



**FORMULASI KONSORSIUM AGEN HAYATI MYCORRHIZA HELPER
BACTERIA (*Pseudomonas diminuta* dan *Bacillus subtilis*) PADA
MEDIA CAIR LIMBAH TAHU DAN MOLASE**

SKRIPSI

Oleh

Luthfiyatul Hasanah

NIM. 120210103077

Dosen Pembimbing I : Dr. Iis Nur Asyiah, S.P., M.P.
Dosen Pembimbing II : Siti Murdiah S.Pd., M.Pd.

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN BIOLOGI
JURUSAN PENDIDIKAN MIPA
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016**



**FORMULASI KONSORSIUM AGEN HAYATI *MYCORRHIZA HELPER*
BACTERIA (Pseudomonas diminuta dan Bacillus subtilis) PADA
MEDIA CAIR LIMBAH TAHU DAN MOLASE**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Biologi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Pendidikan

Oleh

Luthfiyatul Hasanah

NIM 120210103077

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN BIOLOGI
JURUSAN PENDIDIKAN MIPA
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
UNIVERSITAS JEMBER**

2016

PERSEMBAHAN

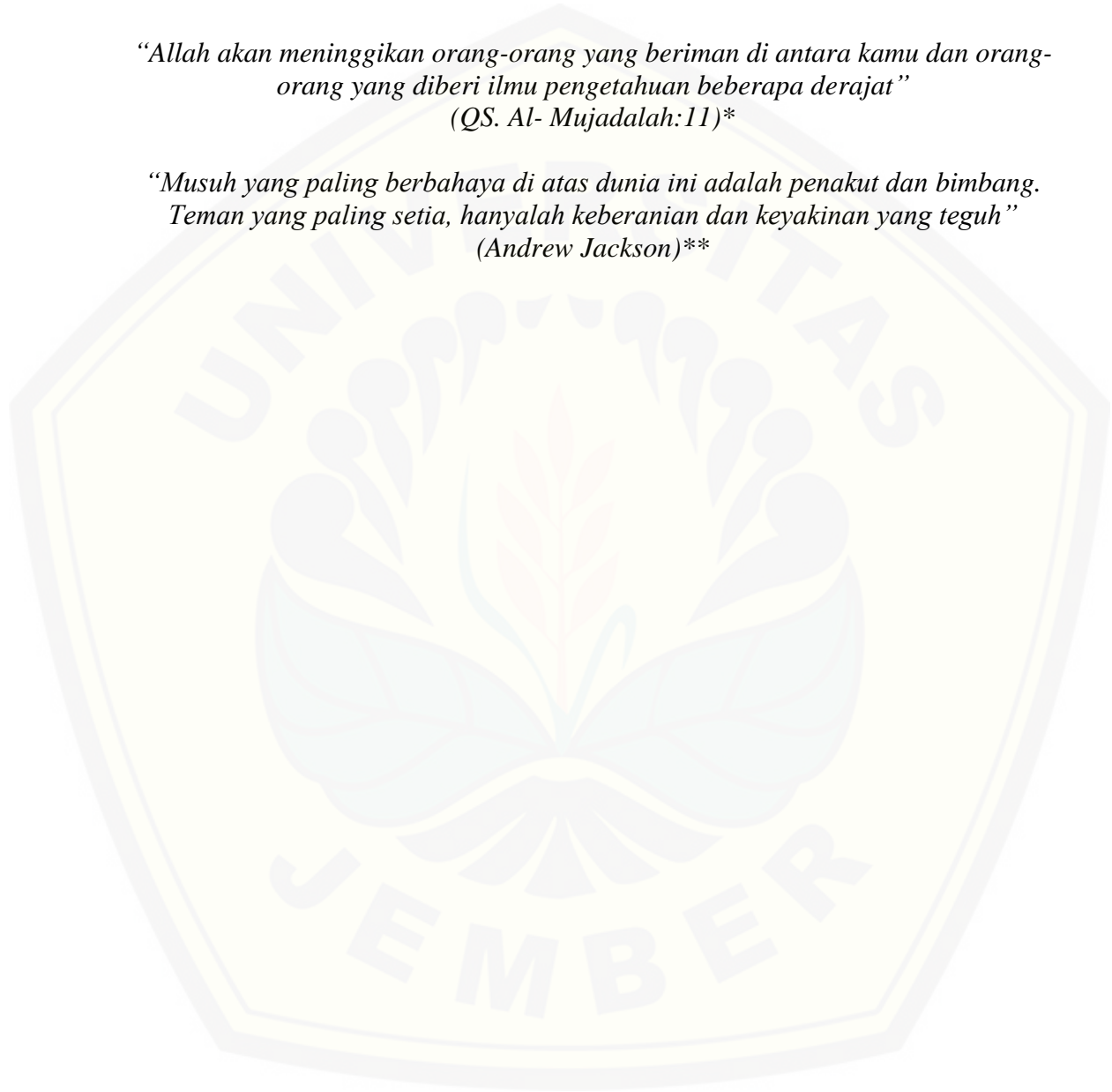
Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya, tak lupa Sholawat serta salam selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW yang telah menuntun kita pada jalan yang benar. Saya persembahkan skripsi ini dengan segala rasa cinta kasih kepada:

1. Orang tua tercinta, yaitu Ayahanda Mokhamad Rodi dan Ibunda Susilowati beserta keluarga besar saya yang selama ini memberikan kasih sayang, doa, kesabaran, perhatian dan dukungan materiil;
2. Bapak dan ibu guru dari TK, SD, SMP, SMA sampai Perguruan Tinggi yang telah memberikan bekal ilmu yang bermanfaat dan bimbingan dengan sepenuh hati.

MOTTO

*“Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antara kamu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat”
(QS. Al- Mujadalah:11)**

*“Musuh yang paling berbahaya di atas dunia ini adalah penakut dan bimbang.
Teman yang paling setia, hanyalah keberanian dan keyakinan yang teguh”
(Andrew Jackson)***



*Departemen Agama Republik Indonesia. 2012. Al Qur'an dan Terjemahannya. Semarang: PT Kumudasmoro Grafindo.

**Meacham, John. 2009. American Lion: Andrew Jackson in the White House. American Publisher.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Luthfiyatul Hasanah

NIM : 120210103077

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul “Formulasi Konsorsium Agen Hayati *Mycorrhiza Helper Bacteria* (*Pseudomonas diminuta* dan *Bacillus subtilis*) pada Media Cair Limbah Tahu dan Molase” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang telah saya sebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Juni 2016

Yang menyatakan,

Luthfiyatul Hasanah
NIM. 120210103077

SKRIPSI

**FORMULASI KONSORSIUM AGEN HAYATI MYCORRHIZA HELPER
BACTERIA (*Pseudomonas diminuta* dan *Bacillus subtilis*) PADA
MEDIA CAIR LIMBAH TAHU DAN MOLASE**

Oleh

Luthfiyatul Hasanah

NIM. 120210103077

**Dosen Pembimbing I : Dr. Iis Nur Asyiah, S.P., M.P.
Dosen Pembimbing II : Siti Murdiah S.Pd., M.Pd.**

PERSETUJUAN

**FORMULASI KONSORSIUM AGEN HAYATI MYCORRHIZA HELPER
BACTERIA (*Pseudomonas diminuta* dan *Bacillus subtilis*) PADA
MEDIA CAIR LIMBAH TAHU DAN MOLASE**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Biologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Pendidikan

Oleh

Nama : Luthfiyatul Hasanah
NIM : 120210103077
Jurusan/Program : Pendidikan MIPA / P. Biologi
Angkatan Tahun : 2012
Daerah Asal : Probolinggo
Tempat dan Tanggal Lahir : Probolinggo, 9 Desember 1993

Disetujui oleh:

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota

Dr. Iis Nur Asyiah, S.P., M.P.
NIP. 1973614200801 2 008

Siti Murdiyah S.Pd., M.Pd.
NIP. 19790503200604 02 001

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Formulasi Konsorsium Agen Hayati *Mycorrhiza Helper Bacteria* (*Pseudomonas diminuta* dan *Bacillus subtilis*) pada Media Cair Limbah Tahu dan Molase” ini telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Senin, 27 Juni 2016

Tempat : Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember

Ketua, Tim Penguji Sekretaris,

Dr. Iis Nur Asyiah, S.P., M.P.
NIP. 1973614200801 2 008

Siti Murdiah S.Pd., M.Pd.
NIP.19790503200604 02 001

Anggota I,

Anggota II,

Prof. Dr. H. Joko Waluyo, M.Si.
NIP. 19571028 198503 1 001

Mochammad Iqbal, S.Pd., M.Pd.
NIP. 19880120 201212 1 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan
Universitas Jember

Prof. Dr. Sunardi, M.Pd
NIP. 19540501 198303 1 005

RINGKASAN

Formulasi Konsorsium Agen Hayati *Mycorrhiza Helper Bacteria* (*Pseudomonas diminuta* dan *Bacillus subtilis*) dalam Media Cair Limbah Tahu dan Molase; Luthfiyatul Hasanah, 120210103077; 2016:66 halaman; Program Studi Pendidikan Biologi; Jurusan Pendidikan MIPA, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember.

Petani Indonesia dalam pengendalian organisme pengganggu tumbuhan masih menerapkan pengendalian secara kimiawi, pestisida sintetis ini akan menimbulkan berbagai dampak negatif. Salah satu solusi agar tidak terjadi dampak negatif adalah menggunakan pengendalian hayati. Pengendalian hayati adalah suatu pengendalian organisme pengganggu tanaman menggunakan agen hayati. Salah satu agen hayati adalah *Mycorrhiza Helper Bacteria* (MHB), artinya bahwa bakteri tersebut dapat membantu mikoriza menjalankan perannya. Bakteri yang digunakan adalah *Pseudomonas diminuta* dan *Bacillus subtilis*. Kombinasi inokulasi ganda agar dapat bekerja lebih maksimal perlu dilakukan formulasi sebelum diaplikasikan pada tanaman sebagai agen hayati. Formulasi yang dilakukan yaitu mencampurkan bahan aktif (*P.diminuta* dan *B.subtilis*) dengan perbandingan tertentu dalam media pembawa. Media pembawa yang digunakan adalah limbah cair tahu dan molase. Tujuan dari penelitian ini yaitu menentukan perbandingan bahan aktif dan media pembawa yang memiliki kerapatan sel bakteri tertinggi, mengetahui pengaruh interaksi antara perbandingan bahan aktif dan media pembawa terhadap daya simpan pada formulasi MHB (*P.diminuta* dan *B.subtilis*).

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium sub Mikrobiologi program studi Pendidikan Biologi, Universitas Jember. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pola faktorial 2x5 yang terdiri dari 10 perlakuan dengan tiga pengulangan. Setelah dilakukan pengamatan pada hari ke-3 dan hari ke-7 kemudian dilakukan pengerucutan perlakuan dengan mengambil rerata kerapatan sel tertinggi sehingga didapat M1P1 (Molase,1:1), M1P4 (Molase,2:3), M2P1 (Limbah tahu,1:1),

dan M2P4 (Limbah tahu,2:3). Perlakuan ini diamati hingga 60 hari, yaitu diamati pada hari ke-3, hari ke-7, hari ke-30, dan hari ke-60.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa faktor perbandingan bahan aktif sendiri terhadap kerapatan sel bakteri sebagian besar menunjukkan bahwa perbandingan bahan aktif berpengaruh secara tidak nyata terhadap kerapatan sel bakteri. Hasil dari faktor media pembawa sendiri terhadap kerapatan sel bakteri menunjukkan hasil bahwa media pembawa berpengaruh secara nyata terhadap kerapatan sel bakteri *B.subtilis* dan *P.diminuta* hingga pengamatan hari ke-30. Apabila dilihat dari rerata kerapatan sel bakteri *B.subtilis* dan *P.diminuta* selama pengamatan media molase ($M1=29,40 \times 10^7$) memiliki rerata kerapatan sel lebih tinggi daripada media limbah tahu ($M2=6,11 \times 10^7$).

Hasil dari interaksi media pembawa dan perbandingan bahan aktif berpengaruh secara nyata terhadap kerapatan sel bakteri *P.diminuta* pada pengamatan hari ke-7 (sig.=0.044) dan hari ke-30 (sig.=0,000). Rerata kerapatan sel bakteri *B.subtilis* dan *P.diminuta* selama pengamatan terkait interaksi media dengan perbandingan bahan aktif yang memiliki rerata kerapatan sel tertinggi adalah media molase dengan perbandingan bahan aktif 2:3.

Hasil pengamatan pH menunjukkan bahwa selama dilakukan pengamatan pH cenderung mengalami kenaikan di semua perlakuan, akan tetapi pH masih dalam batas yang ditetapkan oleh fermentan sebagai agen hayati. Hasil pengamatan kandungan nitrogen menunjukkan bahwa setelah dilakukan formulasi kandungan nitrogen pada media limbah tahu cenderung meningkat ($\pm 0,15\%$), sedangkan pada media molase kandungan nitrogennya cenderung menurun ($\pm 0,93\%$).

Kesimpulan dari hasil analisis dan pembahasan adalah perbandingan bahan aktif yang memiliki kerapatan sel tertinggi adalah perbandingan 2:3 (*B.subtilis* :*P.diminuta*), media dengan kerapatan sel tertinggi adalah media molase, pengaruh perlakuan media tidak berinteraksi dengan perbandingan bahan aktif terhadap daya simpan bakteri *B.subtilis* dan *P.diminuta* hampir disetiap pengamatannya.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Formulasi Agen Hayati *Mycorrhiza Helper Bacteria* (*Pseudomonas diminuta* dan *Bacillus subtilis*) dalam Media Cair Limbah Tahu dan Molase”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Program Studi Pendidikan Biologi, Jurusan pendidikan MIPA, FKIP Universitas Jember.

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian dengan judul Optimalisasi Peranan Mikoriza Dalam Mengendalikan Nematoda *Pratylenchus coffeae* (>80%) dan Meningkatkan Ketersediaan P Tanah pada Tanaman Kopi dengan Penambahan *Mycorrhiza Helper Bacteria* (MHB) dan *Phosphate Solubilizing Bacteria* (PSB) yang didanai oleh hibah KKP3N Deptan 2015, dan diketuai oleh Dr. Iis Nur Asyiah, SP., MP.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Sunardi, M.Pd., selaku Dekan Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember;
2. Dr. Dwi Wahyuni, M.Kes. selaku Ketua Jurusan Pendidikan MIPA FKIP Universitas Jember;
3. Prof. Dr. Suratno, M.Si., selaku Ketua Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Jember yang membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
4. Dr. Iis Nur Asyiah, S.P, M.P. selaku Dosen Pembimbing Utama sekaligus pemberi dana penelitian melalui proyek penelitian yang didanai oleh KKP3N Litbang Deptan tahun 2015 dan Siti Murdiah S.Pd., M.Pd. selaku Dosen Pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, serta perhatian dalam membimbing penulisan skripsi ini;

5. Prof. Dr. H. Joko Waluyo, M.Si. dan Bapak Mochammad Iqbal. S.Pd., M.Pd. selaku dosen penguji yang telah memberikan banyak masukan dan saran dalam penulisan skripsi ini;
6. Dr. Ir. Imam Mudakir, M.Si, dan Sulifah Aprilya H, S.Pd, M.Pd. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan selama penulis menjadi mahasiswa;
7. Segenap dosen Program Studi Pendidikan Biologi Universitas Jember yang telah ikhlas dan tulus dalam berbagi ilmu dan pengalaman kepada penulis selama ini;
8. Segenap teknisi dan laboran di Program Studi Pendidikan Biologi Universitas Jember yang membantu dalam penyediaan peralatan dan bahan yang dibutuhkan dalam penelitian;
9. Kedua orang tua, kedua adikku, dan segenap keluarga besar yang telah memberi limpahan doa, motivasi, nasihat, sekaligus dukungan materiil;
10. Eka, Dyah, Trias, Ika, Klara, dan Siffana, yang telah membantu dan menjadi motivasi penulis untuk menyelesaikan penelitian ini;
11. Mbak Rifa, mbak Heni, mas Dodik, dan segenap teman-teman Proyek Penelitian Mikoriza dan Endofit yang mencurahkan tenaga, dukungan dan motivasi pada penulis dalam menyelesaikan penelitian ini;
12. Rizka, Wulan, Roy, Sandy, Siska, Ifa, Rasmiyana, Firda, Mia, segenap teman-teman seperjuangan “X-Class 2012” dan Teman-teman angkatan 2012 Pendidikan Biologi FKIP Universitas Jember yang memberikan motivasi dan kenangan yang tak pernah terlupakan;
13. Semua pihak lain yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis juga berharap mudah-mudahan skripsi ini dapat bermanfaat bagi semuanya.

