun Raya Liwa sehingga memungkinkan keberagaman mikroorganisme tanah salah satunya adalah *Bacillus* sp.

Beberapa literatur telah banyak melaporkan kemampuan *Bacillus* sp. sebagai agen biokontrol. *Bacillus* sp. memiliki kemampuan dalam menghasilkan beberapa enzim ekstraseluler diantaranya yaitu protease, kitinase dan lipase yang bekerja sinergis dalam mendegradasi tubuh serangga target. Spesies *Bacillus* sp. yang paling umum digunakan sebagai agen biokontrol adalah *Bacillus thuringiensis* dan *Lysinibacillus sphaericus* karena memiliki kemampuan dalam memproduksi kristal protein yang bersifat toksik terhadap Ordo Diptera, Lepidoptera dan Coleoptera. Melalui aktivitas proteolitik, kristal protein yang semula bersifat protoksin akan diubah menjadi toksin. Sedangkan Enzim lipase akan mendegradasi tubuh serangga yang mengandung substrat lipid. Enzim protease dan enzim kitinase akan mendegradasi komponen kutikula serangga yang tersusun atas protein dan kitin.

Potensi *Bacillus* sp. sebagai agen biokontrol terhadap serangga perlu dikaji lebih lanjut dalam penelitian ini melalui karakterisasi *Bacillus* sp. yang memiliki kemampuan dalam membentuk kristal protein serta daya bunuh terhadap larva *Spodoptera frugiperda* dengan metode *food contamination* yaitu melalui pemberian makan dengan kubis yang telah disemprot suspensi bakteri dengan konsentrasi 3×10^8 sel/ml.

1.4. Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

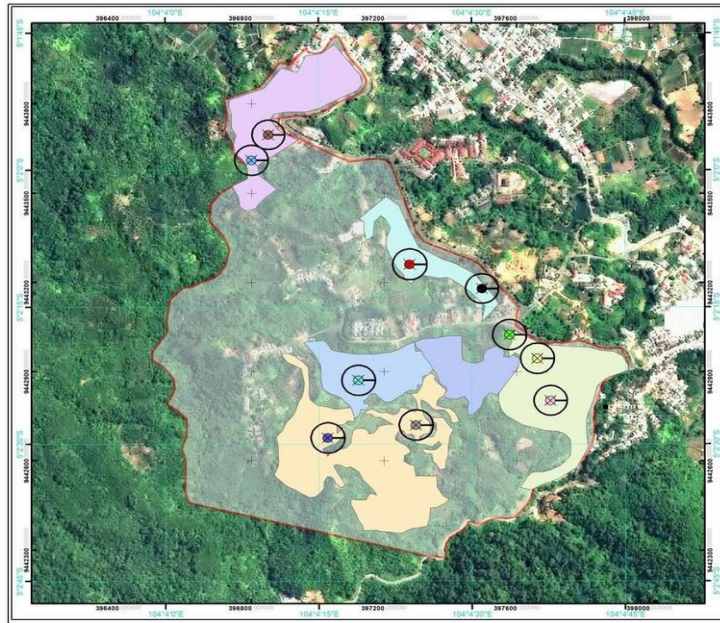
1. *Bacillus* sp. asal tanah Kebun Raya Liwa memiliki karakteristik yang berbeda
2. *Bacillus* sp. asal Tanah Kebun Raya Liwa memiliki potensi sebagai agen biokontrol terhadap serangga

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Gambaran Umum Kebun Raya Liwa

Kebun Raya Liwa (KRL) adalah salah satu tempat konservasi tanaman secara *ex-situ* yang terletak di Desa Pekon Kubu Perahu, Kec. Balik Bukit, Kota Liwa, Kabupaten Lampung Barat, Provinsi Lampung. Kebun Raya Liwa terletak pada ketinggian 800-900 mdpl dengan tapak bergelombang dan kemiringan lereng yang cukup terjal. Koordinat lokasi Kebun Raya Liwa yaitu terletak pada 5° 02' 17.98" LS dan 104° 04' 34.27" BT. Kebun Raya Liwa telah memiliki area koleksi tanaman yang ditanam di Vak I, Vak II, Vak III, dan Vak IV ditambah area baru yaitu Vak V dan Vak VI. Beberapa koleksi tanaman yang dimiliki Kebun Raya Liwa diantaranya yaitu Taman *Araceae*, Taman Obat Mini, Taman Rumput Bali, Taman Buah dan Taman Hias. Selain itu, Kebun Raya Liwa juga menyediakan koleksi anggrek dan pembibitan yang terdapat di dalam Rumah Paranet serta dilengkapi kantor UPT sebagai fasilitas penunjang (Kebun Raya Liwa, 2017).

Pembangunan Kebun Raya Liwa bermula dengan dengan penyusunan rencana induk (masterplan) pada tahun 2007. Kemudian proses berlanjut dengan pemaparan dan diskusi rencana induk pada tanggal 20 November 2008 di Aula Pemerintah Kabupaten Lampung Barat sebagai bentuk kerja sama tiga pihak (tripartite) yaitu Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya LIPI-Bogor; Kementerian Pekerjaan Umum (PU) dan Pemerintah Kabupaten Lampung Barat. Selanjutnya pembentukan Kebun Raya Liwa dikuatkan dengan Peraturan Bupati Lampung Barat Nomor 26 Tahun 2010 (Munawaroh *et al.*, 2017). Secara umum, gambaran lokasi Kebun Raya Liwa dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Lokasi Kebun Raya Liwa (Rofiq dkk., 2021).

Kebun Raya Liwa berfungsi sebagai tempat konservasi, penelitian, pendidikan serta menjalankan fungsi wisata. Keberadaan Kebun Raya Liwa yang merupakan kawasan Pegunungan Bukit Barisan dengan topografi punggung bukit (*ridge*), lembah (*valley*), tanah cekung (*convex*), tanah cembung (*concave*), dan sedikit tanah datar (*flat*) menjadi tempat strategis serta berpotensi besar sebagai salah satu objek wisata penting bagi Kabupaten Lampung Barat (Munawaroh *et al.*, 2017).

Luas area yang dimiliki Kebun Raya Liwa sebesar 86,7 ha. Tanaman yang difokuskan sebagai koleksi di Kebun Raya Liwa merupakan tanaman hias Indonesia dan perwakilan dari flora Sumatra bagian selatan. Koleksi tanaman hias di Kebun Raya Liwa berbasis pendayagunaan jenis tanaman hias Indonesia sehingga diharapkan dapat mendorong perekonomian masyarakat disekitarnya (Munawaroh *et al.*, 2017).

Munawaroh *et al.* (2017), memaparkan beberapa peranan dari Kebun Raya Liwa dalam pengembangan tanaman hias, diantaranya sebagai berikut:

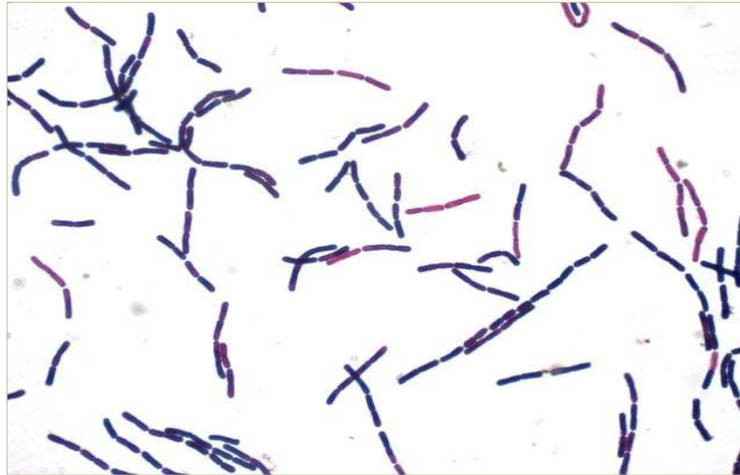
1. Menyediakan ruang terbuka dalam kota sebesar 30% ;

2. Meningkatkan kualitas ruang publik;
3. Membantu perekonomian masyarakat melalui kegiatan pendayagunaan tanaman hias;
4. Merepresentasikan keanekaragaman tanaman di Taman Nasional Bukit Barisan (TNBBS);
5. Mewujudkan Lampung Barat sebagai Kabupaten Konservasi;
6. Menjadi perwakilan keanekaragaman hayati tanaman hias dari seluruh kabupaten di Provinsi Lampung.

2.2. *Bacillus* sp.

2.2.1. Deskripsi dan Klasifikasi *Bacillus* sp.

Bacillus sp. adalah bakteri Gram positif, berbentuk batang, bersifat aerob dan anaerob fakultatif serta memiliki kemampuan dalam membentuk endospora. Secara umum, Genus *Bacillus* merupakan kelompok mikroorganisme tanah. Namun, *Bacillus* sp. dapat diisolasi dari berbagai sumber diantaranya yaitu udara, air, usus manusia dan hewan, sayuran, makanan, dan materi tumbuhan yang terdekomposisi (Alou *et al.*, 2015; Kotb, 2015; Graumann, 2007). Karakteristik *Bacillus* sp. secara umum memiliki bentuk koloni bulat tak beraturan, berwarna putih, kekuningan hingga krem, memiliki struktur permukaan yang kasar dan tidak berlendir. *Bacillus* sp. menunjukkan ketahanan yang berbeda terhadap berbagai cekaman seperti kadar garam, panas, asam dan yang lainnya (Corbin, 2004; Hatmanti, 2000). Karakteristik *Bacillus* sp. secara mikroskopik ditunjukkan dengan pengamatan morfologi pada Gambar 2.



Gambar 2. Morfologi *Bacillus* sp. (Zivanovic *et al.*, 2018).

Beberapa kelompok *Bacillus* spp. khususnya *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* dan *Bacillus thuringiensis* merupakan spesies yang diketahui memiliki kemampuan dalam menghasilkan *toxin* termasuk *enterotoxin (Cereulide)*, *bipartite exotoxins: protective antigen- lethal factor (PA-LF)* dan *PA-edema factor (PA-EF)*, *toxin Cry* dan *Cyt*. *Cereulide toxin* diproduksi oleh *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* yang mengkontaminasi makanan. Sedangkan PA-LF dan PA-EF dihasilkan oleh *Bacillus anthracis* yang merupakan racun penyebab penyakit mematikan pada manusia dan hewan. Toksin *Cry* dan *Cyt* merupakan toksin yang dihasilkan *Bacillus thuringiensis* yang bersifat patogen terhadap serangga target sehingga memiliki kemampuan sebagai agen biokontrol (Elshagabee *et al.*, 2017; Argolo-Filho *et al.*, 2014).

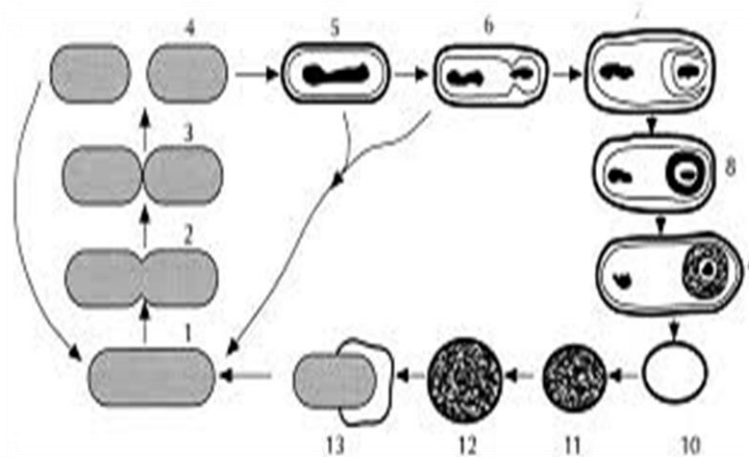
Menurut Vos *et al.* (2011) dalam *Bergey's manual of systematic bacteriology*, klasifikasi *Bacillus* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Order	: Bacillales
Family	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>

Bacillus adalah kelompok rhizobakteria yang memiliki kemampuan dalam membentuk spora sebagai bentuk pertahanan hidup pada lingkungan ekstrim (Hasheem *et al.*, 2019). Endospora tersebut menyebabkan *Bacillus* memiliki ketahanan terhadap kondisi lingkungan ekstrim seperti radiasi, panas, asam, desinfektan, kekeringan, kekurangan nutrisi dan dapat dorman dalam jangka waktu yang panjang. Bakteri rhizosfer dari kelompok *Bacillus* sp. telah banyak dikembangkan dan dilaporkan efektif sebagai agen hayati untuk mengendalikan patogen yang menginfeksi tanaman (Widyawati, 2008; Nanda dkk., 2018).

2.2.2. Proses Sporulasi

Menurut Ray (2004), terdapat beberapa tahapan dalam proses sporulasi yang ditunjukkan pada Gambar 3. Tahap pertama yaitu penghentian replikasi DNA, kemudian diikuti oleh kromosom yang tersusun berjajar di dalam filamen aksial dan pembentukan mesosom. Selanjutnya terjadi proses invaginasi membran sel dan pembentukan septum. Pada tahap selanjutnya telah terbentuk paraspora yaitu dengan membentuk dinding sel germinal dan korteks. Terjadi proses akumulasi ion Ca^{2+} dan sintesis DPN. Deposisi mantel spora, pematangan spora, dehidrasi protoplas dan resistensi terhadap panas. Dinding sel akan mengalami lisis enzimatik dan pembebasan spora sebagai tahap akhir sporulasi.



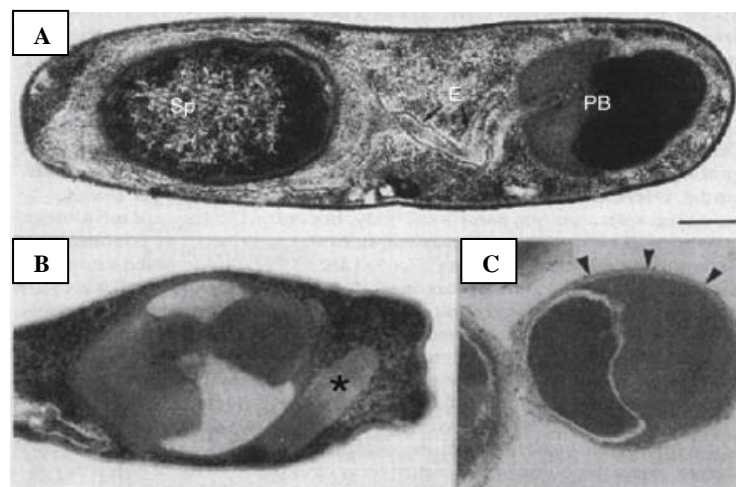
Gambar 3. Siklus Sporulasi Bakteri. **Keterangan:** (1-4) Multiplikasi sel, (5) Pembentukan filamen aksial, (6) Pembentukan septat, (7) Pembentukan prespora, (8) Pembentukan korteks, (9) Pembentukan mantel, (10) Spora bebas, (11) Germinasi diikuti dengan aktivasi, (12) Pembengkakan spora, (13) Pertumbuhan sel (Ray, 2004).

Proses sporulasi akan menghasilkan dua sekat pada sel dengan ukuran yang berbeda. Pada bagian sel vegetatif mempunyai ukuran lebih besar dibandingkan dengan prespora. Pemisahan tersebut akibat pembagian bahan kromosom di setiap kompartemen. Pembentukan septum asimetris merupakan tahapan yang diatur oleh ekspresi gen yang mempunyai program berbeda antara kedua sel tersebut. Terdapat pembentukan dua faktor sigma yaitu σF dan σE sebagai alat program spesifik untuk mengekspresikan gen yang terbentuk sebelum pembentukan septum (Errington, 2003).

2.2.3. Kristal Protein

Kelompok *Bacillus* sp. yang memiliki kemampuan dalam membentuk kristal protein adalah *Bacillus thuringiensis* dan *Lysinibacillus sphaericus*. *Bacillus thuringiensis* memiliki kemampuan dalam membentuk kristal protein parasporal (δ -endotoksin) yang mempunyai toksisitas terhadap beberapa serangga. Toksin

kristal parasporal yang dihasilkan *Bacillus thuringiensis* dapat digunakan untuk mengendalikan beberapa insekta, seperti pada ordo Lepidoptera, Diptera dan Coleoptera. Sebuah penelitian terbaru mendapatkan hasil bahwa toksin kristal parasporal dapat mengendalikan insekta dari ordo lain diantaranya Hemiptera, Orthoptera, Hymenoptera, Isoptera, Malophaga, Thisnoptera dan beberapa hama seperti Nematoda dan tungau. Toksisitas *Bacillus thuringiensis* bersifat spesifik terhadap insekta target. Beberapa faktor yang mempengaruhi toksisitas *Bacillus thuringiensis* yaitu reseptor membran, level pH dan aktivitas protease dari saluran pencernaan insekta target. *Bacillus thuringiensis* memiliki beberapa strain yang bervariasi, sehingga terdapat perbedaan pada fisiologi pertumbuhan, tipe toksin dan jumlah toksin yang dihasilkan (Argolo-Filho *et al.*, 2014; Sanahuja *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2014). Morfologi toksin *Bacillus thuringiensis* disajikan pada Gambar 4.

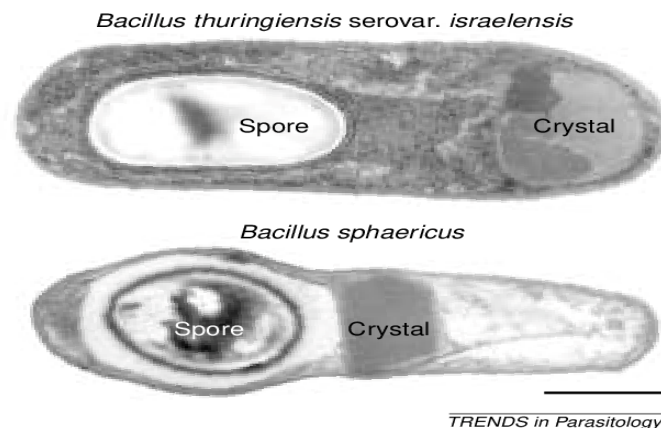


Gambar 4. Mikrograf Elektron Badan Parasporal dari *Bacillus thuringiensis*.
Keterangan: (A) Spora dan kristal endotoksin dari sel bakteri (B) badan parasporal (C) Kristal protein (Moazami, 2017).

Kristal protein yang dibentuk oleh *Bacillus thuringiensis* merupakan glikoprotein yang bersifat larut dalam air serta tidak stabil dalam media alkali (Jati dkk., 2013). Menurut Sansinenea (2012), pembentukan kristal protein bersamaan dengan

pembentukan endospora yaitu pada saat proses sporulasi. Kristal protein dibentuk di dalam sel 2-3 jam setelah akhir fase eksponensial. Kristal protein akan keluar dari dalam sel ketika sel mengalami autolisis setelah proses sporulasi sempurna. Pembentukan kristal protein menghasilkan bentuk yang berbeda-beda.

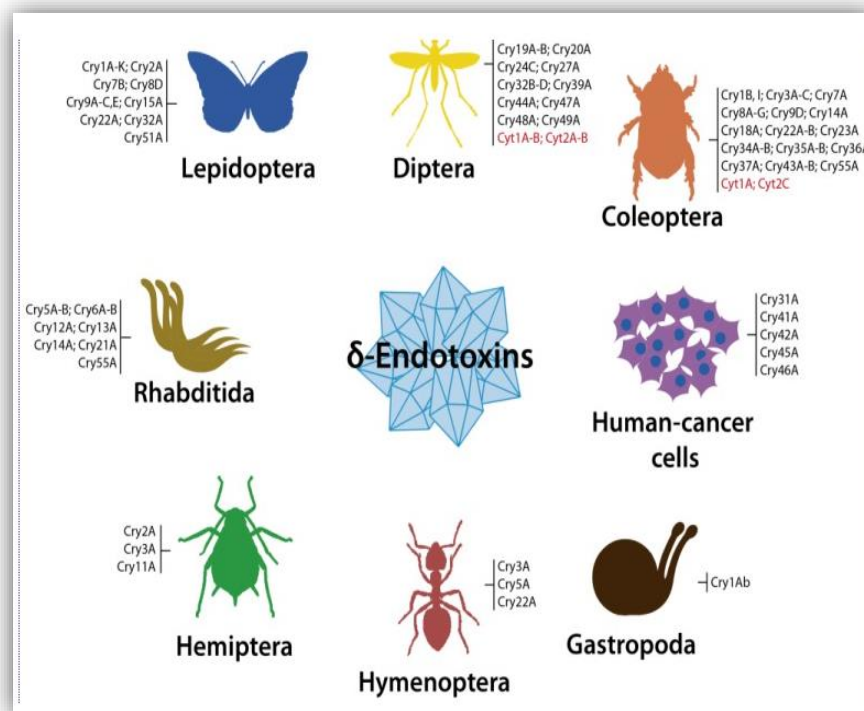
Lysinibacillus sphaericus memiliki kemampuan dalam membentuk kristal protein selama fase sporulasi dan memiliki toksisitas terhadap larva nyamuk. Beberapa studi mengungkapkan dua jenis toksin yang bersifat larvasida yang dihasilkan beberapa strain dari *Lysinibacillus sphaericus* yaitu *Binary toxin (Btx)* dan *Mosquitocidal toxin (Mtx)*. *Binary toxin (Btx)* dibagi menjadi dua yaitu *Bin A* dan *Bin B* dengan ukuran 42 kDa dan 51 kDa. Sedangkan *Mtx 1*, *Mtx 2*, dan *Mtx 3* masing-masing memiliki ukuran 100 kDa, 32 kDa, 35 kDa. Mekanisme yang dilakukan *Lysinibacillus sphaericus* dalam membunuh serangga target sama dengan mekanisme yang dilakukan oleh *Bacillus thuringiensis* (Cavados *et al.*, 2017; El-bendary, 2006). Perbedaan kristal protein pada *Bacillus thuringiensis* dan *Lysinibacillus sphaericus* disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Pembentukan Kristal Parasporal *Bacillus thuringiensis* dan *Lysinibacillus sphaericus* (Regis *et al.*, 2001).

Kristal protein *Bacillus thuringiensis* bersifat insektisidal (membunuh serangga). Toksisitas dari kristal protein tergantung dari jenis serangga terutama

Ordo Diptera, Lepidoptera dan Coleoptera. Kristal protein bersifat protoksin, apabila masuk ke dalam saluran pencernaan serangga akan berubah menjadi polipeptida yang lebih pendek dan bersifat toksin. Toksin yang berinteraksi dengan sel ephitelium serangga akan membentuk pori-pori pada membran saluran pencernaan serangga sehingga mengganggu tekanan osmotik sel. Hal ini akan menyebabkan sel membengkak dan lisis sehingga menyebabkan kematian pada serangga (Hofte and Whiteley, 1989). Toksisitas *Bacillus thuringiensis* terhadap serangga target berdasarkan jenis toksin disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Ringkasan Spektrum Inang δ -endotoksin *Bacillus thuringiensis* terhadap Serangga Target (Palma *et al.*, 2014).

Protoksin yang dihasilkan *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) memiliki dua famili yaitu protein *Cry* (kristal) dan *Cyt* (sitolitik), yang dikode oleh gen *Cry* dan *Cyt*. Keunggulan dari protein *Cry* dibandingkan dengan protein *Cyt* yaitu kemampuannya yang lebih tinggi sebagai agen biologi dalam mengontrol populasi

serangga karena mempunyai target sangat spesifik. Toksin *Cyt* merupakan toksin sitolitik dan hemolitik yang memiliki ukuran 25-28 kDa. Toksin sitolitik menyebabkan sel mengalami lisis, sedangkan toksin hemolitik menyebabkan lisis pada sel darah. Mekanisme patogenesis toksin *Cyt* belum diketahui secara jelas. Namun beberapa penelitian terbaru melaporkan bahwa toksin *Cry* dan toksin *Cyt* dapat bekerja sinergis maupun antagonis, tergantung dari strain *Bacillus thuringiensis* (Argolo-Filho *et al.*, 2014).