Jember, Juni 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERSEMBAHAN	ii
MOTTO	iii
PERNYATAAN	iv
PERSETUJUAN	vi
PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah.....	5
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 <i>Mycorrhiza Helper Bacteria</i> (MHB).....	7
2.1.1 <i>Pseudomonas diminuta</i>	7
2.1.2 <i>Bacillus subtilis</i>	9
2.1.3 Peranan bakteri MHB (<i>P.diminuta</i> dan <i>B.subtilis</i>) dalam membantu efektifitas peranan mikoriza.....	11
2.1.4 Peranan bakteri MHB sebagai Growth Promoting- Rhizobacteri	13
2.2 Formulasi	14

2.2.1 Perbanyak massal	14
2.2.2 Konsorsium mikroorganisme dalam media.....	15
2.2.3 Media pembawa	15
2.2.4 Daya simpan.....	22
2.3 Kerangka Berpikir.....	23
2.4 Hipotesis Penelitian	24
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	26
3.1 Jenis Penelitian.....	26
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	26
3.3 Variabel Penelitian.....	26
3.3.1 Variabel bebas	26
3.3.2 Variabel terikat.....	26
3.3.3 Variabel kontrol atau variable kendali	26
3.4 Parameter Penelitian	27
3.4.1 Kerapatan sel bakteri.....	27
3.4.2 pH.....	28
3.4.3 Kandungan Nitrogen	28
3.5 Definisi Operasional	28
3.6 Desain Penelitian	29
3.7 Alat dan Bahan Penelitian.....	30
3.7.1 Alat penelitian	30
3.7.2 Bahan penelitian.....	31
3.8 Prosedur Penelitian	31
3.8.1 Peremajaan isolat (pembuatan propagul mikroba).....	31
3.8.2 Penyiapan medium cair dan media pembawa	31
3.8.3 Perbanyak massal	32
3.8.4 Formulasi konsorsium agen hayati.....	33
3.8.5 Pengamatan	34
3.9 Analisis Data.....	34

3.10 Alur Penelitian	35
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	37
4.1 Hasil Penelitian	37
4.1.1 Identifikasi bakteri dan pembuatan propagul	37
4.1.2 Formulasi agen hayati	38
4.1.3 Pengamatan daya simpan uji akhir	39
4.1.3.1 Pengamatan kerapatan sel bakteri	40
4.1.3.2 Pengamatan pH formula	46
4.1.3.3 Pengamatan kandungan nitrogen	50
4.2 Pembahasan	51
BAB 5. PENUTUP	60
5.1 Kesimpulan	60
5.2 Saran	60
DAFTAR PUSTAKA	61
LAMPIRAN	67

DAFTAR TABEL

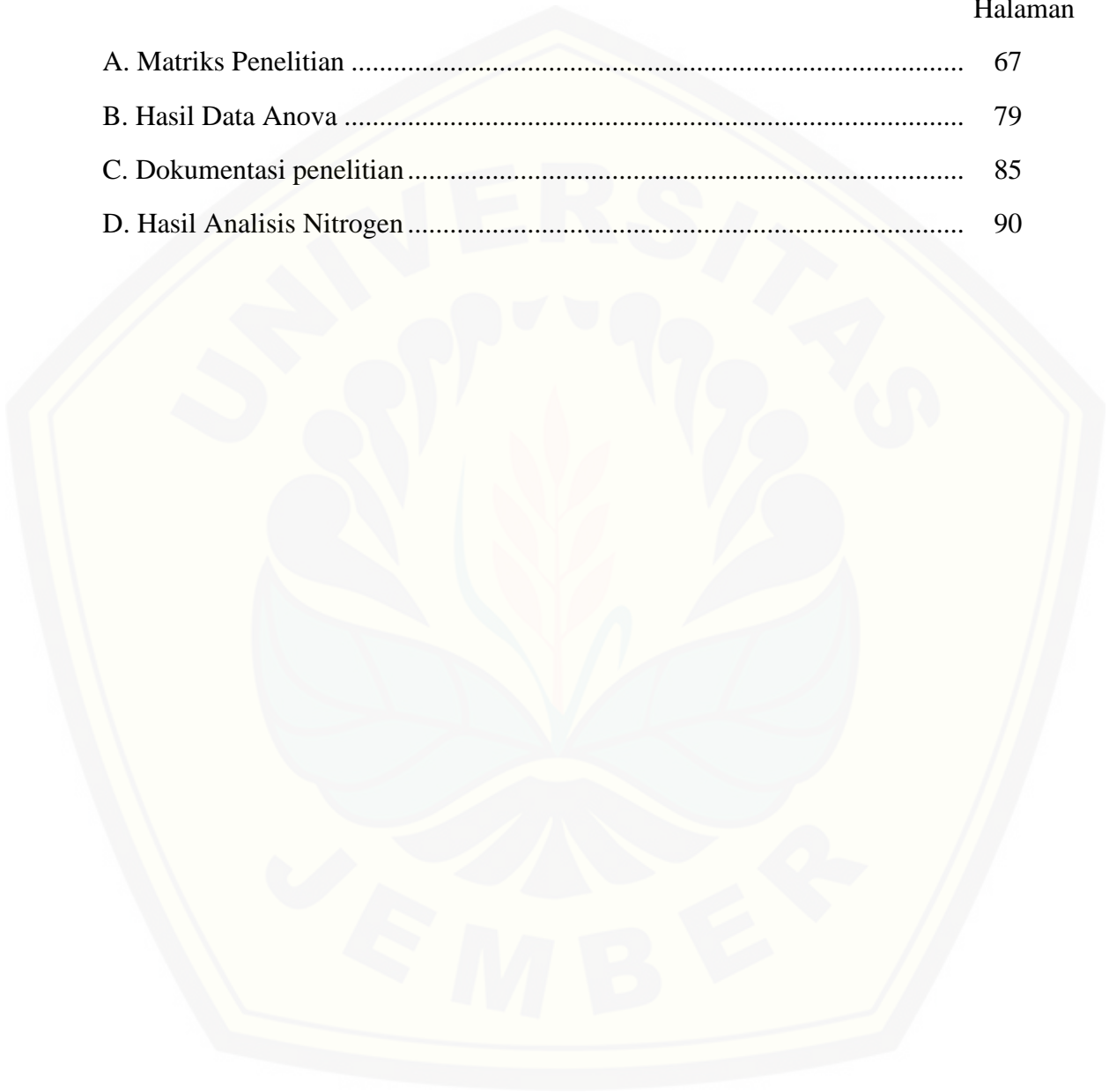
	Halaman
Tabel 2.1 Komponen kandungan dalam molase	21
Tabel 3.1 Desain Penelitian.....	29
Tabel 4.1 Hasil Identifikasi bakteri.....	35
Tabel 4.2 Hasil uji pendahuluan pengamatan kerapatan sel bakteri	37
Tabel 4.3 Pengaruh media, perbandingan bahan aktif, dan interaksi- keduanya terhadap rerata kerapatan sel bakteri <i>B.subtilis</i> dan- <i>P.diminuta</i> pada hari ke-3 s.d ke-60	38
Tabel 4.4 Pengaruh media, perbandingan bahan aktif, dan interaksi- keduanya terhadap pH setelah formulasi.....	45
Tabel 4.5 Hasil analisis kandungan nitrogen pada pengamatan hari ke-3- dan hari ke-7	47

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Mikroskopis <i>Pseudomonas diminuta</i>	8
Gambar 2.2 Mikroskopis <i>Bacillus subtilis</i>	10
Gambar 3.1 Alur penyiapan bahan aktif	31
Gambar 3.2 Alur penyiapan bahan pembawa/media	31
Gambar 3.3 Alur penelitian	34
Gambar 4.1 Penampang mikroskopi <i>B.subtilis</i> dan <i>P.diminuta</i>	36
Gambar 4.2 Histogram pengaruh media terhadap rerata kerapatan sel bakteri- <i>B.subtilis</i> dan <i>P.diminuta</i> hari ke-3 s.d ke-60	41
Gambar 4.3 Histogram pengaruh perbandingan bahan aktif terhadap rerata- kerapatan sel bakteri <i>B.subtilis</i> dan <i>P.diminuta</i>	42
Gambar 4.4 Histogram pengaruh interaksi media dengan perbandingan bahan- aktif terhadap rerata kerapatan sel bakteri <i>B.subtilis</i> dan- <i>P.diminuta</i> hari ke-3 s.d ke-60	43
Gambar 4.5 Histogram pengaruh media terhadap pH hasil formulasi	46
Gambar 4.6 Histogram pengaruh perbandingan bahan aktif terhadap- pH hasil formulasi hari ke-3 s.d ke-60	46
Gambar 4.7 Histogram pengaruh interaksi media dengan perbandingan bahan- aktif terhadap pH hasil formulasi hari ke-3 s.d ke-60	47

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Matriks Penelitian	67
B. Hasil Data Anova	79
C. Dokumentasi penelitian	85
D. Hasil Analisis Nitrogen	90



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pengendalian organisme pengganggu tumbuhan (OPT) merupakan salah satu aspek pada praktek perlindungan tanaman. Petani Indonesia dalam pengendalian OPT masih banyak yang menerapkan pengendalian secara kimiawi dengan menggunakan pestisida sintetis. Penggunaan pestisida menimbulkan banyak dampak negatif antara lain: 1) dapat menyebabkan keracunan pada aplikator, baik karena kesalahan saat aplikasi, maupun melalui makanan atau minuman yang terkontaminasi, 2) spektrum penghambatan yang cenderung luas sehingga tidak hanya membunuh organisme sasaran, namun juga organisme bukan sasaran, contohnya musuh alami, 3) harga pestisida sintetis yang mahal dan penggunaannya kadang tidak tepat sehingga memperbesar biaya produksi, jika pengaplikasian pestisida sintetis dilakukan saat tidak diperlukan (Purnomo, 2010). Petani dapat menggunakan pengendalian hayati yang lebih ramah lingkungan sebagai salah satu solusi untuk mengatasi masalah tersebut.

Peraturan Menteri Pertanian Nomor 411 tahun 1995 menyatakan bahwa agen hayati adalah setiap organisme yang meliputi spesies, subspecies, varietas, dan semua jenis nematoda, bakteri, protozoa, cendawan (fungi), mikoplasma, serangga, virus, serta semua mikroorganisme lainnya dalam semua tahap perkembangannya yang dapat dipergunakan untuk keperluan pengendalian hama dan penyakit atau organisme pengganggu, pengolahan hasil pertanian, proses produksi, serta untuk keperluan lainnya (Supriadi, 2006). Pengendalian hayati dapat diartikan sebagai suatu pengendalian organisme pengganggu tanaman menggunakan agen hayati. Salah satu agen hayati yang digunakan untuk pengendalian hayati adalah mikoriza.

Mikoriza adalah asosiasi saling menguntungkan antara fungi dan akar tanaman yang membentuk struktur simbiotik dan menghasilkan sifat morfologi yang baru (Siddiqui dan Pichtel, 2008). Mikoriza merupakan simbiosis mutualisme antara fungi

dengan akar tanaman tingkat tinggi (Douds dan Millner, 1999). Kelompok bakteri yang mampu meningkatkan kolonisasi akar atau pertumbuhan hifa disebut sebagai *Mycorrhiza Helper Bacteria* (MHB) (Garbaye, 1994:201). MHB merupakan istilah yang digunakan bagi bakteri yang dapat membantu mikoriza menjalankan perannya. Bakteri dikategorikan MHB ketika bakteri itu bersifat endofit, dengan kata lain bakteri tersebut harus berada di salah satu bagian tubuh mikoriza, dan berperan terhadap perkembangan mikoriza (FreyKlett dan Garbaye, 2005:5). Bakteri ini bukan hanya membantu peranan mikoriza dan pengendalian perkembangan hama berupa mikroorganisme saja melainkan juga menghasilkan hormon zat pengatur tumbuh (ZPT) yang mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman sehingga disebut dengan *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR).

Bakteri yang digunakan diantara bakteri MHB adalah bakteri dari genus *Pseudomonas* dan *Bacillus*. Beberapa penelitian yang menunjukkan bahwa MHB mampu menekan populasi nematoda seperti penelitian dari Fauzi, (2014:52) hasil penelitiannya menunjukkan bahwa inokulasi *Bacillus subtilis* dengan kepadatan 10^8 cfu dapat menekan populasi nematoda sebesar 71,3% dan inokulasi *Pseudomonas diminuta* kepadatan 2.10^8 mampu menekan populasi *Pratylenchus coffea* sebesar 64,2%. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas diminuta* yang diinokulasikan sendiri-sendiri mampu mengendalikan nematoda, sedangkan hasil penelitian Handayani, (2015:97) menunjukkan bahwa inokulasi ganda MHB (*P.diminuta* dan *B.subtilis*) dan *Glomus* spp. dapat mengendalikan populasi nematoda *P.coffea* berkisar antara 87,4%-97,02%. Hasil penelitian Asyiah dan Soekarto, (2013:4-5) menunjukkan bahwa bakteri *P. diminuta* dan *B. mycoides* efektif dalam mengendalikan Nematoda Sista Kentang (NSK) baik diaplikasikan sendiri-sendiri maupun berupa campuran. Berdasarkan dari hasil penelitian-penelitian tersebut menunjukkan bahwa *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas diminuta* dapat diaplikasikan tunggal dan diharapkan apabila dikombinasikan dapat bekerja lebih maksimal. Kombinasi yang dilakukan agar dapat bekerja maksimal perlu dilakukan suatu formulasi konsorsium sebelum diaplikasikan pada tanaman sebagai

agen hayati. Tujuan tersebut didukung oleh Harni, (2007:109) bahwa dalam pengaplikasian pada tanaman perlu dilakukan formulasi.

Potensi bakteri *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas diminuta* dalam menekan populasi nematoda perlu ditindak lanjuti dengan pembuatan formula konsorsium yang tepat karena keberhasilan pengendalian hayati sangat tergantung pada formulasi konsorsium yang sesuai. Formula yang dibutuhkan adalah formula yang dapat mempertahankan keberadaan mikroorganisme dalam jangka waktu lama di media tertentu. Penentuan jangka waktu dapat diamati melalui daya simpan dengan melihat kerapatan sel dan pH sebagai parameternya. Menurut Rao (1996:752), jumlah minimum inokulan yang harus terkandung dalam media pembawa pada 15 hari sebelum aplikasi ke lapangan adalah 10^7 sel/gram. Penggabungan dan modifikasi dari berbagai cara pembuatan formula agen hayati bisa menjadi pertimbangan dalam formulasi konsorsium agen hayati berbahan aktif *P. diminuta* dan *B. subtilis*. Formulasi dapat berupa padat atau cair dengan menggunakan senyawa organik atau anorganik. Formulasi konsorsium dapat dilakukan setelah proses perbanyakan massal dalam bentuk cair dengan menggunakan senyawa organik atau anorganik sebagai media pembawa agar bisa diaplikasikan di lapangan. Senyawa organik dapat didapat dari limbah industri yang menggunakan bahan dasar organik dalam proses menghasilkan produknya.

Perindustrian yang saat ini berkembang di pasaran ternyata memberikan dampak negatif bagi masyarakat di sekitarnya. Dampak negatif tersebut ditimbulkan oleh berbagai macam jenis pencemar yang ada. Bentuk pencemar terdapat bentuk asap atau gas, dalam bentuk padatan dan dalam bentuk cairan. Limbah bentuk cairan, limbah industri ini berbahaya karena merusak ekosistem air (Kompasiana, 2013). Berkaitan dengan hal tersebut maka diperlukan upaya pemanfaatan limbah cair sehingga mampu mengurangi dampak negatif yang dirasakan oleh masyarakat. Salah satu contoh limbah cair adalah limbah cair tahu dan limbah tetes tebu atau molase.

Limbah cair yang banyak terdapat dimasyarakat antara lain limbah cair tahu dan limbah cair tetes tebu atau molase. Limbah cair tahu berasal dari limbah industri tahu

rumahan, sedangkan molase berasal dari industri pembuatan gula sehingga pengambilan limbah mudah diakses. Latar belakang pemilihan limbah cair tahu dan limbah cair tetes tebu atau molase karena pengendapan sari tahu masih memiliki kandungan protein nabati yang dapat dimanfaatkan sebagai media pertumbuhan bakteri. Limbah cair tetes tebu atau molase masih memiliki kandungan gula yang dapat dimanfaatkan mikroba sebagai media tumbuhnya. Limbah cair tahu dan molase atau tetes tebu dapat berperan sebagai media pembawa dalam formulasi biopestisida. Terbukti pada penelitian Prabowo, (2014) bahwa media organik seperti tetes tebu atau molase, air kelapa, dan limbah tahu cair dapat dijadikan media tumbuh bakteri *Pseudomonas diminuta*. Keunggulan lain dari limbah tersebut selain terbukti sebagai media yang mampu ditumbuhi mikroba, limbah tersebut merupakan limbah yang mudah didapat dan murah.

Berdasarkan latar belakang di atas maka perlu dilakukan formulasi biopestisida yang mengandung bahan aktif bakteri *B.subtilis* dan *P.diminuta* dengan media pembawa berupa limbah cair tahu dan molase. Dengan demikian akan dilakukan penelitian dengan judul "Formulasi Konsorsium Agen Hayati *Mycorrhiza Helper Bacteria* (*Pseudomonas diminuta* dan *Bacillus subtilis*) dalam Media Cair Limbah Tahu dan Molase ".

1.2 Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan diatas, maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

- a. Manakah media pembawa cair yang mempunyai kerapatan sel bahan aktif (*Pseudomonas diminuta* dan *Bacillus subtilis*) tertinggi?
- b. Berapakah perbandingan bahan aktif (*Pseudomonas diminuta* dan *Bacillus subtilis*) dalam formulasi yang memiliki kerapatan sel bakteri tertinggi?
- c. Adakah pengaruh interaksi perbandingan bahan aktif dan media pembawa terhadap daya simpan hasil formulasi?

1.3 Batasan masalah

Untuk mempermudah pembahasan dan mengurangi kerancuan dalam menafsirkan masalah yang digunakan dalam penelitian ini maka diberi batasan masalah sebagai berikut:

- a. Isolat *B. subtilis* yang digunakan dalam penelitian diperoleh dari koleksi diperoleh koleksi Laboratorium Tanah UNPAD sedangkan isolat *P. diminuta* Laboratorium Mikrobiologi FKIP Biologi UNEJ.
- b. Limbah tahu cair yang digunakan untuk penelitian diperoleh dari industri tahu rumahan di desa Sempusari, Kaliwates, Jember.
- c. Limbah tebu atau molase yang digunakan untuk penelitian diperoleh dari pabrik gula Gending, Probolinggo umur isolat *B. subtilis* dan *P. diminuta* adalah 24 jam.
- d. Kerapatan sel bakteri dinyatakan dalam cfu/ml.
- e. Konsorsium yang dilakukan adalah mencampurkan bakteri *B. subtilis* dan *P. diminuta* setelah dilakukan perbanyakan massal dengan perbandingan volume tertentu.
- f. Pengamatan daya simpan dilakukan dengan cara mengamati kerapatan sel bakteri dan mengukur pH hasil formulasi pada hari ke-3, ke-7, ke-30, dan hari ke-60 setelah formulasi.

1.4 Tujuan penelitian

Berdasarkan rumusan masalah diatas, maka tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Menguji media pembawa cair yang mempunyai kerapatan sel bahan aktif (*Pseudomonas diminuta* dan *Bacillus subtilis*) tertinggi.
- b. Menetapkan perbandingan bahan aktif dalam formulasi yang memiliki kerapatan sel bakteri tertinggi.
- c. Mengetahui pengaruh interaksi perbandingan bahan aktif dan media pembawa terhadap daya simpan hasil formulasi.

1.5 Manfaat penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

- a Bagi peneliti, dapat memformulasi agen hayati *Mycorrhiza Helper Bacteria* (*Pseudomonas diminuta* dan *Bacillus subtilis*) pada media cair limbah tahu dan molase.
- b Bagi peneliti lain, dapat memberikan sumbangan pemikiran sebagai motivasi dalam meneliti lebih lanjut efektivitas formulasi agen hayati *Mycorrhiza Helper Bacteria* (*Pseudomonas diminuta* dan *Bacillus subtilis*) pada nematoda.
- c Manfaat bagi lembaga atau pengembangan keilmuan adalah dapat memberikan tambahan pengetahuan dan wawasan tentang adanya efek positif dari kombinasi *P. diminuta* dan *B. subtilis* sebagai MHB dan memberi alternatif cara pengendalian dengan menggunakan pengendalian biologis.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

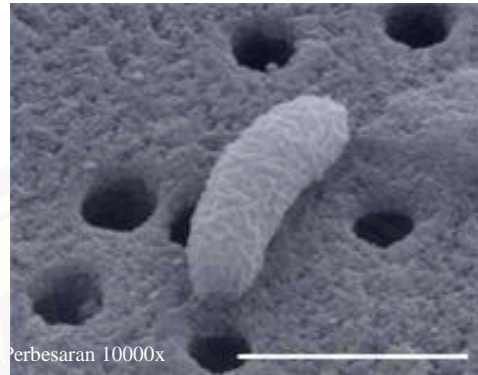
2.1 *Mycorrhiza Helper Bacteria* (MHB)

MHB merupakan istilah yang digunakan bagi bakteri yang dapat membantu mikoriza menjalankan perannya. Bakteri dikatakan MHB ketika bakteri itu bersifat endofit dengan kata lain bakteri tersebut harus berada di salah satu bagian tubuh mikoriza, dan berperan terhadap perkembangan mikoriza. Simbiosis mikoriza bukan hanya hubungan antara fungi pembentuk mikoriza dan tanaman inang namun melibatkan organisme pendukung lainnya seperti bakteri (Garbaye, 1994:203).

Hasil penelitian Nunang (2011:30) menunjukkan bahwa ada 12 bakteri yang berhasil diisolasi dari spora Mikoriza Vesikular Arbuskular (MVA), 7 bakteri dari *Gigaspora sp.* dan 5 bakteri dari *Glomus spp.* Delapan jenis bakteri yaitu: *P. diminuta*, *B. licheniformis*, *B. laterosporus*, *E. hormaechei*, *B. brevis*, *B. subtilis*, *B. cereus* (GG), dan *B. firmus* mampu menstimulir perkembangan hifa mikoriza. Ada 7 bakteri yang mempunyai potensi aktivitas enzimatis selulase dan protease yaitu: *B. subtilis*, *B. cereus* (GG), *B. laterosporus*, *B. pasteurii*, *P. penneri*, *B. firmus*, dan *B. cereus* (GL), dan ada 4 bakteri (*B. subtilis*, *P. diminuta*, *P. penneri*, dan *E. hormaechei*) yang dapat menghambat pertumbuhan patogen *Rhizoctonia sp.*, *Sclerotium sp.*, dan *Ganoderma sp.*

2.1.1 *Pseudomonas diminuta*

Klasifikasi *P. diminuta* ternyata ada beberapa perubahan akibat adanya suatu penelitian yang dilakukan oleh Segers, *et al.* (1994) menyatakan bahwa posisi taksonomi dari strain yang sebelumnya disebut *P. diminuta* terdapat kekeliruan, setelah dilakukan melalui pemeriksaan dengan pendekatan polyphasic. Hasil dari studi hibridisasi DNA-rRNA menyatakan bahwa *Pseudomonas diminuta* termasuk 35 dalam genus yang berbeda dalam α subclass dari *proteobacter*, sehingga diusulkan nama genus *Brevundimonas*.



Gambar 2.1 mikroskopis *Pseudomonas diminuta*
(sumber: IT4P,2015)

Kelompok bakteri *Pseudomonas* termasuk bakteri gram negatif, kelompok bakteri ini memiliki bentuk batang lurus atau batang agak melengkung, tetapi tidak membentuk heliks. Begitu juga dengan bakteri *Pseudomonas diminuta* yang memiliki bentuk batang lurus dengan panjang 1,5-5 μm . Bakteri ini juga tidak membentuk pertunasan ditubuhnya, dan juga tidak memiliki selubung disekitar tubuhnya. Pergerakan bakteri *Pseudomonas diminuta* dilakukan dengan menggunakan 1 flagella ditubuhnya (Holt *et al*, 1994:323). Dari penampakan tersebut *Pseudomonas diminuta* memiliki klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria
Subkingdom : Negibacteria
Phylum : Proteobacteria
Class : Alphaproteobacteria
Order : Caulobacterales
Family : Caulobacteraceae
Genus : Brevundimonas
Species : *Brevundimonas diminuta*

(ITIS.gov, 2012)

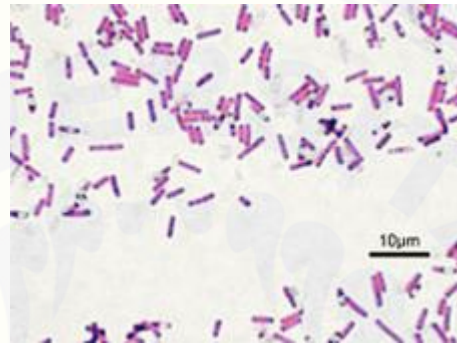
P. diminuta sudah terbukti mampu menurunkan populasi nematoda sista kuning (*Globodera rostochiensis*) pada tanaman kentang (Asyiah et al., 2010:3). Selain itu *P. diminuta* juga termasuk bakteri pemacu pertumbuhan tanaman *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) karena menghasilkan giberellin dan sitokinin (Asyiah et al., 2010:6). Serfoji et al., (2010) menunjukkan bahwa MHB *Bacillus coagulans* bersama dengan *Glomus aggregatum* mampu mereduksi nematoda puru akar (*Meloidogyne incognita*).

Inokulasi ganda *P. diminuta* dan mikoriza MVA (Mikoriza Vesikular Arbuskular) dalam mengendalikan nematoda parasit perlu dikaji lebih lanjut pada nematoda parasit lainnya seperti *P. coffeae*. *P. diminuta* selain sebagai agen pengendali nematoda parasit, *P. diminuta* juga merupakan MHB (*Mycorrhiza Helper Bacteria*) dan PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) sehingga mempunyai potensi besar dalam mengendalikan nematoda *P. coffeae* yang menyerang akar tanaman kopi. Rizobakteri dari kelompok *Pseudomonas spp.* dapat berfungsi sebagai penyubur, sebagai sarana pengendali hayati patogen tanaman dan mampu meningkatkan ketahanan tanaman *Induced Systemic Resistance* (ISR) (McMilan, 2007). Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *Pseudomonas spp.* dapat meningkatkan hasil dan melindungi tanaman gandum dari patogen *Phytium spp.* melalui perlakuan benih (Cook, 1986). MVA mampu melindungi tanaman kacang tanah dari patogen layu dan akar *Sclerotium rolfsii* (Ganesan dan Gnanamanickam, 1986) dan dapat menginduksi ketahanan tanaman mentimun terhadap serangan patogen *Colletotrichum orbiculare* melalui perlakuan pada akar.

2.1.2 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis merupakan bakteri Gram positif, berbentuk batang, dapat tumbuh pada kondisi aerob dan anaerob. Sporangya tahan terhadap panas (suhu tinggi), mampu mendegradasi Xylandan karbohidrat. *Bacillus spp* mempunyai sifat: (1) mampu tumbuh pada suhu lebih dari 50°C dan suhu kurang dari 5°C, (2) mampu bertahan terhadap pasteurisasi, (3) mampu tumbuh pada konsentrasi garam tinggi

(>10%), (4) mampu menghasilkan spora dan (5) mempunyai daya proteolitik yang tinggi dibandingkan mikroba lainnya. *Bacillus* adalah salah satu genus bakteri yang berbentuk batang dan merupakan anggota dari divisi Firmicutes. *Bacillus* merupakan bakteri yang bersifat aerob obligat atau fakultatif, dan positif terhadap uji enzim katalase (Hatmanti, 2000: 34).



Gambar 2.2 mikroskopis *Bacillus subtilis*
(sumber: www.sittovietnam.com)

Bacillus secara alami terdapat dimana-mana, dan termasuk spesies yang hidup bebas. Donald, dkk. (2014) menyatakan bahwa bentuk koloni dari *B. subtilis* yaitu bentuk koloni tidak teratur dan memiliki garis pinggir berombak. Beberapa spesies *Bacillus* menghasilkan enzim ekstraseluler seperti protease, lipase, amilase, dan selulase. Kedudukan *B. subtilis* dalam sistematika (taksonomi) Bakteria diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria
Subkingdom : Posibacteria
Phylum : Firmicutes
Class : Bacilli
Order : Bacillales
Family : Bacillaceae
Genus : Bacillus
Species : *Bacillus subtilis*

(ITIS.gov, 2012)

B. subtilis merupakan salah satu bakteri yang dapat digunakan sebagai agen hayati untuk mengendalikan penyakit tular tanah dan dapat mengurangi penyakit rebah kecambah pada beet gula Dunleavy (1955) dalam Erlina (2002). *B. subtilis* berpotensi untuk dikembangkan dalam simbiosis dengan mikoriza (Susanti, 2004).

Backman *et. al.* (1997) menyatakan bahwa *Bacillus* memiliki keunggulan dibanding dengan bakteri lain, yaitu mampu menghasilkan endospora yang tahan terhadap panas dan dingin, juga tahan terhadap pH yang ekstrim, pestisida, pupuk, dan waktu penyimpanan. *Bacillus* merupakan salah satu genus yang sangat penting untuk pengendalian hayati pada permukaan daun dan buah, disamping untuk penyakit pada perakaran maupun penyakit pasca panen. Di samping itu bakteri ini sangat berpotensi karena sangat mudah diformulasikan dan relatif dapat mengkolonisasi berbagai spesies tanaman.

Mekanisme penghambatan antagonis *B. subtilis* terhadap mikroorganisme lain disebabkan adanya aktivitas antibiotik yaitu dihasilkannya macam-macam zat antibiotik (Sastroswignyo, 1998 dalam Utami, 2001). Loeffler *et. al.*, (1986) dalam Setiawan (2002) menyatakan bahwa *B. subtilis* dapat menghasilkan antibiotik seperti *baclysin* dan *fengymycillo* yang bersifat antifungal dan beberapa isolat *B. subtilis* memproduksi antibiotik iturin yang memiliki kisaran aktivitas cukup luas, baik terhadap bakteri maupun jamur.

2.1.3 Peranan bakteri MHB (*P. diminuta* dan *B. subtilis*) dalam membantu efektifitas peranan mikoriza.

Eksudat MHB sering kali merangsang perkecambahan spora fungi. Xavier dan Germida (2003) mengamati bahwa sebagian besar bakteri dari dinding sel spora MVA mampu meningkatkan perkecambahan spora *G. clarum* ketika terjadi kontak langsung antara spora dan bakteri, sementara sebagian isolat bakteri menghambat perkecambahan spora dengan menghasilkan *volatile antagonistic*.

Duponnois dan Garbaye (1990:201) telah mampu menganalisis bagaimana MHB mempengaruhi konsentrasi senyawa antagonistik yang diproduksi oleh fungi

mikoriza. Mereka mendapati bahwa bakteri tersebut mampu mendetoksifikasi media cair dari metabolit fungi yang bersifat menghambat. Bakteri MHB kemungkinan juga dapat menekan produksi senyawa toksik oleh mikroba tanah. Vivas *et al.* (2005:420) melaporkan bahwa bakteri MHB memiliki dampak positif yang kuat terhadap perkecambahan spora dan pertumbuhan fungi prasimbiosis dalam larutan yang terkontaminasi logam berat.

MHB mampu menekan populasi nematoda seperti penelitian dari Fauzi, (2014:52) hasil penelitiannya menunjukkan bahwa inokulasi *Bacillus subtilis* dengan kepadatan 10^8 cfu dapat menekan populasi nematoda sebesar 71,3% dan inokulasi *Pseudomonas diminuta* kepadatan 2.10^8 mampu menekan populasi *Pratylenchus coffea* sebesar 64,2%. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas diminuta* yang diinokulasikan sendiri-sendiri mampu mengendalikan nematoda, sedangkan hasil penelitian Handayani (2015) menunjukkan bahwa inokulasi ganda MHB (*P.diminuta* dan *B.subtilis*) dan *Glomus* spp. dapat mengendalikan populasi nematode *P.coffea* berkisar antara 87,4%-97,02%. Bakteri MHB memiliki efek yang mendasar pada daerah perakaran (Rhizosfer). Bakteri MHB mempunyai empat teknik dalam membantu efektifitas infeksi mikoriza terhadap tanaman Kopi arabika. Empat teknik tersebut adalah:

a Efek MHB pada daya penerimaan akar

Pada teknik ini, bakteri yang berkembangbiak di rhizosfer sebelum ada campur tangan dari jamur simbiosis, dapat meningkatkan tingkat penerimaan dari akar ke pembentukan mikoriza. Penjelasan dari hipotesis yaitu ada 2 kemungkinan dari *Helper Bacteria Effect* yaitu bakteri menginisiasi pembentukan IAA untuk membentuk akar pendek agar memungkinkan meningkatnya kemungkinan interaksi. Selanjutnya adalah bakteri mampu menghasilkan enzim yang mampu melunakkan dinding sel sehingga endomikoriza arbuskular dapat berinteraksi dengan baik oleh akar.

b Efek MHB pada pengenalan akar dengan jamur

Berdasarkan teknik ini, MHB memberikan efek berupa mediasi terhadap biomolekul akar dan juga jamur, seperti yang kita ketahui bisa juga akar dan jamur melakukan pengenalan dari enzim atau zat kimia yang dihasilkan masing masing oleh jamur atau akar, tetapi MHB disini dapat berperan mempermudah pengenalan tersebut dengan menghasilkan senyawa senyawa tertentu seperti auksin dan enzim lainnya.

c Efek MHB pada pertumbuhan jamur

Efek MHB lebih ditekankan pada pertumbuhan jamur pada teknik ketiga ini karena bakteri berinteraksi dengan jamur lebih baik karena keterkaitan pada saat pengkulturan jamur dan bakterium sama sama menggunakan media sederhana yang hampir sama. MHB disini memberikan stimulasi nutrisi pada jamur sehingga dapat mendapatkan pertumbuhan yang lebih baik dengan nutrisi yang lebih baik.

d Modifikasi tanah rizosfer oleh MHB

Mekanisme ini dianggap mekanisme secara tidak langsung karena MHB mempengaruhi tanah rizosfer dimana jamur dan akar tersebut berada. Bakteri akan memodifikasi komponen psiko-kimia dari tanah untuk memfasilitasi pembentukan interaksi antara jamur dan akar (Garbaye, 1994:205).

Menggunakan modal 4 teknik tersebut bakteri MHB mampu membantu meningkatkan infeksi mikoriza di akar tanaman. Semakin efektifnya infeksi mikoriza maka akan mengakibatkan optimalnya MVA dalam mengendalikan nematoda di dalam akar. Berkurangnya nematoda menyebabkan kerusakan akar berkurang sehingga suplai air dan hara untuk kebutuhan tanaman dapat terserap baik (Harni, 2012:24). Apabila kebutuhan tanaman terpenuhi maka mengakibatkan hasil dari fotosintesisnya pun tinggi dan mampu disebarkan ke seluruh organ tanaman sehingga mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman tersebut.

2.1.4 Peranan bakteri MHB sebagai *Growth Promoting Rhizobacteri*

Bakteri MHB ternyata bukan hanya memiliki peranan sebagai membantu dalam efektifitas infeksi mikoriza terhadap akar tanaman tetapi bakteri MHB juga sebagai agen pengendali hayati, dan sebagai agen biokontrol. Beberapa diantaranya yakni bakteri dari Genus *Basillus* dan Genus *Pseudomonas* juga mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman yang dikenal dengan *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR), karena mampu meningkatkan ketersediaan nutrisi, menghasilkan hormon pertumbuhan (Bacon dan Hinton, 2007) serta dapat menginduksi ketahanan tanaman yang dikenal dengan *induced systemic resistance* (ISR).