Aktivitas toksin dari kristal protein dapat digunakan untuk beberapa serangga tertentu diantaranya yaitu *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*), *Bacillus thuringiensis kurstaki*, *Bacillus thuringiensis berliner*, dan *Bacillus thuringiensis alesti* (Dagga *et al.*, 2016; Ben-Dov, 2014). Menurut Suryanto (2017), dalam memberikan derajat toksisitas dan aktivitas insektisidanya, kristal protein perlu diketahui perbedaan masing-masing strain. Seperti yang diketahui bahwa protein *CryI* bersifat toksik terhadap *Lepidoptera*, *CryII* bersifat toksik terhadap *Lepidoptera* dan *Diptera*, sedangkan *CryIII* diketahui mampu membunuh *Coleoptera*, dan *CryIV* toksik terhadap *Diptera*. Karakterisasi dari setiap strain *Bacillus Thuringiensis* membantu mengetahui peranannya di lingkungan dan distribusi gen *Cry*.

2.3. Karakter Enzimatik *Bacillus* sp.

2.3.1. Enzim Protease

Protease adalah enzim yang menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Enzim protease disebut juga sebagai enzim proteolitik atau enzim protease. Protease bersifat esensial dalam metabolisme protein. Enzim ini diisolasi dari berbagai organisme seperti bakteri, tanaman dan hewan. Namun, pada umumnya protease dari bakteri menjadi sumber paling banyak dibandingkan dari tumbuhan maupun hewan (Baehaki, 2011; Kurnia, 2010; Mahajan and Badgujar, 2010).

Secara umum, aktivitas protease berdasarkan pH optimum diklasifikasikan menjadi 3 yaitu; (a) protease asam, aktif pada kisaran pH 2-3,5 (b) protease netral, aktif pada kisaran pH 6,5-7,5 (c) protease alkali, aktif pada kisaran pH 7,5-10,5 (Susanti dan Fibriana, 2017). Menurut Karigar and Rao (2011), berdasarkan letak pemutusan ikatan peptida, enzim protease dibedakan menjadi dua yaitu endopeptidase dan eksopeptidase. Endopeptidase merupakan enzim protease yang bekerja pada daerah bagian dalam rantai protein. Eksopeptidase merupakan enzim protease yang bekerja pada daerah luar dekat dengan posisi amino.

2.3.2. Enzim Kitinase

Kitinase adalah enzim yang mendegradasi kitin menjadi N-asetilglukosamin. Degradasi kitin dapat dilakukan oleh organisme kitinolitik dengan melibatkan enzim kitinase. Beberapa organisme kitinolitik diantaranya adalah kelompok bakteri (Muharni, 2010). Produksi kitinase dari mikroorganisme jauh lebih baik dibandingkan dari sumber lainnya karena lebih mudah dalam perkembangbiakannya dengan waktu relatif singkat sehingga produksi enzim dalam merombak substrat akan semakin banyak (Haedar dkk., 2017). Beberapa peranan penting enzim kitinase dalam kehidupan yaitu sebagai pengendali hama dan penyakit pada tanaman, bidang industri makanan, biokontrol larva nyamuk, preparasi protoplas, produksi sel tunggal dan bioteknologi dalam produksi kitooligosakarida dan N-asetilglukosamina (Wulandari, 2009).

Bakteri kitinolitik merupakan mikroba penghasil enzim kitinase yang dapat menguraikan kitin menjadi monomer β -1,4-N-asetil-glukosamin (Ferniah, 2011). N-asetilglukosamina (GlcNAc) merupakan monomer dari kitin yang memiliki rumus molekul $C_6H_{15}NO_6$ berbentuk kristal, berwarna putih, dan bersifat larut dalam air (Wulandari, 2009; Widhyastuti, 2010). Beberapa sumber ditemukannya bakteri kitinolitik yaitu *rizosphere*, *phyllosphere*, tanah ataupun dari lingkungan air (laut, danau, kolam, limbah udang). Bakteri kitinolitik juga ditemukan pada

lingkungan termofilik seperti sumber air panas maupun geotermal (Herdyastuti, 2009).

2.3.3. Enzim Lipase

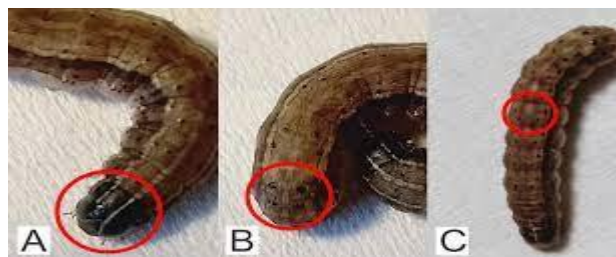
Menurut Mingrui *et al.* (2007), enzim lipase adalah kelompok enzim yang berfungsi menghidrolisis trigliserol untuk menghasilkan asam lemak rantai panjang dan gliserol. Enzim lipase memiliki fungsi fisiologis dalam menghidrolisis lemak dan minyak menjadi asam lemak dan gliserol. Enzim lipase akan memecah ikatan ester pada lipid sehingga menjadi asam lemak dan gliserol (Poedjiadi dan Supriyanti, 2007). Produk asam lemak yang dibebaskan ke dalam media dapat mendeteksi keberadaan enzim lipase melalui metode pelat dalam media agar. Metode pelat menggunakan indikator warna diantaranya *methyl red*, *rhodamine B*, *phenol red*, atau *victoria blue B*. Proses hidrolisis enzim lipase menyebabkan terbentuknya *fluorescent halos* atau wilayah disekitar koloni bakteri (Kulkarni, 2002).

Karakteristik enzim lipase yaitu dapat bekerja pada lapisan antar muka karena terdapat perbedaan kepolaran antara lipase dengan substrat. Lipase bersifat polar, sedangkan substrat bersifat non polar. Substrat dan produk yang dihasilkan dari proses katalisis lipase bersifat tidak dapat larut dalam air, sehingga enzim dapat dengan mudah dipisahkan dari produknya (Yapasan, 2008). Beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim lipase diantaranya sumber dan jenis substrat, pH, serta temperatur. Pada enzim lipase, reaksi hidrolisis didasarkan pada sumber substrat dan larutan penyangga. Mikroorganisme menghasilkan enzim lipase dengan pH optimum 5,6 - 8,5. Pada bakteri, pH optimum dari enzim lipase yang dihasilkan yaitu pada kondisi netral atau mendekati basa sedangkan jamur, enzim lipase yang dihasilkan pada kondisi netral atau mendekati asam (August, 2000).

2.4. *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Ulat grayak (*Spodoptera frugiperda*) adalah ulat yang berasal dari Amerika Serikat dan dilaporkan telah menyerang 80% spesies tanaman seperti jagung, tebu, padi, sorgum, sayuran, kapas, dan rumput (Hannalene *et al.*, 2018; Nonci *et al.*, 2018). *Spodoptera frugiperda* bersifat polifag, inang utamanya berupa tanaman kelompok *Graminae*. Penyerangan yang dilakukan *Spodoptera frugiperda* yaitu pada titik tumbuh tanaman bagian pucuk atau daun muda tanaman. Tidak seperti spesies hama lain, *Spodoptera frugiperda* tidak memiliki kemampuan dormansi pada kondisi ekstrim (FAO and CABI, 2019; Nagoshi *et al.*, 2012).

Spodoptera frugiperda berada dalam satu genus dengan *Spodoptera litura* dan *Spodoptera exempta* sehingga memiliki ciri-ciri yang hampir sama (FAO and CABI, 2019). Telur *Spodoptera frugiperda* berwarna krem, abu-abu atau keputihan yang ditutupi oleh penutup seperti rambut. Larva *Spodoptera frugiperda* memiliki 6 instar dengan ciri khas pada instar terakhir memiliki tanda huruf Y terbalik di bagian kepala. Pada abdomen ruas ke-8 terdapat empat buah titik (*pinacula*) berbentuk bujur sangkar dengan panjang larva 4-5 cm (Prasanna *et al.*, 2018; Pebrianti, 2021; Nonci *et al.*, 2019). Karakter morfologi *Spodoptera frugiperda* disajikan pada Gambar 7.



Gambar 7. Karakter Morfologi *Spodoptera frugiperda*. **Keterangan:** (A) Bentuk huruf Y terbalik pada bagian kepala, (B) 4 titik bujur sangkar pada abdomen ke-delapan (C) 4 titik berbentuk trapesium pada segmen abdomen (Trisyono *et al.*, 2019).

Menurut CABI (2020), *Spodoptera frugiperda* diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
 Filum : Arthropoda
 Kelas : Insecta
 Ordo : Lepidoptera
 Family : Noctuidae
 Genus : *Spodoptera*
 Species : *Spodoptera frugiperda*



Gambar 8. Serangan *Spodoptera frugiperda* pada Tanaman jagung (Ariska dkk., 2021).

Pada Gambar 8 terlihat salah satu kerusakan tanaman jagung akibat serangan *Spodoptera frugiperda*. Ciri-ciri kerusakan yang diakibatkan oleh serangan *Spodoptera frugiperda* yaitu daun tampak transparan karena hilangnya lapisan epidermis, daun tampak berlubang dan terdapat sisa gerakan pada tongkol buah dan batang tanaman jagung. Larva instar 1 akan memakan jaringan daun sehingga lapisan epidermis daun tampak transparan, larva instar 2 dan 3 memakan daun hingga berlubang. Larva instar terakhir menyebabkan kerusakan lebih berat yaitu memakan keseluruhan daun dan menyisakan tulang daun dan batang tanaman (CABI, 2020; Nonci *et al.*, 2019).

2.5. Tanaman Transgenik

Tanaman transgenik adalah tanaman hasil rekayasa genetika yang dibuat dengan cara disisipi satu atau sejumlah gen dari organisme lain, dengan tujuan untuk memperoleh sifat baru yang unggul dan diinginkan, misalnya tanaman yang resisten terhadap cekaman kekeringan, resisten terhadap hama, maupun resisten terhadap herbisida. Produk teknologi DNA dikenal dengan Produk Rekayasa genetika (PRG). Teknologi rekayasa genetik merupakan teknologi yang digunakan untuk perbaikan sifat tanaman melalui modifikasi genetik, dengan tujuan mendapatkan tanaman yang mempunyai sifat baru dan unggul. Teknologi DNA mengembangkan dan memanfaatkan teknik isolasi dan transfer gen dari sifat yang diinginkan ke tanaman transgenik. Melalui teknologi DNA dapat dihasilkan tanaman transgenik yang memiliki sifat baru, misalnya ketahanan terhadap serangga, hama, herbisida, atau cekaman abiotik (Susilo, 2019).

Salah satu contoh tanaman transgenik adalah jagung Bt yang tahan terhadap hama. Gen yang digunakan berasal dari *Bacillus thuringiensis* yang memiliki toksisitas terhadap serangga Ordo Diptera, Lepidoptera, dan Coleoptera disisipkan ke dalam tanaman jagung sehingga resipien (tanaman jagung) mewarisi sifat toksik bagi hama. Resistensi tanaman terhadap serangga hama disebabkan oleh introduksi gen *Cry* yang mengkode delta-endotoksin. Toksin akan melekat (*binding*) pada sel reseptor di saluran pencernaan serangga kemudian mengacaukan aliran ion, yang menyebabkan saluran pencernaan tidak berfungsi sehingga serangga mati (Hofte and Whiteley 1989).