Bakteri PGPR mampu meningkatkan pertumbuhan, seperti berat tajuk dan akar, disebabkan oleh karena bakteri endofit dapat merangsang pembentukan akar lateral dan jumlah akar sehingga dapat memperluas penyerapan unsur hara. Bacon dan Hinton (2007) melaporkan bahwa bakteri endofit ini dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman dengan cara meningkatkan ketersediaan nutrisi tanaman, seperti nitrogen, fosfat, fosfor, dan mineral lainnya, serta merangsang pertumbuhan dengan memproduksi hormon pertumbuhan, seperti auksin dan sitokinin.

2.2 Formulasi

Formulasi adalah pencampuran antara media pembawa dengan organisme hidup dan seringkali dilengkapi dengan bahan tambahan untuk memaksimalkan kemampuan bertahan hidup organisme di suatu penyimpanan. Pada proses formulasi terdapat dua tahap yaitu tahap pembiakan massal dan tahap konsorsium. Komponen dalam melakukan formulasi minimal ada dua yaitu media pembawa dan bahan aktif. Media pembawa yang digunakan adalah limbah cair tahu dan molase. Bahan aktif yang digunakan adalah bakteri *P. diminuta* dan *B. subtilis*.

2.2.1 Perbanyak massal

Perbanyak massal dilakukan dengan tujuan untuk memproduksi atau menumbuhkan bakteri dalam jumlah banyak yang akan digunakan pada tahap formulasi, produksi ini dilakukan secara *in vitro* (Johnson *et al.*, 2001). Pada proses perbanyak massal lebih sering menggunakan media pembawa cair. Perbanyak massal bakteri dapat diproduksi dengan fermentasi semi-padat pada skala kecil, tetapi produksi industri dilakukan oleh fermentasi keadaan cair. Fermentasi semi-padat dan padat dilakukan pada skala kecil untuk penggunaan lokal. Proses fermentasi dilakukan dengan menggunakan fermentor selama melakukan pembiakan massal menggunakan media pembawa cair. Media pembawa semi-padat dan *solid state* proses fermentasi sulit dilakukan karena akan memakan waktu lama, dan parameter tidak bisadisesuaikan. Oleh karena fermentasi cair adalah proses yang lebih disukai di industri.

2.2.2 Konsorsium mikroorganisme dalam media

Produk formulasi bionematisida mikroba didefinisikan sebagai produk yang mengandung biomassa agen pengendali hayati dan kandungan lainnya (senyawa pembawa dan perekat) untuk meningkatkan daya hidup dan efektivitas mikroba. Fungsi dilakukannya formulasi adalah untuk stabilisasi, efisiensi dan keramahan penggunaan, perlindungan dan keberlanjutan, keamanan. Formulasi bionematisida mikroba dapat berupa cair maupun kering. Formulasi cair mengandung suspensi biomassa dalam air, minyak atau kombinasi keduanya (emulsi). Formula kering mengandung biomassa aktif atau inaktif dalam bentuk powder maupun granula. Formula kering dapat langsung digunakan pada target maupun disuspensikan dalam air untuk disemprotkan pada organisme target (Schisler *et al.*, 2004 dalam Ravensberg, 2011).

Empat tujuan dari formulasi pada mikroorganisme:

- a. Untuk menstabilkan propagul yang dikumpulkan dari proses produksi dengan cara proses hilir sehingga mereka akhirnya dapat dikemas, disimpan dan dikirim ke pengguna akhir. Untuk membuat produk yang ramah dalam penggunaannya yang

dapat diterapkan secara ekonomi oleh pengguna akhir dan dapat secara efektif disampaikan ke target.

- b. Untuk melindungi propagul, dapat diterapkan sekali, meminimalisis terhadap bahaya lingkungan dan pengaruhnya, dengan demikian mempertahankan dan bahkan meningkatkan usaha di situs target.
- c. Untuk meminimalkan risiko paparan aplikator selama pemuatan , pencampuran dan menerapkan produk serta pekerja di tanaman , dan untuk konsumen dalam kasus tanaman pangan.

2.2.3 Media pembawa

Bahan pembawa merupakan bahan yang dicampurkan dengan organisme dilengkapi dengan bahan tambahan untuk memaksimalkan kemampuan bertahan hidup di penyimpanan disebut dengan formulasi. Adapun fungsi dasar dari formulasi adalah untuk stabilisasi organisme selama produksi, distribusi dan penyimpanan, mengubah aplikasi produk, melindungi agen dari faktor lingkungan yang dapat menurunkan kemampuan bertahan hidupnya serta meningkatkan aktivitas dari agen untuk mengendalikan organisme target. Formulasi terdiri dari dua tipe, yaitu produk berbentuk padatan (tepung dan butiran) serta berbentuk suspensi (berbahan dasar minyak atau air, dan emulsi) (Jones & Burges, 1998).

Jenis media pembawa ada dua, yaitu media pembawa organik dan media pembawa anorganik. Media pembawa organik berbahan dasar materi yang berasal dari makhluk hidup, berupa limbah sisa ataupun hasil aktivitas makhluk hidup. Contohnya adalah pupuk kandang kotoran sapi, limbah sisa pengolahan tebu (molase dan blotong). Media pembawa anorganik adalah suatu bahan yang berbahan dasar dari senyawa kimia buatan, contohnya adalah talek. Media pembawa organik terbagi lagi menjadi dua bentuk yaitu bentuk padat dan bentuk cair. Media pembawa organik padat contohnya adalah pupuk kandang kotoran hewan dan blotong. Sedangkan media pembawa organik cair contohnya adalah limbah tetes tebu atau molase, air kelapa dan limbah cair tahu.

Giyanto *et. al.* (2009) menyatakan bahwa limbah cair organik sangat berpotensi sebagai media perbanyakan agen hayati karena mengandung komposisi nutrisi yang baik untuk pertumbuhan mikroba seperti karbohidrat, protein, air, asam amino, lemak, garam-garam mineral dan nutrisi lainnya.

Secara umum dapat dikemukakan bahwa limbah cair adalah cairan buangan yang berasal dari rumah tangga dan industri serta tempat-tempat umum lainnya dan mengandung bahan atau zat yang dapat membahayakan kesehatan manusia serta mengganggu kelestarian lingkungan hidup (Kusnopranto, 1985).

Beberapa sumber air limbah antara lain adalah (Kusnopranto, 1985) :

- a Air limbah rumah tangga (*domestic wastes water*)
- b Air limbah kota praja (*municipal wastes water*)
- c Air limbah industri (*industrial wastes water*)

Beberapa parameter yang digunakan dalam pengukuran kualitas air limbah antara lain : (Kusnopranto, 1985).

a. Kandungan Zat Padat

Yang diukur dari kandungan zat padat ini adalah dalam bentuk *Total Solid Suspended* (TSS) dan *Total Dissolved Solid* (TDS). TSS adalah padatan yang menyebabkan kekeruhan air yang tidak larut dan tidak dapat mengendap langsung. TDS adalah padatan yang menyebabkan kekeruhan pada air yang sifatnya terlarut dalam air.

b. Kandungan Zat Organik

Zat organik di dalam penguraiannya memerlukan oksigen dan bantuan mikroorganisme. Salah satu penentuan zat organik adalah dengan mengukur BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) dari buangan tersebut. BOD adalah jumlah oksigen yang dibutuhkan oleh bakteri untuk melakukan dekomposisi aerobik bahan-bahan organik dalam larutan, di bawah kondisi waktu dan suhu tertentu (biasanya lima hari pada 20°C).

c. Kandungan Zat Anorganik

Beberapa komponen zat anorganik yang penting untuk mengawasi kualitas air limbah antara lain : Nitrogen dalam senyawaan Nitrat, Phospor, H₂O dalam zat beracun dan logam berat seperti Hg, Cd, Pb dan lain-lain.

d. Gas

Adanya gas N₂, O₂, dan CO₂ pada air buangan berasal dari udara yang larut ke dalam air, sedangkan gas H₂S, NH₃, dan CH₄ berasal dari proses dekomposisi air buangan. Oksigen di dalam air buangan dapat diketahui dengan mengukur DO (*Dissolved Oxygen*). Jumlah oksigen yang ada di dalam sering digunakan untuk menentukan banyaknya/besarnya pencemaran organik dalam larutan, makin rendah DO suatu larutan makin tinggi kandungan zat organiknya.

e. Kandungan Bakteriologis

Bakteri golongan Coli terdapat normal di dalam usus dan tinja manusia. Sumber bakteri patogen dalam air berasal dari tinja manusia yang sakit. Untuk menganalisa bakteri patogen yang terdapat dalam air buangan cukup sulit sehingga parameter mikrobiologis digunakan perkiraan terdekat jumlah golongan coliform. (MPN/Most Probably Number) dalam sepuluh mili buangan serta perkiraan terdekat jumlah golongan coliform tinja dalam seratus mili air buangan.

f. pH (Derajat Keasaman)

Pengukuran pH berkaitan dengan proses pengolahan biologis karena pH yang kecil akan menyulitkan, disamping akan mengganggu kehidupan dalam air bila dibuang ke perairan terbuka.

g. Suhu

Suhu air buangan umumnya tidak banyak berbeda dengan suhu udara tapi lebih tinggi daripada suhu air minum. Suhu dapat mempengaruhi kehidupan dalam air. Kecepatan reaksi atau pengurangan, proses pengendapan zat padat serta kenyamanan dalam badan-badan air.

1) Limbah cair industri tahu

Produksi agen antagonis seperti *P. fluorescens* dan *B. subtilis* tidak hanya dapat dilakukan pada media laboratorium saja. Sifat saprofitik yang dimiliki agen antagonis tersebut memungkinkan penggunaan media alternatif dari limbah organik cair. Limbah organik cair banyak yang dapat dimanfaatkan sebagai media alternatif seperti limbah cair peternakan dapat dijadikan media untuk pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*, limbah air beras dapat dijadikan media alternatif bagi *Bacillus subtilis* B12 (Ahmadi, 2007), dan limbah cair tahu, tetes dapat dijadikan media untuk pertumbuhan bakteri *P. diminuta* (Prabowo, 2014).

Limbah industri tahu terdiri dari dua jenis, yaitu limbah cair dan padat. Dari kedua jenis limbah tersebut, limbah cair merupakan bagian terbesar dan berpotensi mencemari lingkungan. Sebagian besar limbah cair yang dihasilkan bersumber dari cairan kental yang terpisah dari gumpalan tahu pada tahap proses penggumpalan dan penyaringan yang disebut air dadih atau *whey*. Sumber limbah cair lainnya berasal dari proses sortasi dan pembersihan, pengupasan kulit, pencucian, penyaringan, pencucian peralatan proses dan lantai. Jumlah limbah cair yang dihasilkan oleh industri pembuatan tahu sebanding dengan penggunaan air untuk pemrosesannya. Nuraida (1985) menyatakan bahwa jumlah kebutuhan air proses dan jumlah limbah cair yang dihasilkan dilaporkan berturut-turut sebesar 45 dan 43,5 liter untuk tiap kilogram bahan baku kacang kedelai. Pada beberapa industri tahu, sebagian kecil dari limbah cair tersebut (khususnya air dadih) dimanfaatkan kembali sebagai bahan penggumpalan (Dhahiyat, 1990:8).

Limbah cair industri tahu mengandung bahan-bahan organik kompleks yang tinggi terutama protein dan asam-asam amino (EMDI-Bapedal, 1994) dalam bentuk padatan tersuspensi maupun terlarut (BPPT, 1997a). Adanya senyawa-senyawa organik tersebut menyebabkan limbah cair industri tahu mengandung BOD, COD dan TSS yang tinggi (Tay, 1990; BPPT, 1997a; dan Husain, 2003) yang apabila ke perairan tanpa pengolahan terlebih dahulu dapat menyebabkan pencemaran.

Limbah industri tahu ada dua hal yang perlu diperhatikan yakni karakteristik fisika dan kimia. Karakteristik fisika meliputi padatan total, suhu, warna dan bau. Karakteristik kimia meliputi bahan organik, bahan anorganik dan gas.

Suhu buangan industri yang terkandung di dalam buangan industri tahu pada umumnya sangat tinggi. Senyawa-senyawa organik di dalam air buangan tersebut dapat berupa protein, karbohidrat, lemak dan minyak. Di antara senyawa-senyawa tersebut, protein dan lemak yang jumlahnya paling besar (Nurhasan dan Pramudyanto, 1991) yang mencapai 40% - 60% protein, 25% - 50% karbohidrat, dan 10% lemak (Sugiharto, 1994). Bertambah lama bahan-bahan organik ini volumenya semakin meningkat, dalam hal ini akan menyulitkan pengelolaan limbah, karena beberapa zat sulit diuraikan oleh mikroorganisme didalam air limbah tahu tersebut. Untuk menentukan besarnya kandungan bahan organik digunakan beberapa teknik pengujian seperti BOD, COD dan TOM. Uji BOD merupakan parameter yang sering digunakan untuk mengetahui tingkat pencemaran bahan organik, baik dari industri ataupun dari rumah tangga BPPT (1997a).

Pada umumnya konsentrasi ion hydrogen buangan industri tahu ini cenderung bersifat asam. Komponen terbesar dari limbah cair tahu yaitu protein (N-total) sebesar 226,06 sampai 434,78 mg/L. Sehingga masuknya limbah cair tahu ke lingkungan perairan akan meningkatkan total nitrogen di perairan tersebut.

Gas-gas yang biasa ditemukan dalam limbah adalah oksigen (O_2), hydrogen sulfide (H_2S), ammonia (NH_3), karbondioksida (CO_2) dan metana (CH_4). Gas-gas tersebut berasal dari dekomposisi bahan-bahan organik yang terdapat di dalam air buangan. Air limbah industri tahu sifatnya cenderung asam dengan pH 4-5 (BPPT, 1997a), pada keadaan asam ini akan terdapat zat-zat yang mudah menguap. Hal ini mengakibatkan limbah cair industri tahu mengeluarkan bau busuk.

2) Limbah cair tebu atau molase

Bahan sisa dari industri gula banyak dijumpai hasil utamanya. Dari berbagai bahan sisa yang dihasilkan industri gula, molase merupakan bahan dasar yang berharga

sekali untuk industri dengan fermentasi. Molase adalah sejenis sirup yang merupakan sisa dari proses pengkristalan gula pasir. Molase tidak dapat dikristalkan karena mengandung glukosa dan fruktosa yang sulit untuk dikristalkan. Molase merupakan produk limbah dari industri gula dimana produk ini masih banyak mengandung gula dan asam-asam organik, sehingga merupakan bahan baku yang sangat baik untuk industri pembuatan etanol. Bahan kandungan gula dari molase terutama sukrosa berkisar 40% - 55% (<http://www.whfoods.com>, 2008).

Molase masih mengandung kadar gula yang cukup untuk dapat menghasilkan etanol dalam proses fermentasi, biasanya pH molase berkisar antara 5,5 - 6,5. Molase yang masih mengandung kadar gula sekitar 10% - 18% telah memberikan hasil yang memuaskan untuk pembuatan etanol (Simanjuntak, 2009).

Molase dari tebu dapat dibedakan menjadi 3 jenis. Molase kelas 1, kelas 2 dan "*Black Strap*". Molase kelas 1 didapatkan saat pertama kali jus tebu dikristalisasi. Saat dikristalisasi terdapat sisa jus yang tidak mengkristal dan berwarna bening. Maka sisa jus ini langsung diambil sebagai molase kelas 1. Kemudian molase kelas 2 atau biasa disebut "*Dark*" diperoleh saat proses kristalisasi kedua. Warnanya agak kecoklatan sehingga sering disebut juga dengan istilah "*Dark*". Dan molase kelas terakhir, "*Black Strap*" diperoleh dari kristalisasi terakhir. Warna "*Black Strap*" memang mendekati hitam (coklat tua) sehingga tidak salah jika diberi julukan demikian. "*Black Strap*" ternyata memiliki kandungan yang berguna. Zat-zat tersebut antara lain kalsium, magnesium, potassium, dan besi. "*Black Strap*" memiliki kandungan kalori yang cukup tinggi, karena terdiri dari glukosa dan fruktosa (<http://www.bioetanolindo.com>, 2007). Glukosa dan fruktosa memiliki kandungan C yang dibutuhkan sebagai nutrisi bakteri. Hasil dari penelitian Wulan, (2006) menunjukkan bahwa rasio optimum C:N:P adalah 100:10:1 dengan laju pertumbuhan bakteri sebesar $9,1 \times 10^{11}$ per jam. Konsorsium bakteri yang digunakan adalah *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, dan *Aeromonas hydrophilla*.

Limbah walaupun telah dibuang dan manfaatnya telah berkurang tetapi masih memiliki kandungan nutrisi yang masih dapat dimanfaatkan dengan pengolahan

khusus. Pengolahan tersebut bermacam-macam, dapat berupa pengolahan secara fisik, pengolahan mekanik, pengolahan kimiawi, maupun pengolahan biologis.

Penentuan pengolahan dilakukan berdasarkan kebutuhan penggunaan limbah dan kandungan pada limbah. Bahan baku molase mengandung beberapa komponen yang disajikan dalam Tabel 2.1.

**Tabel 2.1 komponen kandungan dalam molase
(Toharisman dan Santoso, 1999)**

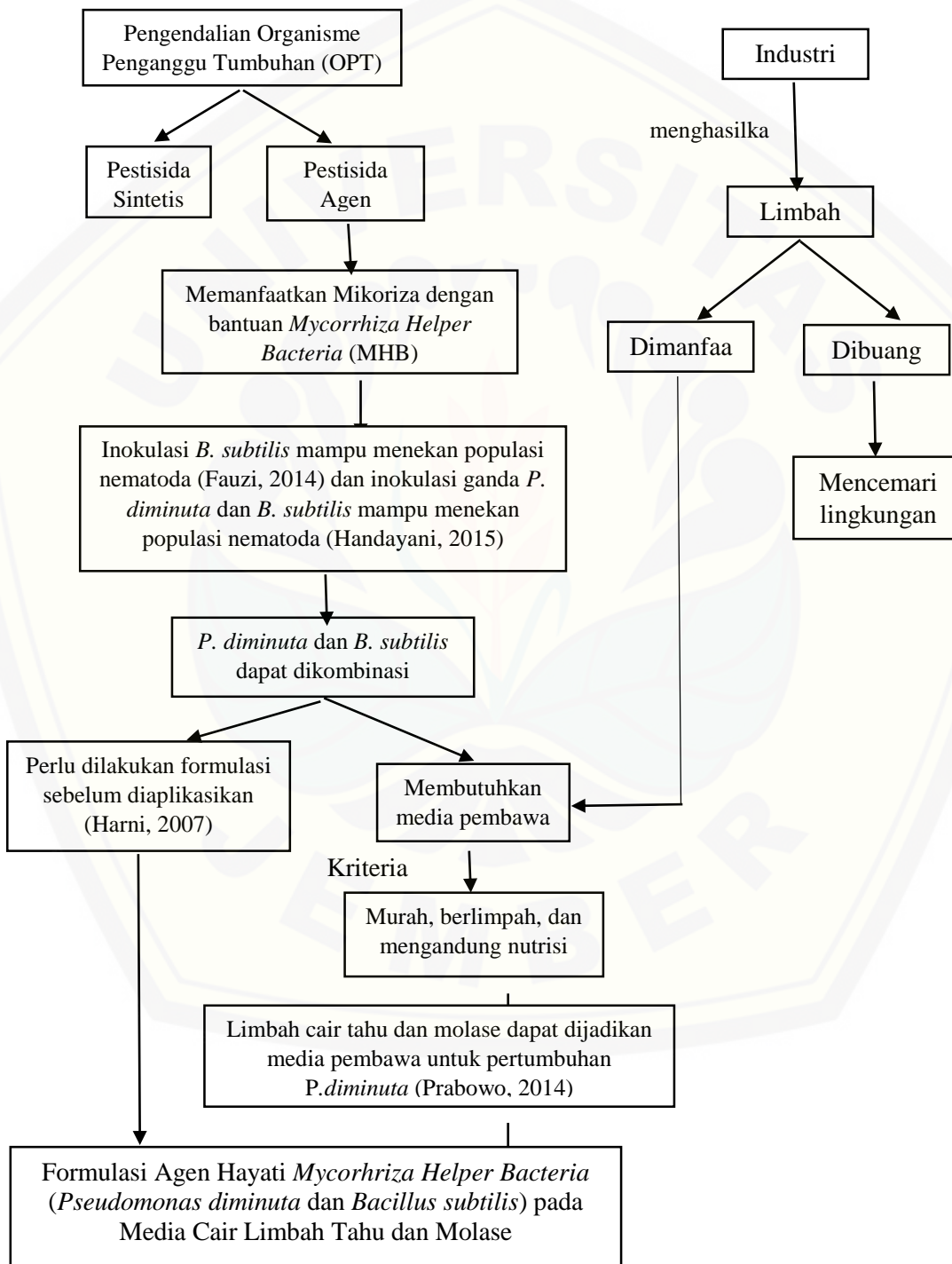
No.	Kandungan	Kisaran	Rata-rata
1.	Air	17-25	20
2.	Senyawa organik		
	Sukrosa	30-40	35
	Glukosa	4-9	7
	Fruktosa	5-12	9
	Gula reduksi lain	1-5	3
	Protein kasar	2.5-4.5	4
	Asam amino	0.3-0.5	0.4
3.	Senyawa anorganik		
	K ₂ O		4.80
	CuO		1.20
	MgO		0.98
	Na ₂ O		0.10
	Fe ₂ O ₃		0.12
	SO ₃		1.90
	Cl		1.80
	P ₂ O ₅		0.60
	SiO ₂ tak terlarut		0.60
4.	Wax, phospholipid, dan sterol		0.40
5.	Vitamin (μ/g)		
	Biotin (H)		2
	Cholin (B ₄)		8.80
	Asam folat (B kompleks)		0.35
	Niacin (B kompleks)		23
	Asam pantothenat (B kompleks)		40
	Pyridoxine (B ₆)		2.50
	Thiamine (B ₁)		4
			0.80

2.2.4 Daya simpan

Daya simpan adalah periode waktu dimana suatu bahan masih memenuhi kriteria awal atau kriteria tertentu. Menurut Rao (1982), jumlah minimum inokulan yang harus terkandung dalam media pembawa pada 15 hari sebelum aplikasi ke lapangan adalah 10^7 sel/gram. Ketersediaan nutrisi merupakan faktor penting yang dapat mempengaruhi daya simpan bakteri pada media pembawa. Menurut Kirsop & Snell (1984) menjelaskan bahwa kemungkinan adanya perubahan karakteristik kultur yang disimpan pada media pembawa (membentuk populasi resisten). Salah satu perubahan adalah terbentuknya endospore pada bakteri, sehingga bakteri mampu bertahan lebih lama dalam media pembawanya.

2.3 Kerangka Berpikir

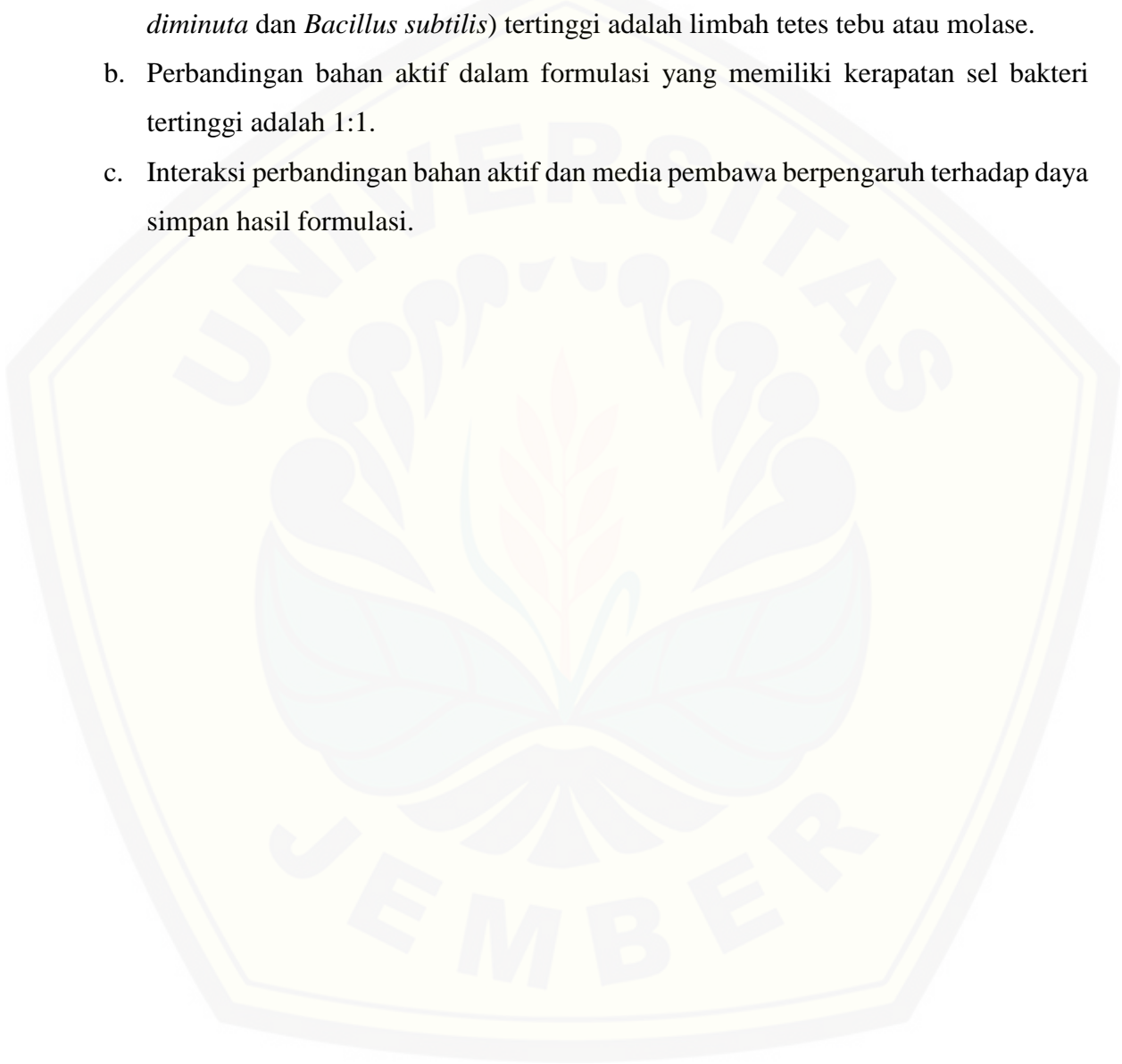
Dasar pemikiran dari penelitian ini dirumuskan berdasarkan kerangka teoritis berikut:



2.4 Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Media pembawa cair yang mempunyai kerapatan sel bahan aktif (*Pseudomonas diminuta* dan *Bacillus subtilis*) tertinggi adalah limbah tetes tebu atau molase.
- b. Perbandingan bahan aktif dalam formulasi yang memiliki kerapatan sel bakteri tertinggi adalah 1:1.
- c. Interaksi perbandingan bahan aktif dan media pembawa berpengaruh terhadap daya simpan hasil formulasi.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi FKIP Biologi Universitas Jember. Waktu penelitian ini dilaksanakan pada Oktober 2015 hingga Februari 2016.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yang pertama adalah media pembawa berupa limbah cair tahu dan molase, serta yang kedua adalah konsentrasi antara bakteri *B.subtilis* dan *P.diminuta* dengan serial konsentrasi (perbandingan volume dalam 100 ml) 1:1, 1:2, 2:1, 2:3, dan 3:2.

3.3.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kerapatan sel bakteri, pengukuran pH, dan didukung oleh data kadar Nitrogen.

3.3.3 Variabel kontrol atau variabel kendali

Variabel kontrol atau variabel kendali adalah variabel yang dikendalikan sehingga variabel bebas dan terikat tidak dipengaruhi oleh faktor luar yang tidak diteliti. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a Media cair limbah tahu dan molase diambil ditempat yang sama pada waktu yang sama.

- b Biakan bakteri *P. diminuta* yang digunakan untuk penelitian yang diperoleh koleksi Laboratorium Mikrobiologi Tanah UNPAD dan *B. subtilis* diperoleh koleksi Laboratorium mikrobiologi FKIP Biologi UNEJ.
- c Metode yang digunakan untuk menanam bakteri *B.subtilis* dan *P.diminuta* pada cawan petri yaitu metode *spread plate* dengan volume 0.1 ml dan konsentrasi 10^{-7} .
- d Medium yang digunakan pada saat *spread plate* yaitu medium selektif Pseudomonas Agar F (Base) 1.10989.0500 Merck dan Bacillus Agar Fluka Analytical.
- e Perbanyak massal dan formulasi dilakukan ditempat yang sama dan hasilnya disimpan ditempat yang sama dalam suhu ± 25 °C.

3.4 Parameter Penelitian

Parameter dilakukan terhadap kerapatan sel bakteri, pengukuran pH dan didukung oleh data kandungan Nitrogen yang diamati pada hari ke-3, ke-7, ke-30, dan ke-60 sebagai berikut:

a. Kerapatan sel

Pengambilan data kerapatan sel sel diukur dari kerapatan sel bakteri yang dilakukan pada tahap perbanyak massal (sebelum formulasi) dan tahap setelah formulasi.

- 1) Perhitungan kerapatan sel bakteri yang dilakukan pada tahap perbanyak massal (sebelum formulasi) dilakukan pada umur 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Pengenceran 10^{-7} kemudian diinkubasi selama 24 jam setelah itu melakukan perhitungan kerapatan sel dengan rumus $\sum \text{sel} = \sum \text{koloni} \times 1/\text{Faktor pengenceran}$. Tujuan pengamatan kerapatan sel pada tahap ini adalah untuk mengetahui kurva pertumbuhan bakteri pada umur 24 jam, 48 jam dan 72 jam sebagai dasar pengambilan waktu inokulasi yang optimum pada saat formulasi.
- 2) Perhitungan kerapatan sel bakteri yang dilakukan pada tahap setelah formulasi, diamati pada hari ke-3, ke-7, ke-30, dan ke-60. Cara pengujian dilakukan melalui pengenceran berseri menggunakan metode Hsu *et al.* (1994). Pengenceran 10^{-7}

kemudian diinkubasi selama 24 jam setelah itu melakukan perhitungan kerapatan sel dengan rumus $\sum \text{sel} = \sum \text{koloni} \times 1/\text{Faktor pengenceran}$.

b. pH

Pengambilan data pengukuran pH dilakukan pada tahap perbanyakan massal (sebelum formulasi) dan tahap setelah formulasi.

- 1) Pengukuran pH tahap pertama dilakukan pada tahap perbanyakan massal (sebelum formulasi) dilakukan pada umur 24 jam, 48 jam dan 72 jam.
- 2) Pengukuran pH tahap kedua dilakukan setelah formulasi, diamati pada hari ke-3, ke-7, ke-30, dan ke-60. Cara pengukuran dengan menggunakan pH meter digital.

c. Kandungan Nitrogen

Pengambilan data kandungan nitrogen dilakukan pada limbah tahu dan molase, kemudian setelah formulasi diamati pada hari ke-3, dan ke-7. Untuk parameter kandungan nitrogen dilakukan uji di laboratorium Politeknik Negeri Jember dengan menyerahkan sample 100 ml pada setiap uji.

3.5 Definisi Operasional

Peneliti memberikan pengertian untuk menjelaskan operasional penelitian agar tidak menimbulkan pengertian ganda terhadap pembaca. Adapun definisi operasional dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a Bakteri MHB adalah kumpulan bakteri yang mampu membantu mikoriza bersimbiosis dengan sel-sel korteks akar tanaman. Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *Pseudomonas diminuta* dan *Bacillus subtilis*
- b Formulasi konsorsium adalah persiapan produk atas bahan aktifnya dengan penggabungan antar bahan aktif atau bahan aktif dengan bahan pelengkap. Formulasi konsorsium yang dilakukan pada penelitian ini adalah mencampur 2% limbah cair tahu dengan bakteri (*Pseudomonas diminuta* dan *Bacillus subtilis*) dengan perbandingan volume tertentu dan mencampur 2% molase dengan bakteri

- (*Pseudomonas diminuta* dan *Bacillus subtilis*) dengan perbandingan volume tertentu.
- c Media pembawa adalah bahan yang dicampurkan dengan organisme dilengkapi dengan bahan tambahan untuk memaksimalkan kemampuan bertahan hidup di penyimpanan. Media pembawa yang digunakan pada penelitian ini adalah limbah cair tahu 2% dan molase 2%.
 - d Limbah merupakan bahan yang sudah tidak digunakan lagi atau dibuang karena telah berkurang nilai manfaatnya. Limbah tahu yang diambil adalah limbah tahu cair yang merupakan air buangan sisa dari pengendapan sari kedelai. Molase adalah limbah tebu cair yang diperoleh dari buangan cair limbah dari pabrik gula.
 - e Daya simpan adalah masa atau jangka waktu suatu bahan tidak mengalami perubahan signifikan secara fisik maupun kandungannya. Pengamatan daya simpan yang dilakukan meliputi pengamatan kerapatan sel bakteri dan pengamatan pH hasil formulasi pada hari ke-3, ke-7, ke-30, dan ke-60 setelah dilakukan formulasi, serta didukung oleh data kandungan nitrogen hasil formulasi pada hari ke-3 dan hari ke-7.

3.6 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan percobaan RAL (Rancangan Acak Lengkap) faktorial dengan 2 faktor. Faktor pertama adalah media pembawa yaitu limbah cair tahu dan molase, faktor kedua adalah berbagai perbandingan volume bakteri *B. subtilis* : *P. diminuta* yaitu 1:1, 1:2, 2:1, 2:3, dan 3:2. Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap, yaitu tahap perbanyakan massal dan tahap formulasi. Pada tahap perbanyakan massal dilakukan penentuan persentase medium yang terbaik oleh tim peneliti UNPAD dan didapat persentase medium terbaik adalah 2% untuk limbah cair tahu dan molase. Pada tahap formulasi dilakukan pencampuran atau konsorsium dua bakteri yaitu *B. subtilis* dan *P. diminuta* dengan berbagai perbandingan volume dalam 100 ml (1:1, 1:2, 2:1, 2:3, dan 3:2). Setiap perlakuan memiliki 3 pengulangan dan tiap ulangan digunakan serial pengenceran 10^{-7} , dari setiap serial pengenceran tersebut terdiri atas 2 sampel

perhitungan koloni bakteri pada cawan dengan metode *spread plate*. Pengamatan kerapatan sel dan pH dilakukan pada hari ke-3, hari ke-7, hari ke-30, hari ke-60.

Pada tahap formulasi dilakukan uji pendahuluan terlebih dahulu, dengan melakukan pengamatan hingga hari ke-7. Setelah itu dilakukan uji akhir dengan melanjutkan pengamatan dengan dua perbandingan bahan aktif dengan kerapatan tertinggi dari hasil pengamatan uji pendahuluan. Hasil dari uji pendahuluan menunjukkan bahwa P1 (Bakteri *B.subtilis* : *P.diminuta*, 1:1) dan P4 (Bakteri *B.subtilis* : *P.diminuta*, 2:3) memiliki kerapatan sel tertinggi dibandingkan serial perbandingan bahan aktif yang lainnya. Desain penelitian uji pendahuluan disajikan pada Tabel 3.1 dan desain penelitian uji akhir disajikan pada Tabel 3.2.