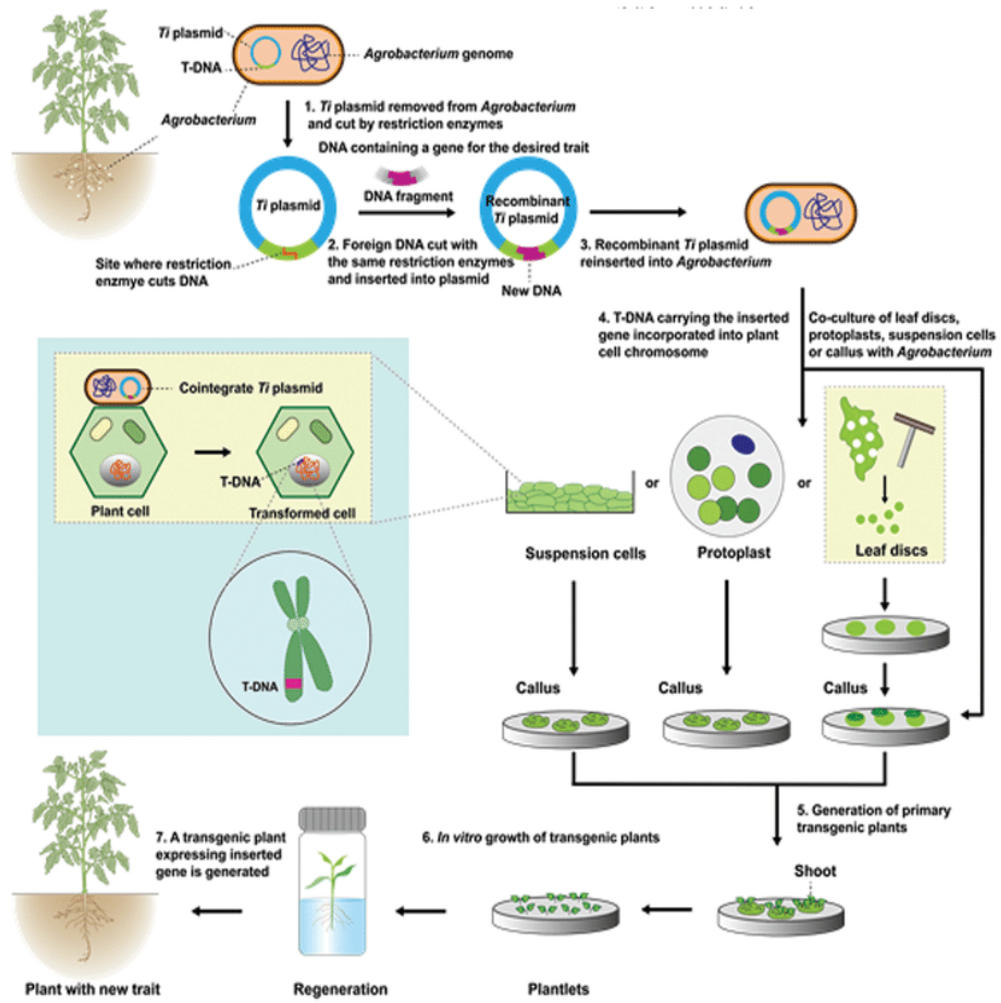
Menurut Dwiyani dkk. (2016) metode transfer gen dapat dilakukan melalui beberapa cara diantaranya sebagai berikut:

1. *Agrobacterium-mediated transformation* (transformasi dengan *Agrobacterium*)
2. *Microprojectile bombardment* (penembakan menggunakan peluru mikro)
3. *Electroporation* (elektroforasi)
4. *Silicon carbide-mediated transformation* (transformasi dengan media karbid silikon)

Berdasarkan berbagai metode transfer gen, metode menggunakan *Agrobacterium* paling sering digunakan karena memiliki beberapa keunggulan diantaranya menghasilkan tanaman transgenik dengan biaya yang lebih murah dan mudah dengan menggunakan peralatan laboratorium sederhana serta transgen yang terekspresi lebih besar. Namun, efisiensi menggunakan *Agrobacterium* tergantung dari strain yang digunakan karena akan berakibat berbedanya tipe kromosom dan tipe Ti-plasmid (Utomo, 2004).

Menurut Dwiyani dkk. (2016), teknologi transfer gen oleh *Agrobacterium tumefaciens* dapat dirangkum sebagai berikut (Diilustrasikan pada Gambar 9):

1. *Agrobacterium tumefaciens* memiliki T-DNA yang di dalamnya terdapat gen-gen pengkode hormon auksin dan sitokinin yang terekspresi kedalam tanaman sehingga menyebabkan tumor, gen lainnya yaitu gen sintesis opine sebagai sumber nutrisi untuk keberlangsungan hidup *Agrobacterium tumefaciens*.
2. Menurut Zupan and Zambryski (1955) dan Opabode (2006), perlu dilakukan modifikasi plasmid dengan cara menghilangkan gen sintesis hormon auksin dan sitokinin agar tidak terbentuk tumor, gen sintesis opine juga perlu dihilangkan karena akan mengganggu pertumbuhan sel tanaman akibat terpakainya bahan fotosintat untuk sintesis opine, memperkecil ukuran plasmid dengan membuang segmen DNA yang tidak diperlukan, Ori (*Origin of replication*) pada *E.coli* harus ditambahkan agar mendapatkan plasmid dengan salinan yang banyak, pada T-DNA kemudian disisipi konstruksi gen yang diinginkan
3. Setelah terbentuk plasmid modifikasi yang sudah membawa *gene of interest*, selanjutnya ditransformasikan ke dalam *Agrobacterium tumefaciens* kembali dan digunakan untuk transfer gen ke genom tanaman
4. T-DNA yang telah mengandung *gene of interest* akan terekspresi dan menghasilkan tanaman dengan karakter yang diinginkan.



Gambar 9. Metode Transfer Gen Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* (Yan *et al.*, 2022).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Waktu penelitian dimulai pada bulan November 2021 – Maret 2022.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah tabung reaksi, cawan petri, labu erlenmeyer, termometer, *beaker glass*, *object glass*, *cover glass*, botol semprot, gelas ukur, ose bulat, ose jarum, bunsen, *vortex mixer*, *Laminar Air Flow* (LAF), *autoclave*, *waterbath*, *hot plate*, *magnetic stirrer*, *colony counter*, *commassie brilliant blue microtip*, *micropipet*, *pH tester*, mikroskop, pipet tetes, pipet volumetri, bulb, pinset, rak tabung reaksi, spatula, necara digital, oven, inkubator, gunting, sarung tangan, masker.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat *Bacillus* sp. koleksi Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Lampung yang diisolais dari tanah Kebun Raya Liwa, aquades, NaCl, alkohol 70%, *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), *olive oil*, *skim milk*, cangkang udang, HCl, NaOH, *plastic wrap*, , methanol, asam asetat, cat Gram (larutan *crystal violet*, larutan *lugol iodine*, alkohol asam dan *safranin*), cat spora (larutan

safranin dan *malachet green*), Hidrogen Peroksida (H₂O₂) 3%, KOH 3%, *phenol red*, sukrosa, laktosa, glukosa, KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, *yeast extract*, agar-agar, pepton, *methyl red*, Tween-80, CaCl₂.2H₂O, Mc Farland, kapas, tisu, kain kasa, benang tali.

3.3. Metode

Penelitian ini bersifat deskriptif kualitatif. Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif yang meliputi karakteristik makroskopis, mikroskopis, identifikasi secara fisiologis maupun biokimia, pengukuran aktivitas enzimatik, serta uji bioassay terhadap larva *Spodoptera frugiperda*.

Penelitian ini menggunakan 10 isolat *Bacillus* sp. koleksi Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Lampung yang diisolasi dari Tanah Kebun Raya Liwa. Kesepuluh isolat tersebut diisolasi dari jenis tanah yang berbeda, diantaranya yaitu tanah serasah (kode isolat: TSR 5 dan TSR 6), tanah biasa *araceae* (kode isolat: TBA 4 dan TBA 7), tanah miring *araceae* (kode isolat: TMA 26 dan TMA 13), tanah biopori (kode isolat: BP 14 dan BP 16), dan tanah biasa (TB 5 dan TB 7). Kesepuluh isolat *Bacillus* sp. diseleksi melalui pengecatan kristal protein menggunakan *coomassie brilliant blue* sehingga didapatkan isolat yang memiliki kemampuan dalam membentuk kristal protein. Isolat yang memiliki kemampuan dalam membentuk kristal protein lebih berpotensi sebagai agen biokontrol sehingga akan dilakukan beberapa uji lanjut. Isolat yang terpilih kemudian dikarakterisasi secara makroskopik dan mikroskopik melalui pengecatan Gram dan pengecatan spora. Untuk mengetahui karakter fisiologi dan biokimia isolat, maka perlu dilakukan beberapa uji seperti uji katalase, uji motilitas, uji enzimatik (protease, kitinase dan lipase) serta uji fermentasi karbohidrat.

Kemampuan enzimatik ditentukan berdasarkan perbandingan luas total dan luas koloni bakteri sehingga didapatkan nilai rata-rata indeks enzimatik. Isolat *Bacillus* sp. diketahui potensinya sebagai agen biokontrol terhadap serangga melalui uji bioassay. Pada uji bioassay ini menggunakan larva *Spodoptera frugiperda* instar 3 dengan teknik *food contamination*. Kubis yang digunakan sebagai pakan larva disemprot secara merata dengan suspensi *Bacillus thuringiensis* konsentrasi 3×10^8 sel/ml. Waktu kematian larva uji diamati selama 6 hari.

3.4. Pelaksanaan

3.4.1. Peremajaan *Bacillus* sp.

Isolat *Bacillus* sp. yang diisolasi dari tanah Kebun Raya Liwa diinokulasikan pada medium *Nutrient Agar* (NA), kemudian dinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Selanjutnya, dilakukan pengamatan secara makroskopis meliputi bentuk koloni, tepian, warna, dan elevasi.

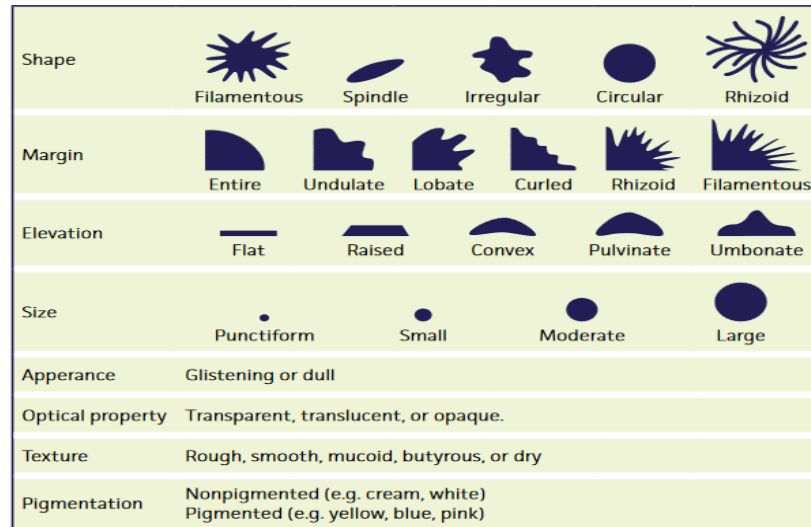
3.4.2. Pengamatan Morfologi Kristal Protein

Pengamatan morfologi kristal protein didasarkan pada metode Fadel *et al* (1988). Komposisi larutan *commasie brilliant blue* sebagai berikut: 0,1% *commasie brilliant blue*, 30% methanol, dan 5% asam asetat. Pewarnaan kristal protein diawali dengan pengambilan satu ose isolat *Bacillus* sp. berumur 72 jam yang diinokulasikan pada *object glass* steril. Selanjutnya preparat difiksasi dengan melewatkannya pada api bunsen. Setelah itu, dibubuhkan pewarna *commasie brilliant blue* dan

didiamkan selama 3 menit. Kemudian objek dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Dilakukan pengamatan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Kristal protein akan terwarnai biru karena mengikat zat warna *commasie brilliant blue* sedangkan spora tidak terwarnai karena tidak dapat mengikat warna *commasie brilliant blue* (Siallagan dkk., 2020; Ervina, 2020).

3.4.3. Karakter Morfologi *Bacillus* sp.

Bakteri diidentifikasi dan dikarakterisasi secara bertahap melalui beberapa uji berdasarkan buku *Bergey's Manual and Systematic of Bacteriology*. Identifikasi bakteri dilakukan secara makroskopik dan mikroskopik. Pengamatan karakter morfologi secara makroskopik dilakukan dengan mengamati pertumbuhan koloni setelah diinkubasi selama 24 jam. Pengamatan morfologi meliputi bentuk koloni, struktur koloni, bentuk sel, ukuran sel dan pewarnaan bakteri (Cappuccino and Sherman, 1987) (Gambar 10). Koloni bakteri yang diduga menunjukkan ciri-ciri morfologi *Bacillus* sp., yaitu memiliki bentuk koloni yang beragam dengan bentuk bulat hingga tak beraturan (Bergey and Boone 2009). Sedangkan warna koloni *Bacillus* sp. menurut Corbin (2004) yaitu berwarna putih hingga krem keputihan. Pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dilakukan melalui pengecatan Gram, pengecatan endospora dan pewarnaan kristal protein. Kristal protein diamati melalui pewarnaan dengan *commasie brilliant blue* (Siallagan dkk., 2020). Panduan pengamatan koloni bakteri secara makroskopik disajikan pada Gambar 10.