Tabel 3.1 Desain Penelitian Uji Pendahuluan

Media pembawa Perbandingan bahan aktif	P1	P2	P3	P4	P5
	M1	M1P1	M1P2	M1P3	M1P4
M2	M2P1	M2P2	M2P3	M2P4	M2P5

Keterangan:

- M1 = Molase
- M2 = Limbah cair tahu
- P1 = Bakteri *B.subtilis* : *P.diminuta*, 1:1
- P2 = Bakteri *B.subtilis* : *P.diminuta*, 1:2
- P3 = Bakteri *B.subtilis* : *P.diminuta*, 2:1
- P4 = Bakteri *B.subtilis* : *P.diminuta*, 2:3
- P5 = Bakteri *B.subtilis* : *P.diminuta*, 3:2

Tabel 3.2 Desain Penelitian Uji Akhir

Media pembawa Perbandingan bahan aktif	P1	P2
	M1	M1P1
M2	M2P1	M2P2

Keterangan:

- M1 = Molase
- M2 = Limbah cair tahu
- P1 = Bakteri *B.subtilis* : *P.diminuta*, 1:1
- P2 = Bakteri *B.subtilis* : *P.diminuta*, 2:3

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat penelitian

Peralatan yang digunakan antara lain adalah *laminar air flow*, *shaker*, *vortex*, kompor listrik, autoklaf, mikropipet, lemari es, inkubator, tip, cawan petri, tabung reaksi, gelas ukur, gelas beaker, *Erlenmeyer*, pengaduk/spatula, bunsen, kaca perata medium, pH meter, timbangan, penggaris.

3.7.2 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan untuk yaitu *Pseudomonas diminuta* (Koleksi lab. mikrobiologi FKIP Biologi UNEJ) dan *Bacillus subtilis* (koleksi lab mikrobiologi tanah Unpad), *Nutrient Agar*, *Nutrient Broth*, molase, limbah tahu cair, medium selektif *Pseudomonas* dan *Bacillus*, NaOH 0.1 M, HCl 0.1 M, alkohol 70%, aquades, kapas, tisu, *plastic wrap*, *aluminium foil*, karet, kertas kayu, kertas label, masker.

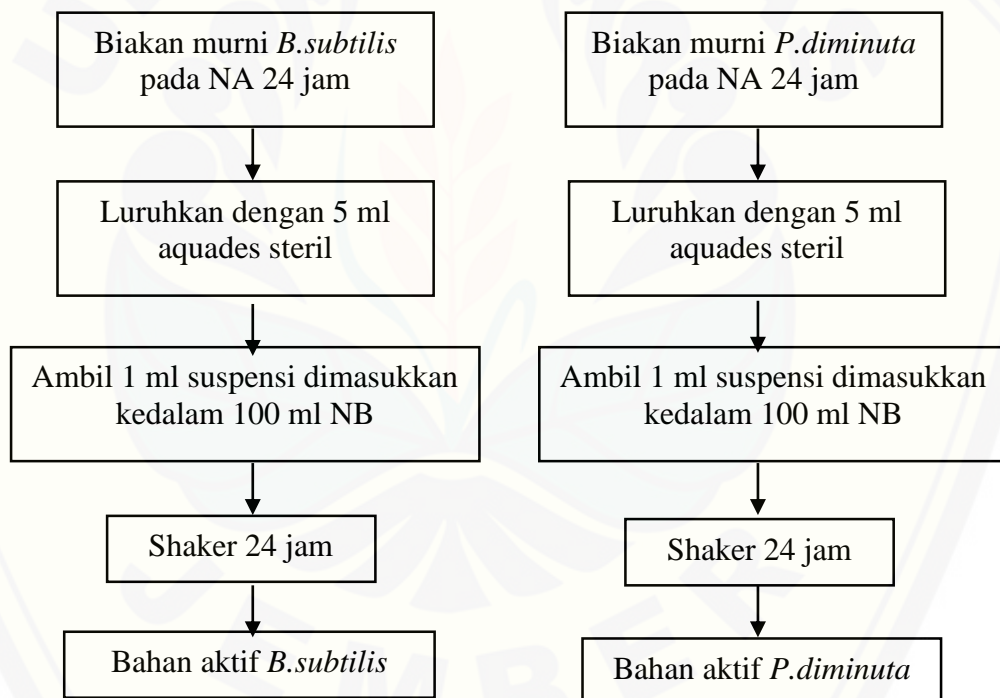
3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Peremajaan isolat (pembuatan propagul mikroba)

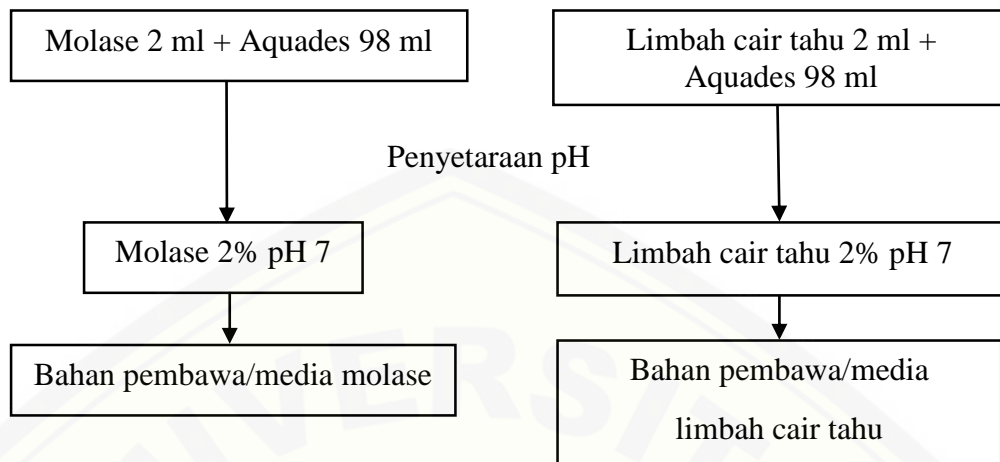
Isolat bakteri disiapkan dengan cara sebagai berikut: biakan murni *B. subtilis* dan *P. diminuta* masing-masing ditumbuhkan pada media *Nutrient Agar* (NA) pada tabung dengan metode *streak*. Setelah diinkubasikan dalam inkubator bersuhu ± 25 °C selama 24 jam, disuspensikan ke dalam 5 ml aquades steril, dikocok menggunakan vorteks supaya homogen, sehingga terbentuk suspensi. Sebanyak 1 ml suspensi isolat tersebut diencerkan hingga 10^{-6} kemudian diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam 100 ml media *Nutrient Broth* (NB) dalam *Erlenmeyer* berkapasitas 100 ml, kemudian digoyangkan atau dishaker selama 24 jam. Penjelasan lebih lanjut mengenai langkah-langkah pembuatan propagul bakteri dapat dilihat pada Gambar 3.1.

3.8.2 Penyiapan medium cair dan media pembawa

Tahap penyiapan medium cair dan media pembawa yang berasal dari limbah cair tahu dan molase dilakukan sebelum melakukan perbanyakan massal. Limbah cair tahu dan molase masing-masing diambil sebanyak 2 ml kemudian dicampurkan aquades steril hingga volumenya menjadi 100 ml. Sehingga akan didapatkan konsentrasi limbah cair tahu dan molase 2%. Kemudian dilakukan penyetaraan pH menggunakan penambahan KOH 1M atau HCl 1M hingga mencapai pH netral (pH=7) lalu disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C hingga tekanan 16 atm. Penjelasan lebih lanjut mengenai langkah-langkah penyiapan bahan pembawa/media cair dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.1 Alur pembuatan propagul mikroba



Gambar 3.2 Alur penyiapan bahan pembawa/media cair

3.8.3 Perbanyak massal

Tahapan berikutnya setelah penyiapan medium cair dan media pembawa adalah tahap perbanyak massal sebagai berikut: Bakteri *B.subtilis* dan *P.diminuta* yang telah dishaker 24 jam pada tahap pembuatan propagul diambil 1 ml untuk dimasukkan kedalam aquades steril 98 ml dalam Erlenmeyer berkapasitas 100 ml. 1 ml limbah cair tahu dan molase yang telah disiapkan sebelumnya, yaitu limbah cair tahu dan molase pada konsentrasi 2% juga dimasukkan kedalam aquades steril 98 ml dalam Erlenmeyer yang telah berisi 1 ml bakteri. Sedangkan untuk kontrol bakteri tetap ditumbuhkan dalam medium *Nutrient Broth*, kemudian dishaker selama 72 jam kemudian dilakukan pengamatan pH dan kerapatan sel bakteri.

Pengamatan pH diukur menggunakan pH meter dan pengamatan kerapatan sel bakteri dilakukan melalui pengenceran berseri menggunakan metode Hsu *et al.* (1994). Inokulasi pada medium Nutrient agar dalam cawan dilakukan dengan metode spread plate. Sebelum diinokulasikan dilakukan pengenceran hingga 10^{-7} setiap serial pengenceran dilakukan duplo penanaman dalam cawan. Kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam. Pengamatan kerapatan sel bakteri dilakukan dengan perhitungan koloni. Cara menghitung sel relatif / cfu per ml sebagai berikut:

$$\sum \text{sel} = \sum \text{koloni} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

3.8.4 Formulasi konsorsium agen hayati

Tahapan setelah dilakukan perbanyakan massal adalah formulasi agen hayati. Media pembawa cair dengan konsentrasi 2% dan bahan aktif (bakteri *B.subtilis* dan *P.diminuta*) telah dishaker selama 72 jam dan diamati kerapatan sel dan pH pada umur 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Tahap selanjutnya dilanjutkan dengan pencampuran *B.subtilis* dengan *P.diminuta* dengan serial perbandingan volume *B.subtilis*: *P. diminuta* 1:1, 1:2, 2:1, 2:3, dan 3:2 (dalam 100ml) dengan media pembawa limbah cair tahu dan molase pada masing-masing serial. Hasil konsorsium disimpan selama 60 hari dan diamati pada hari ke-3, hari ke-7, hari ke-30, dan hari ke-60. Pengamatan yang dilakukan meliputi pengamatan kerapatan sel sel dengan cara melakukan perhitungan kerapatan sel, dan ditambah dengan pengukuran pH dan pengukuran kadar nitrogen. Untuk pengamatan kadar nitrogen hanya dilakukan pada hari ke-3 dan hari ke-7, hari ke-30, dan hari ke-60.

3.8.5 Pengamatan

Pengamatan hasil formulasi dilakukan terhadap daya simpan dari hasil formulasi. Kerapatan sel bahan aktif dan pH dalam media pembawa merupakan tolak ukur masa kadaluarsa biopestisida tersebut. Apabila daya simpan bahan aktif bertahan semakin lama, maka masa kadaluarsa biopestisida tersebut semakin lama pula. Adapun cara pengujian dilakukan melalui pengenceran berseri menggunakan metode Hsu *et al.* (1994). Setelah konsorsium biopestisida disimpan pada suhu ruang ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) dan kerapatan sel bahan aktif diamati pada hari ke-3, hari ke-7, hari ke-30, hari ke-60. Selama pengamatan dilakukan perhitungan koloni untuk menentukan kerapatan sel sebagai penentu utama kerapatan sel, dan mengukur pH hasil formulasi. Selain itu juga dilakukan uji Nitrogen pada hari ke-3 dan hari ke-7 pada uji akhir sebagai data pendukung. Cara menghitung sel relatif / cfu per ml sebagai berikut :

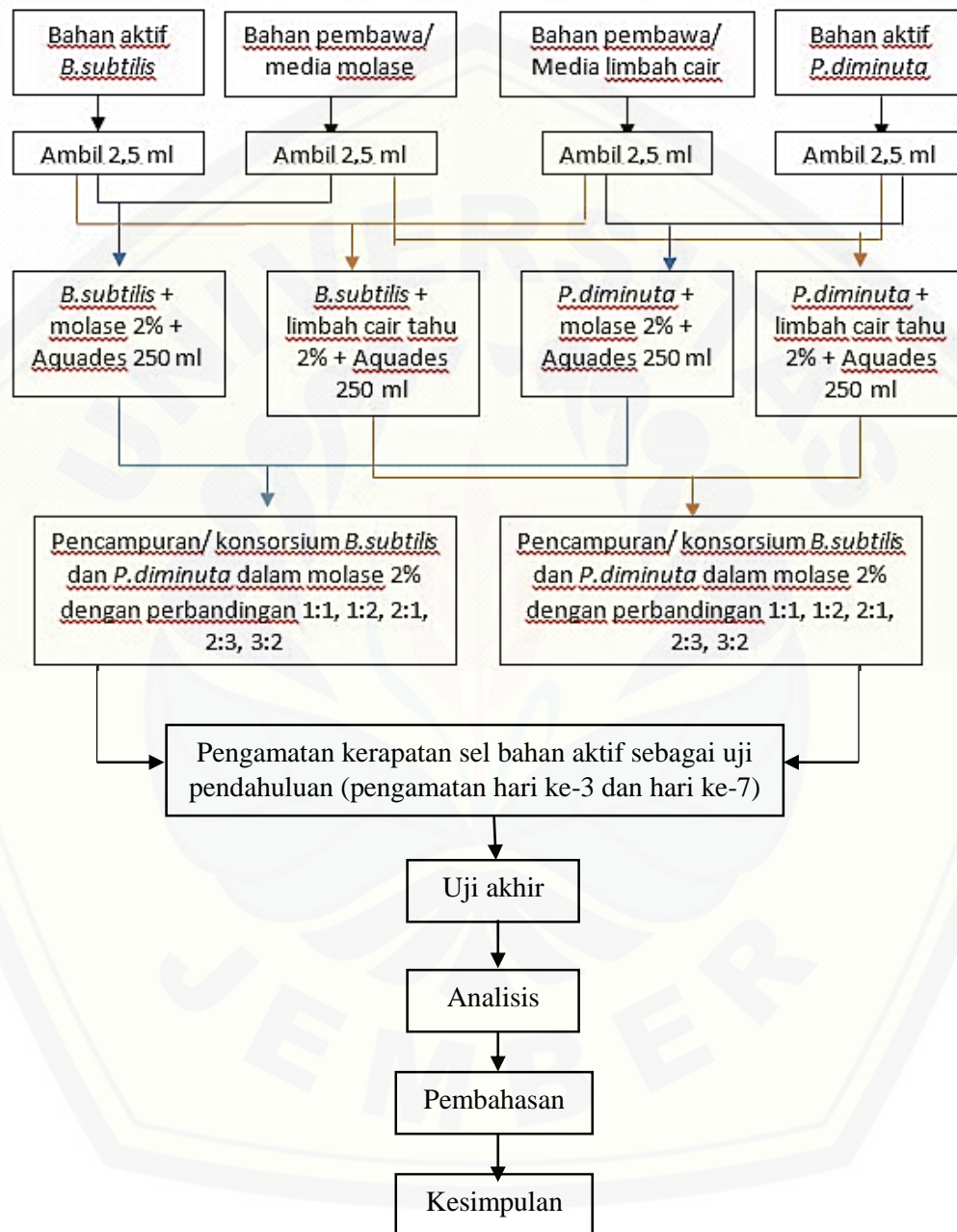
$$\sum \text{ sel } = \sum \text{ koloni } \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

3.9 Analisis Data

Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan ANOVA *General Linear Model Univariate* dengan taraf signifikansi 95% ($p < 5\%$). Jika hasilnya signifikan maka dilanjutkan dengan membandingkan hasil yang diperoleh dari tiap perlakuan menggunakan uji Duncan dengan derajat kepercayaan 95%.



3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.3 Alur penelitian

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

- a. Media berpengaruh secara nyata terhadap kerapatan sel bakteri *B.subtilis* dan *P.diminuta* hingga pengamatan hari ke-30, media dengan kerapatan sel bakteri tertinggi adalah media molase.
- b. Perbandingan berpengaruh secara tidak nyata terhadap kerapatan sel bakteri *B.subtilis* dan *P.diminuta* hampir disetiap pengamatan, perbandingan bahan aktif yang memiliki kerapatan sel bakteri tertinggi adalah perbandingan 2:3.
- c. Pengaruh perlakuan media tidak berinteraksi dengan perbandingan bahan aktif terhadap daya simpan bakteri *B.subtilis* dan *P.diminuta* hampir disetiap pengamatannya.

5.2 Saran

Berdasarkan kesimpulan di atas, terdapat saran-saran berikut:

- a. Perlu dilakukan upaya reformulasi karena hasil pengamatan kerapatan sel masih fluktuatif dan pH memiliki kecenderungs n terus meningkat.
- b. Perlu dilakukan penelitian tentang formulasi menggunakan bahan aktif (bakteri lain) dan bahan pembawa (media lain) dengan nutrisi yang lebih baik selain molase dan limbah tahu sebagai medianya.