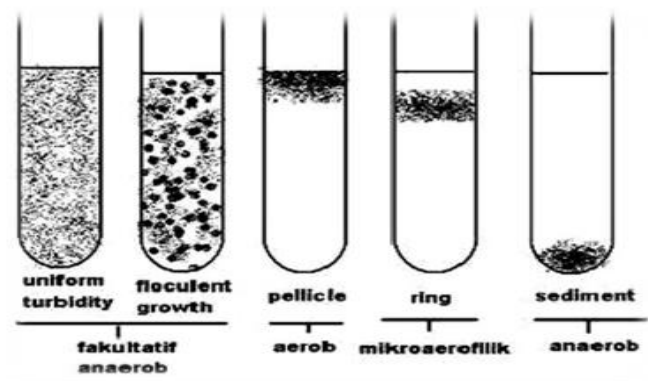
Gambar 10. Morfologi Koloni Bakteri (American Type Culture Collection, 2015).

3.4.4. Uji Fisiologi

3.4.4.1. Uji Kebutuhan Oksigen (O₂)

Isolat bakteri diambil sebanyak satu ose, kemudian diinokulasikan pada media *Nutrient Broth* (NB). Diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang (Panjaitan dkk., 2020).

Dilakukan pengamatan sesuai panduan gambar 11 berikut:



Gambar 11. Pola Pertumbuhan Bakteri Berdasarkan Kebutuhan O₂ (Nurmayasari, 2010).

3.4.4.2. Uji Katalase

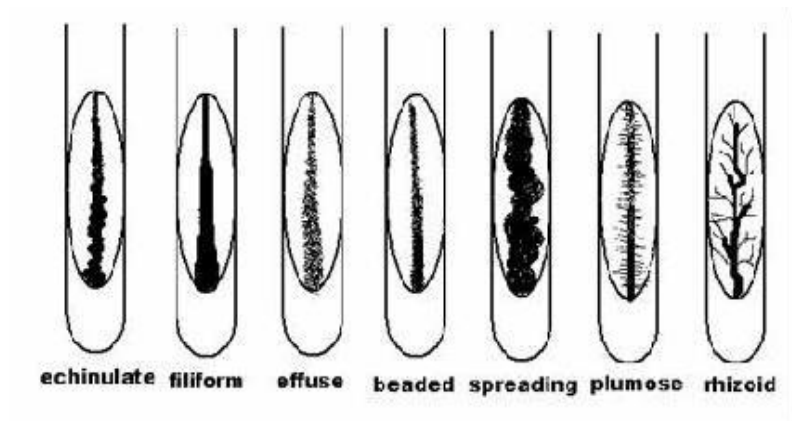
Pada uji katalase digunakan larutan Hidrogen Peroksida (H₂O₂) 3%. Langkah pertama yaitu membersihkan *object glass* dengan alkohol 70%. Kemudian ditetesi 2-3 tetes larutan Hidrogen Peroksida (H₂O₂) 3% dan digoreskan satu ose isolat bakteri di atasnya. Kemudian diamati hasilnya. Jika terlihat adanya gelembung O₂ di atas *object glass* maka telah terjadi reduksi H₂O₂. Uji ini juga dapat menentukan keberadaan bakteri aerob dikarenakan munculnya gelembung oksigen saat terjadi reaksi (Puspita dkk., 2017; Rostinawati dan Lestari, 2017).

Uji katalase berfungsi untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memproduksi enzim katalase. Hasil uji katalase ditandai dengan adanya gelembung udara setelah ditetesi larutan H₂O₂ (katalase +). Gelembung tersebut merupakan hasil pemecahan H₂O₂ oleh enzim katalase dari bakteri (Suryani, 2010).

3.4.4.3. Uji Motilitas

Pada uji ini digunakan media *Nutrient Agar* (NA) semi padat. Metode yang digunakan yaitu dengan cara menususkkan isolat *Bacillus* sp. dengan ose runcing ke dalam tabung reaksi yang berisi media. Kemudian, diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang.

Uji motilitas digunakan untuk mengetahui pergerakan bakteri. Hasil uji motilitas negatif (-) ditandai dengan bekas tusukan inokulasi yang tidak menunjukkan warna putih seperti bentuk akar menyebar. Hasil uji motilitas positif (+) ditandai dengan bekas tusukan inokulasi berwarna putih dengan bentuk akar menyebar, sehingga dapat diartikan bahwa bakteri tersebut memiliki flagella sebagai alat pergerakannya (Pakpahan dkk., 2013). Isolat yang mempunyai hasil positif uji motilitas ditandai dengan adanya penyebaran isolat pada media agar tegak (Waluyo, 2008). Persebaran dan bentuk garis motil dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Tipe Pertumbuhan Bakteri pada Medium Agar Tegak (Nurmayasari, 2010).

3.4.5. Uji Biokimia

Uji biokimia yang dilakukan melalui uji fermentasi karbohidrat menggunakan 3 jenis sumber karbohidrat yaitu glukosa, sukrosa dan laktosa. Setiap bakteri memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam menggunakan karbohidrat untuk proses metabolisme. Uji fermentasi karbohidrat akan menentukan sifat mikroba, media yang digunakan serta faktor lingkungan seperti suhu dan pH. Beberapa karbohidrat yang dipakai yaitu glukosa, sukrosa, dan laktosa. Media yang digunakan yaitu *Phenol Red Broth Base-Glucose*, *Phenol Red Broth Base-Lactose* dan *Phenol Red Broth Base-Sucrose*. Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam media yang telah dimasukkan tabung durham dan diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam (Haryani dkk., 2012).

Uji fermentasi karbohidrat bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasi karbohidrat. Reaksi positif pada uji fermentasi karbohidrat menggunakan jenis gula glukosa, sukrosa, dan laktosa ditandai dengan adanya perubahan warna medium dari merah menjadi kuning. Uji positif lainnya yaitu terdapat gelembung pada tabung durham (Haryani dkk., 2012).

3.4.6. Uji Enzimatik

3.4.6.1. Enzim Protease

Uji aktivitas enzim protease diidentifikasi melalui pengukuran zona jernih yang terbentuk di sekitar koloni. Uji enzim protease dilakukan dengan menginokulasikan isolat *Bacillus* yang berumur 24 jam pada media *Nutrient Agar* (NA) dengan

tambahan susu skim 1%. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Hasil uji positif ditunjukkan dengan adanya zona jernih di sekitar koloni bakteri pada permukaan media (Yuniati dkk., 2015).

3.4.6.2. Enzim Kitinase

Uji enzim kitinase menggunakan media kitin agar. Satu ose isolat *Bacillus* diinokulasikan dengan metode titik pada media kitin agar kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 4 hari. Hasil uji positif ditandai dengan adanya zona jernih di sekitar koloni (Dewi, 2008).

Pembuatan Koloidal Kitin

Pembuatan koloidal kitin menurut Syahfitri (2017) yaitu diawali dengan melarutkan 5 gram kitin ke dalam 80 mL HCl pekat kemudian diinkubasi pada suhu 4⁰C selama 24 jam. Selanjutnya, larutan difiltrasi menggunakan kain nilon sehingga diperoleh filtrat. Kemudian, ditambahkan 40 mL aquades dingin pada filtrat dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. pH larutan diatur hingga 7 (netral) dengan penambahan NaOH 12 N. Kemudian larutan disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 7500 rpm. Supernathan yang dihasilkan dibuang, sedangkan endapan ditambahkan aquades dingin dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Kemudian disentrifugasi kembali selama 15 menit dengan kecepatan 7500 rpm. Perolehan endapan pada proses ini merupakan koloidal kitin yang siap digunakan.

Pembuatan Agar Kitin

Media agar kitin dibuat dengan melarutkan 5 gram koloidal kitin dengan 10 mL aquades. Kemudian ditambahkan KH_2PO_4 0,02%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1%; *yeast extract* 0,1 % dan agar-agar 1,5%. pH media yang digunakan adalah 7 (netral). Semua bahan dihomogenkan sampai mendidih dan disterilisasi selama 15-20 menit menggunakan *autoclave* (Cahyani, 2013).

3.4.6.3. Enzim Lipase

Aktivitas lipolitik diuji menggunakan media selektif lipase dengan komposisi bahan per liter yaitu *olive oil* steril 5%, *Tween-80* 2,5%, NaCl 5 gram, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 gram, *methyl red* 0,01%, pepton 10 gram dan *Nutrient Agar* (NA) (Bestari dan Suharjono, 2016). Isolat *Bacillus* yang berumur 24 jam diinokulasi pada media selektif lipase menggunakan metode titik. Kemudian diinkubasi dengan posisi cawan terbalik pada suhu ruang selama 24-48 jam. Dilakukan pengamatan dan pengukuran zona hidrolisis (zona jernih) di sekitar koloni (Ervina dkk., 2020).

3.4.6.4. Perhitungan Nilai Indeks Enzimatik

Rumus perhitungan indeks enzimatik (IE) berdasarkan Nurdin dkk. (2015) dan dimodifikasi oleh Ekowati, C.N. (2019) adalah sebagai berikut :

$$IE = \frac{\text{Luas total (koloni+ zona jernih)} - \text{Luas koloni}}{\text{Luas koloni}}$$

Keterangan:

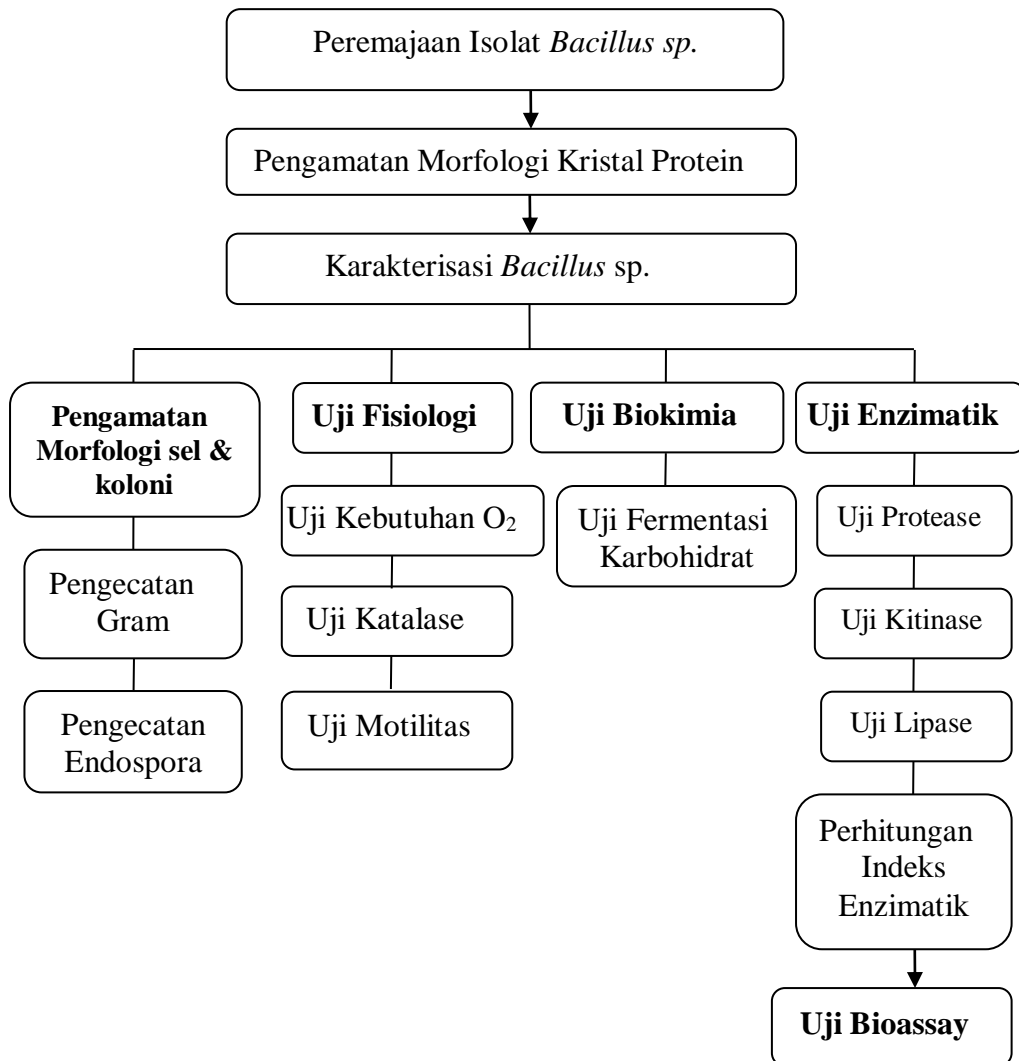
IE : Indeks enzimatik

3.4.7. Uji Bioassay pada Hewan Model Larva *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Pada uji bioassay ini digunakan isolat *Bacillus* sp. yang telah dikarakterisasi sebelumnya. Hewan uji yang digunakan yaitu larva *Spodoptera frugiperda* instar 3. Jumlah keseluruhan larva yang digunakan yaitu sebanyak 24 ekor (3 larva sebagai kontrol negatif) dengan 3 kali ulangan. Larva *Spodoptera frugiperda* dimasukkan ke dalam wadah dan diberi pakan daun kubis yang sudah diolesi suspensi isolat *Bacillus* sp. dengan konsentrasi 3×10^8 sel/ml. Konsentrasi tersebut diperoleh dengan penyetaraan menggunakan larutan Mc Farland 1 sebagai pembanding kekeruhan biakan bakteri dalam medium cair. Kemudian wadah ditutup dan diberi lubang udara secukupnya. Waktu kematian larva diamati selama 6 hari (Polanczyk *et al.*, 2000).

3.5. Diagram Alir Penelitian

Tahapan penelitian ditunjukkan pada diagram alir berikut:



Gambar 13. Diagram Alir Penelitian

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. *Bacillus* sp. dengan kode TMA 26, TB 5, TBA 7, TBA 4, TSR 6, dan BP 14 memiliki kemiripan karakteristik yang mengacu pada *Bacillus thuringiensis*, dengan ciri-ciri sebagai berikut: bentuk koloni *circular* dan *irregular*, tepi koloni *undulate* dan *entire*, berwarna putih hingga krem kekuningan, elevasi *raised* dan *flat*; berbentuk *bacil*, sifat Gram positif, berspora, dan memiliki kemampuan dalam membentuk kristal protein, positif terhadap uji katalase dan motilitas serta memiliki sifat aerob dan aerob fakultatif; memiliki kemampuan memfermentasi glukosa dan sukrosa, namun tidak dapat memfermentasi laktosa. Sedangkan isolat *Bacillus* sp. kode TB 7 memiliki kemiripan yang mengacu pada *Lysinibacillus sphaericus*, dengan ciri-ciri sebagai berikut: bentuk koloni *circular*, tepi koloni *entire*, berwarna putih dengan elevasi *flat*; berbentuk *bacil*, sifat Gram positif, memiliki endospora yang terletak terminal dan membengkak, memiliki kemampuan dalam membentuk kristal protein, positif terhadap uji katalase dan motilitas serta memiliki sifat aerob fakultatif; tidak memiliki kemampuan untuk memfermentasi beberapa jenis gula termasuk glukosa, sukrosa, dan laktosa.
2. *Bacillus* sp. berpotensi sebagai agen biokontrol terhadap serangga. Hal tersebut dibuktikan dengan kemampuannya dalam membunuh

Spodoptera frugiperda dengan rata-rata waktu kematian pada hari ke-3 dan ke-4 setelah aplikasi.

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian ini, dalam meningkatkan kualitas saat identifikasi secara mikroskopik terutama dalam mengamati kristal protein perlu menggunakan mikroskop SEM (*Scanning Electron Microscopy*) agar didapatkan hasil yang lebih jelas. Isolat *Bacillus* sp. yang memiliki kemiripan karakteristik dengan *Bacillus thuringiensis* dan *Lysinibacillus sphaericus* perlu dikarakterisasi melalui uji lanjut secara biomolekuler. Selain itu, kajian mengenai toksisitas *Bacillus* sp. terhadap *Spodoptera frugiperda* juga perlu ditingkatkan agar memperoleh daya bunuh dengan waktu yang lebih cepat.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Addiniyah, N. R. 2019. *Tingkat toksisitas Bacillus thuringiensis koleksi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit (B2P2VRP) Salatiga dan Isolat Surabaya terhadap Berbagai Stadium Larva Aedes aegypti* .(Disertasi). UIN Sunan Ampel Surabaya. Surabaya.
- Alongi, D. M. 1994. The Role of Bacteria in Nutrient Recycling in Tropical Mangrove and Other Coastal Benthic Ecosystems. *Hydrobiologia*. 285(1-3) :19–32.
- Alou, M. T., Rathored, J., Khelaifia, S., Michelle, C., Brah, S., Diallo, B. A. 2015. *Bacillus rubiinfantis* sp. nov. Strain mt2T, a New Bacterial Species Isolated from Human Gut. *New Microbes New Infect.* 8 : 51–60.
- American Type Culture Collection (ATCC). 2015. *Introduction to Microbiology*. University Blvd. Manassas.
- Amrullah, S. H. 2019. Pengendalian Hayati (*Biocontrol*) : Pemanfaatan Serangga Predator sebagai Musuh Alami untuk Serangga Hama: Sebuah Review. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*. 5(1) : 87-90.
- Argolo-Filho, R. C., Costa, R. L., Pinheiro, D. H., Corrêa, F. M., Valicente, F. H., Pomella, A. W. V., and Loguercio, L. L. 2014. Requirement of Simultaneous Assessment of Crystal-and Supernatant-Related Entomotoxic Activities of *Bacillus Thuringiensis* Strains for Biocontrol-Product Development. *Toxins*. 6(5) : 1598-1614.
- Ariska, N., Triagtin, N., Fadillah, R. N., Amelia, R. P., Margaretha, S., Pratiwi, W., dan Hamidson, H. 2021. Tingkat Kerusakan dan Kerugian Serangan *Spodoptera frugiperda* pada Jagung. *Seminar Nasional Lahan Suboptimal*. 9: 348-354).

- August, E. G. 2000. *Kajian Lipase Amobil dari Aspergillus niger pada Pembuatan MAG yang Bersifat Antibakteri dari Minyak Kelapa*. (Tesis). Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Baehaki, A. dan Budiman, A. 2011. Isolasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Tanah Rawa Indralaya, Sumatera Selatan. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 22(1): 37-42.
- Bahagiawati, A. 2002. Penggunaan *Bacillus thuringiensis* sebagai Bioinsektisida. *Bul. Agrobio*. 5(1): 21-28.
- Ben-Dov, E. 2014. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its Dipteran-Specific Toxins. *Journal Toxins*. 6(4): 1222-1243.
- Bergey, D. H. and Boone, D. R. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 3, 2nd ed.* Springer Science Business Media. New York.
- Beskrovnyaya, P., Sexton, D. L., Golmohammadzadeh, M., Hashimi, A. and Tocheva E. I. 2021. Structural, Metabolic and Evolutionary Comparison of Bacterial Endospore and Exospore Formation. *Frontiers in Microbiology*. 12 : 1-17.
- Bestari, N. C., dan Suharjono, S. 2016. Uji Kualitatif dan Kuantitatif Isolat Bakteri Lipolitik dari Limbah Cair Pabrik Pengolahan Ikan Kecamatan Muncar, Banyuwangi. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*. 3(3) : 151-155.
- Boleng, D. T. 2015. *Bakteriologi : konsep-konsep dasar*. UMM Press, Malang.
- Brady and Foth, D.H. 1984. *Fundamental of Soils Science*. John wiley & sons, inc. Singapore.
- Cahyani, Lutfiya. 2013. *Pemanfaatan Tepung Cangkang Udang sebagai Media Produksi Kitinase Oleh Bakteri Kitinolitik Isolat 26*. (Skripsi). Universitas Jember. Jawa Timur.
- Campanini, E. B., Davolos, C. C., Alves, E. C. C., and Lemos, M. V. F. 2012. Isolation of *Bacillus thuringiensis* Strains that Contain Dipteran-Specific

- Cry Genes from Ilha Bela (São Paulo, Brazil) Soil Samples. *Brazilian Journal of Biology*. 72: 243-247.
- Cappuccino, J. G. and Sherman, N. 1983. *Microbiology: a Laboratory Manual*. Adison-Wesley Publishing company. California.
- Cappuccino, J. G. and Sherman, N. 1987. *Microbiology: A Laboratory Manual*. The Benjamin/Cummings Publishing Company. Inc. California.
- Chantarasiri, A. and Boontanom, P. 2017. Decolorization of Synthetic Dyes by Ligninolytic *Lysinibacillus sphaericus* JD1103 Isolated from Thai Wetland Ecosystems. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*. 10(4): 814-819.
- Cavados, C. D. F. G., Pires, E. S., Chaves, J. Q., Alvarez, D. N., Gil, H. B., de Oliveira, I. B. R., and Cunha, A. D. B. P. V. 2017. Isolation and Genetic Characterization of *Lysinibacillus Sphaericus* Strains Found in Mosquito Larvae (Diptera: Culicidae). *Research and Reports in Tropical Medicine*. 8 : 17.
- Choi, Y. W, Hodgkiss, I. J., and Hyde, K. D. 2005. Enzyme Production by Endophyte of *Brucea javanica*. *Jurnal of Agriculture Teknologi*. 1: 55-66.
- Chu, W. H. 2007. Optimization of Extracellular Alkaline Protease Production from Species of *Bacillus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 34(3) : 241-245.
- Corbin, B. D. 2004. Identification and Characterization *Bacillus thuringiensis*. *Journal Bacteriol*. 186: 7736–7744.
- Cui, Y., Wang, M., Zheng, Y., Miao, K., and Qu, X. 2021. The Carbohydrate Metabolism of *Lactiplantibacillus plantarum*. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(24) : 13452.
- Dagga, A., Aziz, A. M., Elmanama, A. A., Al-Sharif, M., and El Hindi, M. (2016). Isolation and Molecular Characterization of Cry Gene for *Bacillus thuringiensis* Isolated from Soil of Gaza Strip. *Internatioanl Journal Curr. Microbiol. App. Sci*. 5(4) : 659-666.

- Dewi, I. M. 2008. *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Kitinase Termofilik Kasar dari Sumber Air Panas Tinggi Raja, Simalungun, Sumatera Utara*. (Tesis). Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Dix, N. J. and Webster, J. 1995. *Fungal Ecology*. Chapman and Hall. London. pp. 85-96.
- Djereng, D. K., Kawuri, R., dan Ramona, Y. 2017. Potensi *Bacillus* sp. B3 sebagai agen biokontrol penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *Ralstonia* sp. Pada tanaman cabai (*Capsicum annuum* L.). *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*. 4(2): 237-246.
- Dwiyani, R., Yuswanti, H., Darmawati, I. A. P., dan Mayadewi, N. N. A. 2016. *Transformasi Genetik pada Tanaman Melalui Agrobacterium tumefaciens*. Swasta Nulus. Bali.
- El-Bendary, M. A. 2006. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* Biopesticides Production. *Journal of basic microbiology*. 46(2): 158-170.
- Errington, J. 2003. Regulation of Endospore Formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*. 1(2) : 117-126.
- Ervina, E., Sumardi, S., Ekowati, C. N., dan Rosa, E. 2020. Lipolytic-screening of *Bacillus* genera as Biocontrol Candidate in Coffee Plantation. *Jurnal Ilmiah Biologi Eksperimen dan Keanekaragaman Hayati*. 7(1) : 31-34.
- Fadel, A., Sharif, N., and Alaeddinoglu, G. 1988. Arapid and Simple Method for Staining of the Crystal Protein of *Bacillus thuringiensis*. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. 3: 227-229.
- FAO and CABI. 2019. Community - Based Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) Monitoring, Early Warning and Management. *Training of Trainers Manual, First Edition*. 112 p.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Fauziah dan Herdyastuti, N. 2013. Uji Aktivitas Bakteri Kitinolitik dari Tambak Udang di Lamongan dan Sidoarjo. *Journal of Chemistry*. 2(1): 36-39.