DAFTAR PUSTAKA

- Ahmadi, Heri. 2007. *Skrining, Pembiakan masal, dan induksi sporulasi agen antagonis penyakit kudis (Streptomyces scabies) pada kentang*. Skripsi. Bogor: Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Asyiah et al., 2010). Asyiah, N. I., Soekarto, M. Husain, Reginawanti H. 2010. Biocontrol Of Potato Cyst Nematode *Globodera rostochiensis* By Rhizobacter Isolates On Potato. *Dalam* Suharsono (ed). Proceeding of Internasional Biotechnology Seminar, UMM.
- Backman JM, Andrade G, Biancioto V, Dowling D, LohkreS, Bonfante P, O'Gara F, Azcon-Aguilar C. 1997. *Impact on arbuscular mycorrhiza formation*. Canada: Mycologue Publications.
- Bacon, J.B. dan Wiryadiputra, S. 2007. Perkembangan nematoda parasit pada kopi robusta yang diinokulasi jamur mikoriza ber-VA (*Parasitic nematode development on robusta coffea inoculated by VAM fungi*) dalam Soetisna, U.; Tappa, B.; Sukara, E.; Sukiman, H.I.; Widyastuti, Y.; Ermayanti, T.M.; Imelda, M.; Prayitno, N.R.; Loedin, I.H.S. (eds.). Prosiding seminar hasil penelitian dan pengembangan bioteknologi kedua, Bogor, 6-7 Sep 2007.
- Baker, K.F dan Cook, R.J. 1974. Biocontrol of plant pathogens. The Americaa Phytopathology Soceity. St. Paul MN.
- Bioetanolindo. 2007. Pembuatan etanol. <http://www.bioetanolindo.com>, Diakses tanggal 25 Maret 2015.
- BPPT, 1997a Pembuatan etanol. <http://www.BPPT.co.id>. Diakses tanggal 25 April 2015.
- Brykowski, F.J. *Ammonia and Synthesisi Gas*. Noyes: Park Ridge.
- Bule, M. Rekha, S.S. 2010. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Aquos Extract from the Compactin Producing Fungal Strain. *Process Biochemistry Journal*. 44:939-943.
- Coe, Richard. 2001. Analyzing Ranking and Rating Data from Participatory On- Farm Trial. N.p.: SSC/ICRAF, 250 PP.

- Cook, R.J. dan Baker, K.F. 1986. Characterization of Antibiotic Produced by Strain of *Pseudomonas fluorescens* Inhibitory to *Gaeumannomyces graminis var tritici* and *Phytium spp.* *Antimicrob. Journal Agent and Chemoter.* 29:488-495.
- Desmond BA dan Trappe JM. 1980. Factors affecting spore germination of vesicularArbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus epiganeus*. *Mycology.* 72: 457-463.
- Dhahiyat, V. H. 1990. *Pengantar Nematologi Tumbuhan.* Gadjah Mada University. Yogyakarta.
- Duponnois R, Garbaye J. 1990. Some mechanisms involved in growth stimulation of ectomycorrhizal fungi by bacteria. *Can J Bot* 68:2148–2152.
- Douds J., D. D., G. Nagahashi, P.R. Hepperly. 2010. On-farm Production of Inoculum of Indigenous Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Assessment of Diluent of Compost for Inoculum Production. *Bioresource Technolog.y* 101. 2326-2330.
- Dwipayana dan Ariesyady, Herto Dwi. 2009. Identifikasi Keberagaman Bakteri Pada Lumpur Hasil Pengolahan Limbah Cat Dengan Teknik Konvensional. *Jurnal Teknik Lingkungan.* Bandung: ITB.
- Erlina, A., S. Declerck, and D. De Waele. 2002. *Effect of Glomus Intrdices on the Reproduction of the Burrowing Nematoda (Radhopolus similis) in Dixenic Culture.* *Mycorrhiza.* 11:49-51.
- Fauzi, Z. I. 2014. *Pengaruh Micorrhiza Helper Bacteria (Pseudomonas diminuta dan Bacillus subtilis C.) Terhadap Populasi Nematoda Parasit (Pratylenchus coffea Z.) dan Pertumbuhan Tanaman Kopi Arabika.* Skripsi. Jember: Jurusan Pendidikan MIPA Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Jember.
- Frey-Klet, Garbaye. 2005. Mychorriza Helper Bacteria: a Promising Model For the Genomic Analysis of Fungal-Bacterial Interactin. *New Phytol* 168:48.
- Ganesan, P., and S.S Gnanamanickam. 1986. *Biological control of Sclerotium rolfsii Sacc. In peanut by inoculation with Pseudomonas fluorescens Centre of advances study in Botany.* India:University of Madras.
- Garbaye J. 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 128:197-210.

- Handayani, Nur. R. H, 2015. *Pengaruh Inokulasi Ganda Mycorrhiza Helper Bacteria (Mhb) dan Mikoriza (Glomus Spp.) dalam Mengendalikan Populasi Nematoda Pratylenchus Coffeae Z. dan Meningkatkan Pertumbuhan Tanaman Kopi Arabika (Coffea arabica L.)*. Skripsi. Jember: Jurusan Pendidikan MIPA Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Jember.
- Harni. R., Munif, A., Supramana, Mustika, I. 2007. *Potensi Bakteri Endofit*. <http://ditjenbun.deptan.go.id/bbpptpmedan/berita-178-pengenalan-nematodaparazit-akar-pada-tanaman-kopi.html>. Diakses tanggal 25 Februari 2015.
- Hartatik dan Widoati. 2010. Pupuk. (Serial on line) <http://balittanahlitbang>. Diakses 20 September 2015.
- Hatmanti A. 2000. Pengenalan Bacillus Spp. *Oseana*,25(1): 31-41.
- Hoben, H.J, Somasegaran. 1994. *Handbook for Rhizobia*. Springer Verlag, Nem York.
- Holt, J.G, et.al (1994). *Bergey's Manual of Detrmative Bacteriology, 9th Ed*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Hsu, S.T., C.C. Chen, H.Y. Liu, and K.C. Tzeng. 1994. Colonization of Roots and Kontrol of Bacterial Wilt of Tomato by *Pseudomonas fluorescens*. In Hartman, G. L, and A.C. Hayward. (Eds.). *Bacterial Wilt. Proceeding Of an International Conference Aciar*.45:305-311.
- Husain, E.F. 2003. *Observasi dan Identifikasi Spora Cendawan Mikoriza Arbuskular (CMA) pada berbagai Rhizosfer di Lahan Kritis Sumatera disajikan pada Seminar Nasional Mikoriza "Percepatan Sosialisasi Teknologi Mikoriza untuk Mendukung Revitalisasi Kehutanan"*. Bogor: Pertanian dan Perkebunan.
- ITIS.gov. 2012. (Ehrenberg, 1835) Cohn, 1872. Bacterial Nomenclature up-to-date website version Juni-2012. http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=958555 (diakses tanggal 17 Oktober 2015).
- IT4P, 2015. Black Polycarbonate Membranes. <http://www.it4p.be/enUS/product/black-polycarbonate-track-etched-membranes.html>. Diakses tanggal 21 Januari 2016.
- Johnson, Arthur. G dkk. 2001. *Mikrobiologi dan Immunologi*. Jakarta: Binarupa Aksara.

- Kompasiana, 2013. Dampak limbah industri terhadap lingkungan. <http://green.kompasiana.com/polusi/2013/01/02/dampak-limbah-industri-gula-terhadap-lingkungan-521670.html>. Diakses tanggal 20 Mei 2015.
- Krieg, N.R., Holt, J.G., Sneath, P.H.A, James, T.S., Williams, S.T.1994. Bergeys Manual[®] of Determinative Bacteriology: Ninth edition. Baltimore: William & wilkins
- Kusnoputranto, 1985. Studies on nematodes in coffee soils of South India. 7. Histopathology and host-parasitic relationship of *Pratylenchus coffeae* and on Pseudomonads strains used as inoculants for bio control of soilborne fungal plant pathogens. *App Envir Microbiol* 64:2304-2307. Pengendali Nematoda Peluka Akar (*Pratylenchus brachyurus*) pada Nilam. *Journal of Bioscience*, 14(1): 7-12.
- May N.L. 2011. *Diversitas Bakteri Asal Spora Fungi Mikoriza Arbuskula Gigaspora sp. dan Glomus sp. serta Potensinya sebagai Mycorrhiza Helper Bacteria* [Tesis]. Bogor: Program Studi Silvikultur Tropika, IPB.
- McMilan, S. 2007. *Promoting Growth with PGPR the Canadian Organics Grower*. SoilFoodweb Canada Ltd. Soil Biology Lab & Learning Centre.
- M. Yazid, Aris Bastianudin. 2010. *Pengaruh Stimulan Asam Asetat terhadap Efisiensi Pengikatan Uranium dalam Bioremediasi Lingkungan Menggunakan Bacillus sp. dan Pseudomonas sp.* Prosiding PPI-PDIPTN Yogyakarta.
- Nunang, L.M. 2011. *Diversitas Bakteri Asal Spora Fungi Mikoriza Arbuskula Gigaspora sp. dan Glomus sp. serta Potensinya sebagai Mycorrhiza Helper Bacteria*. Tesis Sekolah Pascasarjana IP. Bogor. 63p.
- Peraturan Pemerintah Nomor 44 Tahun 1995 Tentang Pupuk Tanaman. Jakarta: Presiden Republik Indonesia.
- Prabowo, Annasa. 2014. *Kajian Jenis Limbah dan Lama Penyimpanan terhadap Daya Tahan Pseudomonas diminuta*. Skripsi Universitas Jember.
- Purnomo, Imam. 2010. Pemanfaatan Limbah Tahu Menjadi Produk Nata De Soya, Solusi Penanganan Lingkungan. *Biofarm Jurnal Pertanian*, 13(9):73-80.
- Rao, S. 1982. *Biofertilizers in Agriculture*. Oxford & IBH, New Delhi.

- Rao, M.A., L. Gianfreda, A.A. Palmiero, and Violante. 1996. Interaction of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes. *Soil Sci* 161:751-760.
- Richana, N., P. Lestari, N. Chilmijati, dan S. Widowati. 1999. *Karakterisasi Bahan Berpati (Tapioca, Garut, Dan Sagu) dan Pemanfaatannya Menjadi Glukosa Cair*. Prosiding PATPI.
- Rizqiati, Loeffler Von AH, Lindermann A, Schonbeck F. 2008. Stimulation of vesicular arbuscular mycorrhiza fungi by fungicide or rhizosphere bacteria. *Mycorrhizae* 2:167173.
- Serfoji, P., Rajeshkumar, S. dan Selvaraj, T. 2010. Management of root-knot nematoda, *Meloidogyne incognita* on tomato cv Pusa Ruby. by using Perkebunan Surabaya.
- Segers, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Torck, U., Hoste, B., Dewettinck, D., Falsen, E., Kersters, K., Vos, P.D. 1994. *Classification of Pseudomonas diminuta Leifson and Hugh 1954 and Pseudomonas vesicularis Busing, Doll, and Freytag 1953 in Brevundimonas gen. nov. as Brevundimonas diminuta comb. nov. and Brevundimonas vesicularis comb. nov.*, Respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(3): 499-510.
- Siddiqui AZ, Pichtel. 2008. *Mycorrhizae: an Overview, Mychorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Verlag Berlin Heidelberg: Springer.
- Simanjuntak, 2009. *Pengenalan Nematoda Parasit Akar pada Tanaman Kopi*. two species of coffee. *J Coffee Res* 12:23-30.
- Utami, 2001. Isolasi dan Identifikasi Fungi Mikoriza Arbuskular (Fma) secara Mikroskopis pada Rhizosfer Tanaman Jeruk (*Citrus sp.*) di Desa Kerta, Kecamatan Payangan, Kabupaten Gianyar. *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika*. ISSN: 2301-6515.
- Vermicompost, AM fungus, Glomus aggregatum and mycorrhiza helper bacterium, *Bacillus coagulans*. *Journal of Agricultural Technology* Vol.6(1): 37-45.
- Vivas A, Barea JM, Azcon R. 2005. *Brevibacillus brevis* isolated from cadmium- or zinc-contaminated soils improves in vitro spore germination and growth of *Glomus mosseae* under high Cd or Zn Concentrations. *Microbial Ecol* 49:416-424.

- Vladimir *et al.* Vuurde, Van . J.W.L. and M.E. Requanto. 2002. Endophyte management as Tool Optimize Plant Quality. http://www.Ag.auburn.edu/m/lowen/argentina/scripvan_manuscript/van_vuur.html. Diakses 10 April 2015.
- Whfoods., 2008. Molase (Limbah Tebu yang Bermanfaat). <http://www.whfoods.com> Diakses tanggal 25 Maret 2015.
- Widianti, D. U. 2004. Dekolorisasi Limbah Cair Pabrik Gula (molase) dengan menggunakan Bakteri *Pseudomonas facilis* dan *Bacillus stearothermophilus*. *Skripsi*. Fakultas Pertanian UNEJ, Jember.
- Wulan, Praswasti. 2006. Penentuan Rasio Optimum C:N:P sebagai Nutrisi pada Proses Biodegradasi Benzena-Toluena dan Scale Up Kolom Bioregenerator. *Jurnal Teknik Kimia UI*.
- Xavier LJC, Germida JJ. 2003. Bacteria associated with *Glomus clarum* spores influence mycorrhizal activity. *Soil Biol Biochem* 35:471-478.
- Young,. Yahmadi, M., Maya,S. 1995. *Budidaya dan Pengolahan Kopi*. Jember: Sub-Balai Penelitian Budidaya Jember.

LAMPIRAN

Lampiran A. Matriks Penelitian

Judul	Latar Belakang	Rumusan Masalah	Variabel	Indikator	Sumber Data	Metode Penelitian
Formulasi Konsorsium Agen Hayati <i>Mycorhriza Helper Bacteria (Pseudomonas diminuta dan Bacillus subtilis)</i> dengan Media Pembawa Cair Limbah Tahu dan Molase	Pengendalian organisme pengganggu tumbuhan (OPT) yang digunakan oleh petani Indonesia saat ini masih menggunakan pengendalian kimia. Padahal pengendalian kimia tersebut menimbulkan banyak permasalahan Salah satu solusi atas permasalahan tersebut adalah menggunakan kembali pengendalian hayati yang lebih ramah lingkungan dibandingkan pengendalian kimia. Salah satu agen hayati yang digunakan untuk pengendalian hayati adalah Mikoriza.	a. Manakah bahan pembawa cair yang mempunyai kerapatan sel bahan aktif (<i>Pseudomonas diminuta</i> dan <i>Bacillus subtilis</i>) tertinggi? b. Berapakah perbandingan bahan aktif (<i>Pseudomonas diminuta</i> dan <i>Bacillus subtilis</i>) dalam formulasi yang memiliki kerapatan sel bakteri tertinggi?	Variabel bebas: media pembawa berupa limbah cair tahu dan molase, perbedaan konsentrasi antara bakteri <i>P. diminuta</i> dan <i>B. subtilis</i> dengan serial konsentrasi (perbandingan) 1:1, 1:2, 2:1, 2:3, dan 3:2. Variabel terikat: Kerapatan sel <i>P. diminuta</i> dan <i>B. subtilis</i>	Hasil perhitungan kerapatan sel bakteri <i>P. diminuta</i> dan <i>B. subtilis</i> yang diinokulasikan dalam media cair limbah tahu dan molase dan hasil pengukuran pH pada saat tahap perbanyakan masal (pada umur 24 jam, 48 jam, 72 jam).	Hasil pengukuran daya simpan dengan menghitung kerapatan sel bakteri mengukur pH, dan kadar nitrogen total,.	Jenis penelitian: eksperimental laboratories. Tempat penelitian: Laboratorium Mikrobiologi MIPA dan FKIP Biologi Universitas Jember. Waktu penelitian: Dilaksanakan pada Bulan Oktober 2015 hingga Februari 2016.

<p>Melalui hubungan simbiosis dengan tanaman, mikoriza berperan penting dalam pertumbuhan tanaman, perlindungan penyakit, dan peningkatan kualitas tanah secara keseluruhan (Siddiqui dan Pichtel, 2008). Mikoriza merupakan simbiosis mutualisme antara fungi dengan akar dan akan menjadi lebih baik apabila dibantu dengan bakteri yang mampu meningkatkan kolonisasi akar atau pertumbuhan hifa, yang lazim disebut sebagai <i>Mycorrhiza Helper Bacteria</i> (MHB) (Garbaye, 1994). Penggunaan bakteri jenis MHB</p>	<p>c. Adakah pengaruh interaksi perbandingan bahan aktif dan bahan pembawa terhadap daya simpan hasil formulasi?</p>	<p>pH formulasi <i>P. diminuta</i> dan <i>B. subtilis</i> Kadar nitrogen <i>P. diminuta</i> dan <i>B. subtilis</i> sebagai data pendukung. Variabel kontrol: Media perbanyakan bakteri, Biakan bakteri yang digunakan, Tingkat pengenceran bakteri untuk formulasi (10^{-6}), Tingkat pengenceran bakteri untuk menghitung kerapatan sel (10^{-7}), Tempat penyimpanan ditempat yang sama.</p>	<p>Hasil perhitungan kerapatan sel bakteri <i>P. diminuta</i> dan <i>B. subtilis</i> yang diinokulasikan dalam media cair limbah tahu dan molase, setelah formulasi selama 2 bulan (hari ke-3, ke-7, ke-30, dan ke-60). Hasil pengukuran pH formulasi <i>P. diminuta</i> dan <i>B. subtilis</i> yang diinokulasikan dalam media cair limbah tahu dan</p>	<p>Analisis: Menggunakan ANOVA <i>General Linear Model univariate</i> dengan taraf signifikansi 95% ($p < 5\%$).</p>
---	--	---	---	--

<p>diantaranya dari genus <i>Pseudomonas</i> dan <i>Bacillus</i>. Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> dan Bakteri <i>Pseudomonas sp.</i> menghasilkan sekresi berupa enzim protease (Asyiah, 2013), Namun demikian, komposisi formula tersebut perlu diuji untuk produksi mikroba konsorsium bakteri yaitu MHB. Untuk pertumbuhan bakteri diperlukan suatu media. Untuk saat ini media yang biasa digunakan untuk menumbuhkan bakteri berupa Natrium Broth (NB), Natrium Agar (Na), atau Tryptic Soy Agar (TSA). Medium tersebut tidak memiliki hubungan dengan tanah maupun sistem perakaran</p>			<p>molase pada tahap perbanyakkan masal dan formulasi selama 2 bulan (hari ke-3, ke-7, ke-30, dan ke-60).</p> <p>Hasil pengukuran kadar nitrogen total formulasi <i>P. diminuta</i> dan <i>B. subtilis</i> yang diinokulasikan dalam media cair limbah tahu dan molase. (hari ke-3 dan ke-7).</p>		
--	--	--	---	--	--