- Feliatra. 2001. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Heterotrof yang Terdapat pada Daun Mangrove (*Avicenna* sp. dan *Sonneratia* sp.) dari Kawasan Stasiun Kelautan Dumai. *Jurnal Natur Indonesia*. 3(2) : 104-112.
- Feliatra, Efendi, I., dan Suryadi, E. 2004. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik dari Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscogatus*) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan. *Jurnal Natur Indonesia*. 6(2) : 75-80.
- Ferniah, R. S., Pujiyanto, S., Purwantisari, S., dan Supriyadi. 2011. Interaksi Kapang Patogen *Fusarium oxysporum* dengan Bakteri Kitinolitik Rizosfer Tanaman Jahe dan Pisang. *Jurnal Natur Indonesia*. 14(1) : 56-59.
- Garcia, L. S. 2010. *Clinical Microbiology Procedures Handbook (Third Edition)*. American Society For Microbiology Press Pendidikan Biologi. 3(2) : 20-25.
- Gazali, A., Ilhamiyah, dan Jaelani, A. 2017. *Bacillus Thuringiensis*. Pustaka Banua. Banjarmasin.
- Graumann, P. 2007. *Bacillus: Cellular and Molecular Biology*. Caister Academic Press.
- Haedar, N., Fahrudin, F., Aryanti, W., dan Natsir, H. 2017. Produksi dan Karakterisasi Enzim Kitinase dari Bakteri Kitinolitik Asal Kerang *Anadara granosa*. *Jurnal Ilmu Alam dan Lingkungan*. 8(1) : 7-13.
- Haliza, W. dan Suhartono, M. T. 2012. Karakteristik kitinase dari mikrobia. *Buletin Teknologi Pascapanenan Pertanian*. (8).
- Hamedo, H. 2016. Identification of *Bacillus thuringiensis* Isolated from Different Sources by Biolog GEN III System and Scanning Electron Microscopy. *Catrina: The International Journal of Environmental Sciences*. 15(1) : 51-57.
- Handayani, I. G. A. K. R. 2017. Relationship Between Energy Consumption in International Market and Indonesia Prices Regulation. *International Journal of Energy Economics and Policy*. 7(5) : 9-15.

- Hannalene, P., Johnnie V. D. B., Noboru, O., and Darren, J. K. 2018. *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm). *J. Pest Geography*.
- Haryani, Y., Chainulfiffah, dan Rustiana. 2012. Fermentasi Karbohidrat Oleh Isolat *Salmonella* spp. dari Jajanan Pinggir Jalan. *Jurnal Indonesian Chemia Acta*. 1(3) : 23-26.
- Hashem, A., Tabassum, B., and Abd Allah, E. F. 2019. *Bacillus subtilis*: A Plant-Growth Promoting Rhizobacterium that Also Impacts Biotic Stress. *Saudi journal of biological sciences*, 26(6) : 1291-1297.
- Hatmanti, A. 2000. Pengenalan *Bacillus* spp. *Jurnal Oseana*. 25(1): 31-41.
- Herdyastuti, N., Raharjo, T. J., Mudasir, dan Majseh, S. 2009. Chitinase and Chitinolytic Microorganism : Isolation, Characterization and Potential. *Indo. J. Chem*. 9(1) : 37-47.
- Hernandez-Santana, A., Gomez-Garzon, C., and Dussan, J. 2022. *Lysinibacillus sphaericus*. *Trends in Microbiology*. 30(7): 609-706.
- Hofte, H. and Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological reviews*. 53(2) : 242-255.
- Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M., and Bulla, L. A. 2010. *Bacillus thuringiensis*: A Genomics and Proteomics Perspective. *Bioengineered Bugs*. 1(1) : 31-50.
- Ibrahim, S. A., El-Kareem, A., and Sara, M. I. 2018. Enzymatic Changes and Toxic Effect of some Aromatic Plant Oils on the Cotton Leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, F. Toxicology & Pest Control*. 10(1): 13-24.
- Indriani, R. dan Pujiastuti, Y. 2020. *Efektivitas Bacillus thuringiensis sebagai Bioinsektisida pada Tanaman Jagung (Zea Mays L.) terhadap Serangan Ulat Grayak (Spodoptera frugiperda)*. (Disertasi). Universitas Sriwijaya. Palembang.

- Irianto, K. 2006. *Mikrobiologi: Menguak Dunia Mikroorganisme Jilid 2*. CV. Yrama Widya. Bandung. 215 hal.
- Jain, D., Sunda, S. D., Sanadhya, S., Nath, D. J., and Khandelwal, S. K. 2017. Molecular Characterization and PCR-Based Screening of Cry Genes from *Bacillus thuringiensis* Strains. *Journal Biotech.* 7(1) : 1–8.
- Jati, W. N., Muwarni, I., dan Zahida, F. 2013. *Isolasi, Purifikasi dan Uji Patogenisitas Isolat Bacillus thuringiensis Berliner Wilayah Daerah Istimewa Yogyakarta terhadap Larva Nyamuk Aedes aegypti linn.* (Laporan Akhir Hasil Penelitian Hibah Fundamental). Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya. Yogyakarta.
- Jati, W.B., Felicia Z., dan Indah, M. 2014. Uji Kemampuan Isolat P75 *Bacillus thuringiensis* Berliner terhadap Daya Bunuh Larva Nyamuk *Aedes aegypti*. *Makalah Seminar Nasional Mikrobiologi.* 105-116.
- Karigar, C.S. and Rao, S.S. 2011. Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. *Enzyme Research.* 10-11.
- Khudra, A. I, 2011. *Isolasi Bakteri Bacillus thuringiensis dari Tanah dan Pengujian Toksisitasnya Terhadap Ulat Grayak (Spodoptera litura).* (Skripsi). Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kotb, E. 2015. Purification And Partial Characterization Of Serine Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus Megaterium* KSK-07 Isolated from Kishk, a Traditional Egyptian Fermented Food. *Appl. Biochem. Microbiol.* 51 : 34–43.
- Kulkarni, N. 2002. *Studies on Lipase Enzyme from Pseudomonas fluorescens NS2W.* (Thesis). University of Pune. India.
- Kurnia, D. R. D. 2010. *Studi Aktivitas Enzim Lipase dari Aspergillus niger sebagai Biokatalis pada Proses Gliserolisis Untuk Menghasilkan Monoasilgliserol.* (Thesis). Universitas Diponegoro. Semarang.
- Li, X., Xu, T., Ma, X., Guo, K., Kai, L., Zhao, Y., Jia X., and Mad, Y. 2008. Optimization of Culture Conditions for Production of Cis- Epoxysuccinic

Acid Hydrolase Using Response Surface Methodology. *Bioresource Technology*. 99: 5391 – 5396.

- Listiyani, N. 2016. *Isolasi dan Uji Aktivitas Enzim Kitinase Bakteri dari Feses Kukang (Nycticebus Javanicus) Asal Garut dan Bogor*. (Skripsi). Universitas Negeri Jakarta. Jakarta.
- Logan, N. A. and De Vos, P. 2009. Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, 174AL. In: De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. and Whitman, W.B., Eds., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition*. Springer. New York. pp. 21-128.
- Mafazah, A. dan Zulaika, E. 2017. Potensi *Bacillus thuringiensis* dari Tanah Perkebunan Batu Malang sebagai Bioinsektisida terhadap Larva *Spodoptera litura* F. *Jurnal Sains dan Seni ITS*. 6(2) : E99-E104.
- Mahajan, R. T., and Badgujar, S. B. 2010. Biological Aspects of Proteolytic Enzymes : A Review. *Journal Of Pharmacy Research*. 3(9) : 2048–2068.
- Mampallil, L. J., Faizal, M. H., and Anith, K. N. 2017. Bacterial Bioagents for Insect Pest Management. *Journal of Entomology Zoology Studies*. 5(6) : 2237-2244.
- Martinez-Zavala, S. A., Barboza-Perez, U. E., Hernandez-Guzman, G., Bideshi, D. K., and Barboza-Corona, J. E. 2020. Chitinases of *Bacillus thuringiensis*: Phylogeny, modular structure, and applied potentials. *Frontiers in microbiology*. 10: 3032.
- Mingrui, Y., Shaowei, Q., and Tianwei T. 2007. Purification and Characterization of Extracellular Lipase Lip2 from *Yarrowia Lipolitica*. *Journal of Process Biochemistry*. 42 : 384 – 391.
- Moazami, N. 2017. *Biological Control*. Institute of Advanced Technology. Iran.
- Muharni, M. 2010. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Kitinase dari Sumber Air Panas Danau Ranau Sumatera Selatan. *Jurnal Penelitian Sains*. 10 : 06-09.

- Muharni, M., dan Widjajanti, H. 2011. Skrining Bakteri Kitinolitik Antagonis Terhadap Pertumbuhan Jamur Akar Putih (*Rigidoporus lignosus*) dari Rizosfir Tanaman Karet. *Jurnal Penelitian Sains*. 14(1) : 50-56.
- Muis, A. 2016. Prospek *Bacillus subtilis* sebagai Agen Pengendali Hayati Patogen Tular Tanah pada Tanaman Jagung. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian*. 35(1) : 37-45.
- Mukamto, M., Ulfa, S., Mahalina, W., Syauqi, A., Istiqfaroh, L., dan Trimulyono, G. 2015. Isolasi dan Karakterisasi *Bacillus* sp. Pelarut Fosfat dari Rhizosfer Tanaman *Leguminosae*. *Sains & Matematika*. 3(2).
- Munawaroh, E., Yuzammi, Saniyatun M. S., Suhendar S. P. 2017. *Buku Koleksi Kebun Raya Liwa, Lampung: Tumbuhan Berpotensi sebagai Tanaman Hias*. LIPI-Press. Bogor. 113 hlm.
- Nagoshi, R. N., Meagher, R. L., and Hay-Roe, M. 2012. Inferring the Annual Migration Patterns of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in the United States from Mitochondrial Haplotypes. *Journal of Ecology and Evolution*. 2: 1458–1467.
- Nair, K., Al-Thani, R., Al-Thani, D., Al-Yafei, F., Ahmed, T., and Jasua, S. 2018. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains from Qatar as Shown by Crystal Morphology, δ -Endotoxins and Cry Gene Content. *Journal Microbiol.* 9:708.
- Nanda, D., Heru, A. D., dan Nur, P. 2018. Eksplorasi, Identifikasi dan Uji Bakteri Antagonis *Bacillus* sp. dari Rizosfer Jagung Terhadap Bakteri Layu Stewart. *Prosiding Seminar Nasional*.
- Nasution, A. F. 2018. *Isolasi dan Uji Toksisitas Isolat Bacillus Thuringiensis Lokal terhadap Larva Nyamuk Aedes Aegypti*. (Thesis). Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Nisa, F. K., Susilo, G., dan Sundari, C. 2018. Sistem Pakar Diagnosis Hama dan Penyakit Tanaman Anggrek Bulan (*Phalaenopsis amabilis*) dengan Metode Bayes. *Jurnal Transformasi*. 14(1) : 14-26.

- Nonci, N., Septian, H. K., Hishar, M., Amran, M., Nuhammad, A. Z., dan Muhammad, A. Q. 2019. *Pengenalan Fall Armyworm (Spodoptera frugiperda J.E.Smith) Hama Baru pada Tanaman Jagung di Indonesia*. Kementan RI. Jakarta.
- Nurdin, G. M., Mubarik, N. S., dan Sudirman, L. I. 2015. Selection of Chitinolytic Bacteria as Biocontrol of *Colletotrichum capsici*. *Malaya Journal Microbiol.* 12(1) : 35-42.
- Nurmayasari, Yusi. 2010. *Modul Analisis Mikrobiologi*. SMK Bina Putera Nusantara. Tasikmalaya.
- Okassov, A., Nersesyan, A., Kitada, S., and Ilin, A. 2015. Parasporins as New Natural Anticancer Agents: A Review. *JBUON.* 20(1) : 5-6.
- Opabode, J. T. 2006. *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Plants: Emerging Factors that Influence Efficiency. *Review of Biotechnol. and Mol. Biol.* 1: 12-20.
- Pakpahan, M., Ekowati, C. N., dan Handayani, K. 2013. Karakterisasi Fisiologi dan Pertumbuhan Isolat Bakteri *Bacillus thuringiensis* dari Tanah Naungan di Lingkungan Universitas Lampung. *Seminar Nasional Sains & Teknologi V*. Hal. 19-20.
- Palma D. L., Munoz L. D., Berry, C., Murillo M. J., and Caballero M. P. 2014. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Journal Toxins.* 6 (12) : 3296-3325.
- Pattuju, S. M., dan Manampiring, A. 2014. Identifikasi Bakteri Resisten Merkuri pada Urine, Feses dan Kalkulus Gigi pada Individu di Kecamatan Malalayang, Manado, Sulawesi Utara. *e-Biomedik.* 2(2) : 532-540.
- Poedjiadi A. dan Supriyanti, F. M. T. 2007. *Dasar-Dasar Biokimia*. Universitas Indonesia. Jakarta. 182 hal.
- Polanczyk, R. A., Silva, R. F. P. D., and Fiuza, L. M. 2000. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* strains against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Brazilian Journal of Microbiology.* 31: 164-166.

- Ponnuswamy, V., M. Kalaiyarasi., and Samuel, G. P. V. 2015. Cow Dung is an Ideal Fermentation Medium for Amylase Production in Solid-state Fermentation by *Bacillus cereus*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 13 : 111–117.
- Prasanna, B. M., Huesing, J. E., Eddy, R., Peschke, V. M. 2018. *Fall Armyworm in Africa: A Guide for Integrated Pest Management, 1st ed.* CIMMYT: Edo Mex. Mexico.
- Pratiwi, R. S., Susanto, T. E., Wardani, Y. A. K., dan Sutrisno, A. 2015. Enzim Kitinase dan Aplikasi di Bidang Industri: Kajian Pustaka. *Jurnal Pangan Agroindustri*. 3(3) : 878-887.
- Pricilia, S., Astuti, W., Marlian, E. 2018. Skrining Bakteri Endofit Penghasil Amilase, Lipase dan Protease dari Daun *Macaranga hullettii* King ex Hook.f. *Jurnal Atomik*. 3(2) : 102-105.
- Purnomo, D. W., Magandhi, M., Kuswanto, F., Risna, R. A., dan Witono, J. R. 2015. Pengembangan Koleksi Tumbuhan Kebun Raya Daerah dalam Kerangka Strategi Konservasi Tumbuhan di Indonesia. *Buletin Kebun Raya*. 18(2), 111-124.
- Puspita, F., Ali, M., dan Pratama, R. 2017. Isolasi dan Karakterisasi Morfologi dan Fisiologi Bakteri *Bacillus* sp. Endofitik dari Tanaman Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Jurnal Agroteknologi Tropika*. 6(2) : 44-49.
- Putri, I. N. 2021. *Pengaruh Lama Inkubasi terhadap Aktivitas Enzim Lipase yang Diproduksi oleh Bakteri Bacillus thuringiensis pada Substrat Ampas Kelapa (Cocos nucifera L.)*. (Disertasi). Universitas Andalas. Padang.
- Rahardianingtyas, E. dan Wianto, Rendro. 2014. Isolasi *Bacillus thuringiensis* dari Berbagai Habitat di Kabupaten dan Kota Magelang dan Patogenitas terhadap Jentik Nyamuk *Aedes aegypti*. *Jurnal Vektora*. 6(1) : 13-18.
- Ray, B. 2004. *Fundamental Food Microbiology*. Third Edition. CRC Press. New York.

- Regis, L., Silva-Filha, M. H., Nielsen-LeRoux, C., and Charles, J. F. 2001. Bacteriological Larvicides of Dipteran Disease Vectors. *Trends in Parasitology*. 17(8): 377-380.
- Reiner, K. 2012. Carbohydrate fermentation protocol. *American Society for Microbiology*. 1-10.
- Reyes, A. T. 2018. Morpho-Biochemical Aided Identification of Bacterial Isolates from Philippine Native Pig. *Adv. Pharmacol. Clin. Trials*. 3(5): 000148.
- Rofiq, A., Harianto, S. P., Iswandaru, D., dan Winarno, G. D. 2021. Guild Pakan Komunitas Burung di Kebun Raya Liwa Kabupaten Lampung Barat. *Jurnal Belantara*. 4(2): 195-206.
- Rori, C. A., Kandou, F. E. F., dan Tangapo, A. M. 2020. Aktivitas Enzim Ekstraseluler dari Bakteri Endofit Tumbuhan Mangrove *Avicennia Marina*. *Jurnal Bios Logos*. 10(2) : 48-55.
- Rostinawati, T., dan Lestari, H. S. 2017. Skrining Bakteri Penghasil Enzim β – Siklodekstrin Transferase (β -CGTase) dari Tanah Jatiningor Glukosil. *Jurnal Farmasi Sains, dan Kesehatan*. 3(2) : 10–17.
- Sahin, B, Gomis-Cebolla, J, Gunes, H and Ferre, J. 2018. Characterization of *Bacillus Thuringiensis* Isolates by Their Insecticidal Activity and Their Production of Cry and Vip3 Proteins. *Plos ONE*. 13(11): e0206813.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., and Christou, P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A Century of Research, Development and Commercial Applications. *Plant Biotechnology Journal*. 9(3) : 283-300.
- Sansinenea, E. 2012. *Bacillus thuringiensis Biotechnology*. Springer Science & Business Media. Springer Netherlands. 392 p.
- Sauka, D. H. and Benintende, G. B. 2017. Diversity and Distribution of Lepidopteran-Specific Toxin Genes in *Bacillus thuringiensis* Strains from Argentina. *Revista Argentina de microbiologia*. 49(3) : 273-281.

- Showket, A. D., Bashir, A. R., and Ajaz, A. K. 2017. Insect Pest Management by Entomopathogenic Fungi. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 5(3) : 1185-1190.
- Siallagan, M. D., Ekowati, C. N., Sumardi, S., dan Rosa, E. 2020. Deteksi Kristal Protein pada Isolat *Bacillus* sp. dengan Pewarnaan *Coomassie Brilliant Blue*. *Biospecies*. 13(2) : 46-49.
- Smith, M. and Selby, S. 2017. *Microbiology for Allied Health Students: Lab Manual. Biological Sciences Open Textbooks*. University System of Georgia. USA, p.16.
- Soeka, Y. S. 2009. Kondisi Optimum Produksi Kitinase dari Aktinomisetes dengan Karakterisasi pH dan Suhu Enzim. *Berkala Penelitian Hayati*. 3C: 57-61.
- Soeka, Y.S dan Sulistiani, S. 2017. Karakterisasi Enzim Protease dari Bakteri *Stenotrophomonas* sp. Asal Gunung Bromo, Jawa Timur. *Jurnal Ilmu-ilmu Hayati*.16(2): 203-211.
- Sopialena, S. 2018. *Pengendalian Hayati dengan Memberdayakan Potensi Mikroba*. Mulawarman University press. Universitas Mulawarman.
- Sudigdoadi, S., Sukandar, H., dan Faridah, L. 2017. Isolasi *Bacillus thuringiensis* Lokal dari Tanah Kota Bandung Berdasarkan Ketinggian. *Majalah Kedokteran Bandung*. 49(2) : 110-114.
- Surachman, A., Handayani, I. G. A. K. R., and Taruno, Y. 2017. Effect of Globalization on Establihmment of Water Resource Law: A Practice in Indonesia. *International Journal of Economic Research*. 14(13) : 1869-0459.
- Suryani, Y., Astuti, B., Oktavia, dan Umniyati, S. 2010. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Limbah Kotoran Ayam Sebagai Agensi Probiotik dan Enzim Kolesterol Reduktase. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*. Hal. 138-147.
- Suryanto, D. 2017. Amplifikasi Gen Cry1 dan Analisis Genom isolate *Bacillus thuringiensis* Lokal. *Journal of Biological Researches*. 15(1) : 1-4.

- Susanti, R. dan Fibriana, F. 2017. *Teknologi enzim*. Penerbit Andi. Yogyakarta.
- Susilo, H. 2019. Analisis Potensi Budidaya Tanaman Transgenik di Indonesia. *Jurnal*. 2(1): 65–74.
- Suyadi, S. 2017. Deforestation in Bukit Barisan Selatan National Park, Sumatra, Indonesia. *Jurnal Biologi Indonesia*. 7(2) : 195 –205.
- Syahfitri, D. 2017. *Potensi Bakteri Kitinolitik Sebagai Biokontrol Colletotrichum capsici*. (Tesis). Institut Pertanian Bogor. Bogor..
- Trisyono, Y. A., Suputa, Aryuwandari, V. E. B, Hartaman, M., and Jumari. 2019. Occurrence of Heavy Infestation by the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*. a New Alien Invasive Pest. in Corn in Lampung Indonesia. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. 23(1): 156–160.
- Utomo, S. D. 2004. Pengaruh Strain *Agrobacterium* terhadap Efisiensi Transformasi Genetik Jagung Genotipe Hibrida Hill. *Jurnal Ilmu Pertanian*. 11(2): 1-10.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., and Whitman, W. B. (Eds.). 2011. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes* (Vol. 3). Springer Science & Business Media. New York.
- Waluyo, L. 2008. *Teknik dan Metode Dasar dalam Mikrobiologi*. Universitas Muhammadiyah Malang Press. Malang.
- Widhyastuti, N. 2010. *Purifikasi N-asetil-D-glukosamin Hasil Sintesa Secara Enzimatis untuk Bahan Obat dan Pangan Fungsional*. LIPI-Press. Bogor.
- Widyawati, A. 2008. *Bacillus* sp. Asal Rizosfer Kedelai yang Berpotensi Sebagai Pemacu Pertumbuhan Tanaman dan Biokontrol Fungi Patogen Akar.(Thesis). Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Wulandari, F. 2009. *Optimasi Produksi N-asetilglukosamina dari Kitin Melalui Fermentasi oleh Aspergillus rugulosus 501*. (Skripsi). Institut Pertanian Bogor. Bogor.

- Xu, C., Wang, B. C., Yu, Z., and Sun, M. 2014. Structural Insights into *Bacillus Thuringiensis* Cry, Cyt And Parasporin Toxins. *Journal Toxins*. 6(9) : 2732-2770.
- Yan, Y., Zhu, X., Yu, Y., Li, C., Zhang, Z., and Wang, F. 2022. Nanotechnology Strategies for Plant Genetic Engineering. *Advanced Materials*. 34(7): 2106945.
- Yapasan, E. 2008. *Partial Purification and Characterization of Lipase Enzyme From A Pseudomonas Strain*. (Thesis). Izmir Institute of Technology. Izmir.
- Yulvizar, C. 2013. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik pada *Rastrelliger* sp. *Biospecies*. 6(2): 1-7.
- Yuniati, R., Nugroho, T. T., dan Puspita, F. 2015. *Uji Aktivitas Enzim Protease dari Isolat Bacillus sp. Galur Lokal Riau*. (Disertasi). Universitas Riau. Riau.
- Zivanovic, L., Todosijevic, L. S., Popović, V., Ikanovic, J., Tatic, M., Avdic, P., and Simic, D. 2018. The Influence of the Soil Type on Total Number of Microorganisms in Ugar and Sown Maize. *International Proceedings of Scientific Agriculture Symposium*. pp. 326-332.
- Zulfiana, D., Krishanti, N. P. R. A., Wikantyo, B., dan Zulfitri, A. 2017. Bakteri Entomopatogen sebagai Agen Biokontrol Terhadap Larva *Spodoptera litura* (F.). *Berita Biologi*. 16(1) : 13-21.
- Zupan, J. R. and Zambryski, P. C. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol*. 107: 1041-1047.