<p>tumbuhan, selain itu harganya juga cukup mahal. Media yang murah, mudah didapat, berlimpah, dan kurang dimanfaatkan oleh masyarakat saat ini adalah limbah cair tahu dan molase (Khaeruni, 2013). Dengan demikian akan dilakukan penelitian dengan judul “Formulasi Konsorsium Agen Hayati <i>Mycorhriza Helper Bacteria</i> (<i>Pseudomonas diminuta</i> dan <i>Bacillus subtilis</i>) dengan Media Pembawa Cair Limbah Tahu dan Molase”.</p>					
--	--	--	--	--	--

Lampiran B. Hasil Data Anova

Lampiran B1. Pengaruh media, perbandingan bahan aktif, dan interaksinya terhadap kerapatan sel bakteri *B.subtilis*.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: B.subtilis Pengamatan Hari ke-3

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	9.902E17	3	3.301E17	2.562	.128
Intercept	1.601E18	1	1.601E18	12.425	.008
M	7.836E17	1	7.836E17	6.083	.039
P	1.464E17	1	1.464E17	1.137	.317
M * P	6.014E16	1	6.014E16	.467	.514
Error	1.031E18	8	1.288E17		
Total	3.621E18	12			
Corrected Total	2.021E18	11			

a. R Squared = .490 (Adjusted R Squared = .299)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: B.subtilis Pengamatan Hari ke-7

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3.365E17	3	1.122E17	2.449	.138
Intercept	5.012E17	1	5.012E17	10.944	.011
M	1.644E17	1	1.644E17	3.589	.095
P	6.505E16	1	6.505E16	1.420	.268
M * P	1.071E17	1	1.071E17	2.338	.165
Error	3.664E17	8	4.580E16		
Total	1.204E18	12			
Corrected Total	7.029E17	11			

a. R Squared = .479 (Adjusted R Squared = .283)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: B.subtilis Pengamatan Hari ke-30

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.509E16	3	5.031E15	8.164	.008
Intercept	4.124E16	1	4.124E16	66.928	.000
M	1.290E16	1	1.290E16	20.939	.002
P	1.190E15	1	1.190E15	1.931	.202
M * P	9.992E14	1	9.992E14	1.621	.239
Error	4.930E15	8	6.162E14		
Total	6.127E16	12			
Corrected Total	2.002E16	11			

a. R Squared = .754 (Adjusted R Squared = .661)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: B.subtilis Pengamatan Hari ke-60

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5.602E14	3	1.867E14	.768	.543
Intercept	1.853E16	1	1.853E16	76.180	.000
M	2.083E10	1	2.083E10	.000	.993
P	1.577E14	1	1.577E14	.648	.444
M * P	4.025E14	1	4.025E14	1.655	.234
Error	1.946E15	8	2.432E14		
Total	2.103E16	12			
Corrected Total	2.506E15	11			

a. R Squared = .224 (Adjusted R Squared = -.068)

Lampiran B2. Pengaruh media, perbandingan bahan aktif, dan interaksinya terhadap kerapatan sel bakteri *P. diminuta*.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:P.diminuta Pengamatan Hari ke-3

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.956E18	3	6.520E17	2.229	.162
Intercept	3.035E18	1	3.035E18	10.377	.012
M	1.797E18	1	1.797E18	6.146	.038
P	1.470E17	1	1.470E17	.503	.498
M * P	1.158E16	1	1.158E16	.040	.847
Error	2.340E18	8	2.925E17		
Total	7.331E18	12			
Corrected Total	4.296E18	11			

a. R Squared = .455 (Adjusted R Squared = .251)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:P.diminuta Pengamatan Hari ke-7

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5.331E17	3	1.777E17	1.307	.338
Intercept	7.267E17	1	7.267E17	5.344	.050
M	5.330E17	1	5.330E17	3.919	.083
P	4.083E12	1	4.083E12	.000	.996
M * P	6.075E13	1	6.075E13	.000	.984
Error	1.088E18	8	1.360E17		
Total	2.348E18	12			
Corrected Total	1.621E18	11			

a. R Squared = .329 (Adjusted R Squared = .077)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:P.diminuta Pengamatan Hari ke-30

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4.478E16	3	1.493E16	36.778	.000
Intercept	5.985E16	1	5.985E16	147.478	.000
M	2.013E16	1	2.013E16	49.602	.000
P	5.569E15	1	5.569E15	13.720	.006
M * P	1.908E16	1	1.908E16	47.012	.000
Error	3.247E15	8	4.059E14		
Total	1.079E17	12			
Corrected Total	4.803E16	11			

a. R Squared = .932 (Adjusted R Squared = .907)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:P.diminuta Pengamatan Hari ke-60

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.136E15	3	3.785E14	.558	.658
Intercept	2.590E16	1	2.590E16	38.161	.000
M	1.302E13	1	1.302E13	.019	.893
P	1.018E15	1	1.018E15	1.499	.256
M * P	1.050E14	1	1.050E14	.155	.704
Error	5.430E15	8	6.787E14		
Total	3.247E16	12			
Corrected Total	6.565E15	11			

a. R Squared = .173 (Adjusted R Squared = -.137)

Lampiran B3. Pengaruh media, perbandingan bahan aktif, dan interaksinya terhadap pH hasil formulasi.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Pengamatan hari ke-3

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.037 ^a	3	.012	.802	.527
Intercept	678.605	1	678.605	44304.992	.000
M	.005	1	.005	.313	.591
P	.028	1	.028	1.830	.213
M * P	.004	1	.004	.263	.622
Error	.123	8	.015		
Total	678.764	12			
Corrected Total	.159	11			

a. R Squared = .231 (Adjusted R Squared = -.057)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Pengamatan hari ke-7

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.263 ^a	3	.088	3.674	.063
Intercept	665.583	1	665.583	27887.559	.000
M	.221	1	.221	9.277	.016
P	.029	1	.029	1.215	.302
M * P	.013	1	.013	.531	.487
Error	.191	8	.024		
Total	666.037	12			
Corrected Total	.454	11			

a. R Squared = .579 (Adjusted R Squared = .422)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Pengamatan hari ke-30

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.003 ^a	3	.001	.250	.859
Intercept	776.021	1	776.021	232806.250	.000
M	.001	1	.001	.250	.631
P	.001	1	.001	.250	.631
M * P	.001	1	.001	.250	.631
Error	.027	8	.003		
Total	776.050	12			
Corrected Total	.029	11			

a. R Squared = .086 (Adjusted R Squared = -.257)



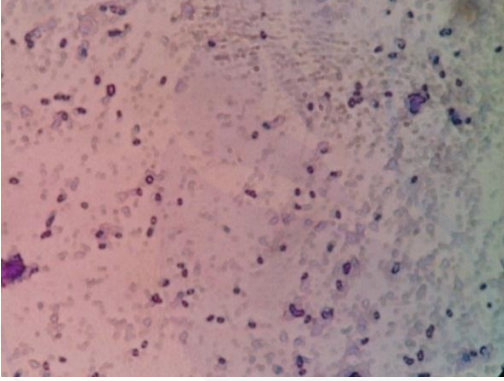
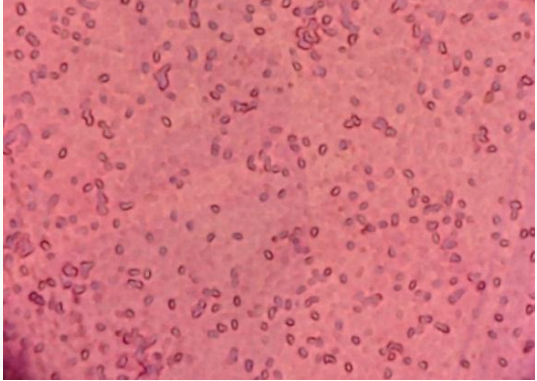


Tests of Between-Subjects Effects







Dependent Variable: Pengamatan hari ke-60

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.029 ^a	3	.010	5.833	.021
Intercept	782.468	1	782.468	469480.500	.000
M	.021	1	.021	12.500	.008
P	.007	1	.007	4.500	.067
M * P	.001	1	.001	.500	.500
Error	.013	8	.002		
Total	782.510	12			
Corrected Total	.042	11			

a. R Squared = .686 (Adjusted R Squared = .569)

Lampiran C. Dokumentasi Penelitian

Identifikasi Bakteri	
	
Gambar 1. Isolat bakteri <i>P. diminuta</i> dan <i>B. subtilis</i> yang digunakan dalam formulasi.	Gambar 2. Proses pewarnaan gram bakteri.
	
Gambar 3. Hasil pengamatan pewarnaan gram <i>P. diminuta</i> .	Gambar 4. Hasil pengamatan pewarnaan gram <i>B. subtilis</i> .
Pembuatan Propagul	
	

<p>Gambar 5. Membuat mollase 2% sebagai media perbanyakan massal.</p>	<p>Gambar 6. Meluruhkan isolat untuk diinokulasi dalam NB.</p>
 <p>Gambar 7. Pembuatan medium NB untuk medium perkebang biakan.</p>	 <p>Gambar 8. Memasukkan 1 ml isolat bakteri kedalam NB.</p>
 <p>Gambar 9. Rak dan Tabung digunakan untuk pengenceran</p>	 <p>Gambar 10. Menshaker isolat bakteri agar homogen.</p>
<p>Perbanyakan massal</p>	
	

Gambar 11. Bakteri dalam NB yang telah dishaker 3 hari , mollase 2 % dan aquades steril.

Gambar 12. Memasukkan 1 ml mollase 2% dalam aquades steril.

Formulasi



Gambar 13. Memasukkan 1 ml bakteri dan 1 ml media kedalam aquades steril.



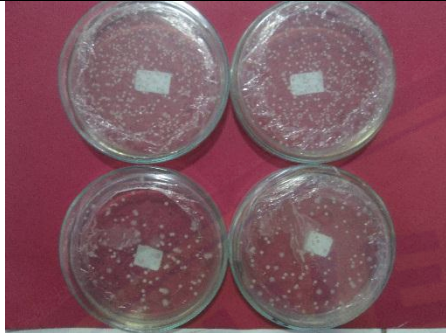
Gambar 14. Konsorsium atau pencampuran bakteri *P.diminuta* dan *B.subtilis*.



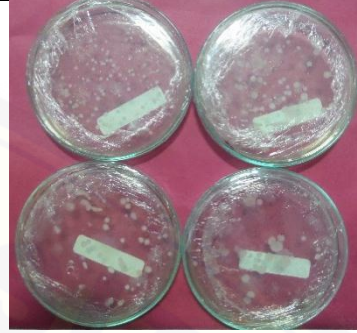
Gambar 15. Setelah formulasi dilakukan

Pengamatan daya simpan

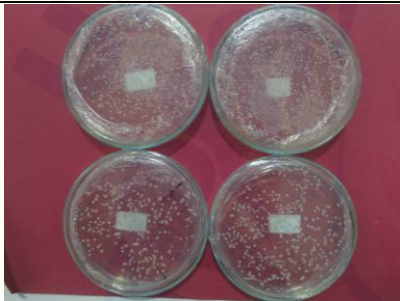
Hari ke-3



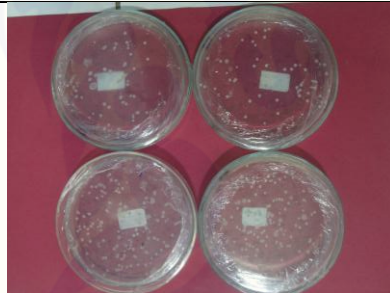
Gambar 23. Koloni bakteri dalam cawan 1:1 Molase.



Gambar 24. Koloni bakteri dalam cawan 1:1 Limbah tahu.

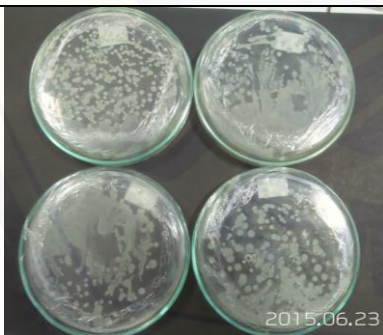


Gambar 25. Koloni bakteri dalam cawan 2:3 Molase.

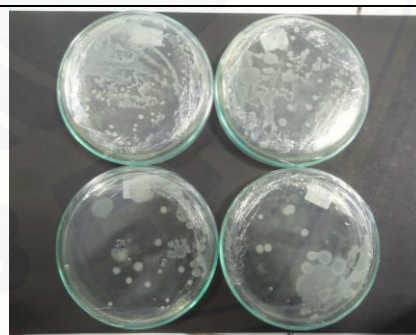


Gambar 26. Koloni bakteri dalam cawan 2:3 Limbah tahu.

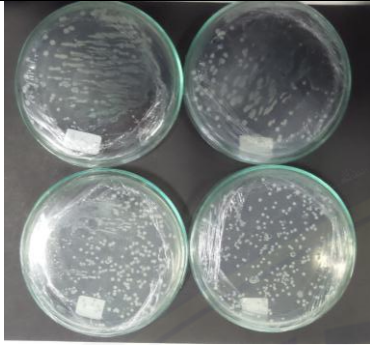
Hari ke-7



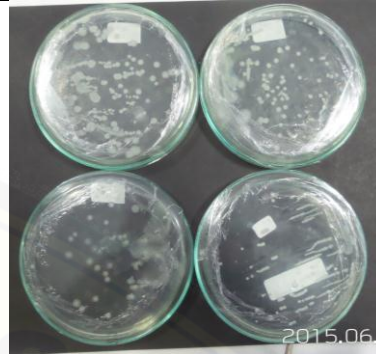
Gambar 27. Koloni bakteri dalam cawan 1:1 Molase.



Gambar 28. Koloni bakteri dalam cawan 1:1 Limbah tahu.

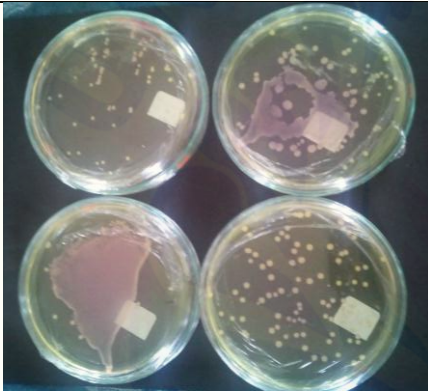


Gambar 29. Koloni bakteri dalam cawan 2:3 Molase.

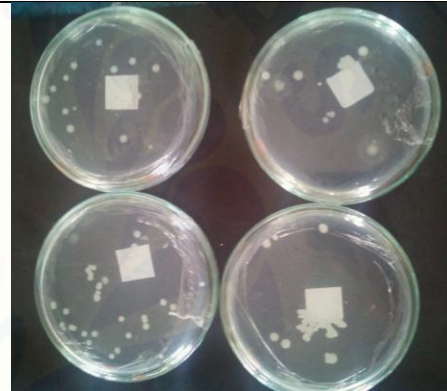


Gambar 30. Koloni bakteri dalam cawan 2:3 Limbah tahu.

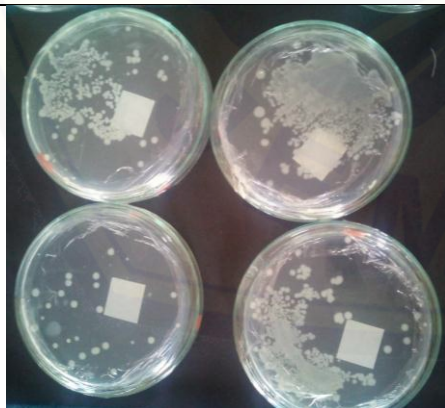
Hari ke-30



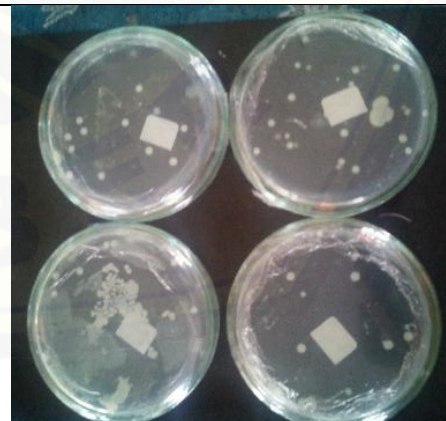
Gambar 31. Koloni bakteri dalam cawan 1:1 Molase.



Gambar 32. Koloni bakteri dalam cawan 1:1 Limbah tahu.

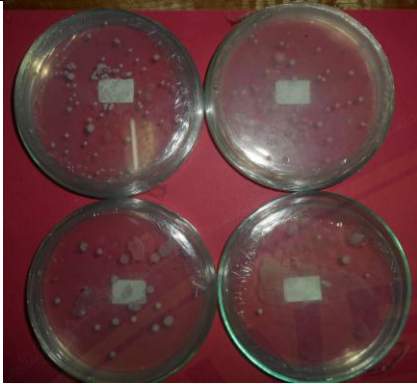


Gambar 33. Koloni bakteri dalam cawan 2:3 Molase.

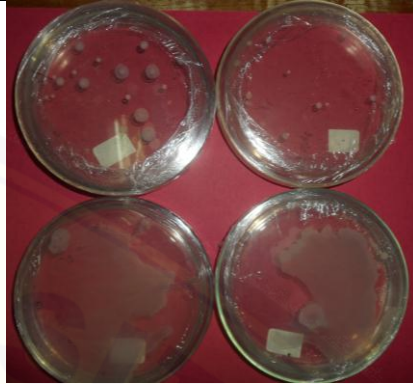


Gambar 34. Koloni bakteri dalam cawan 2:3 Limbah tahu.

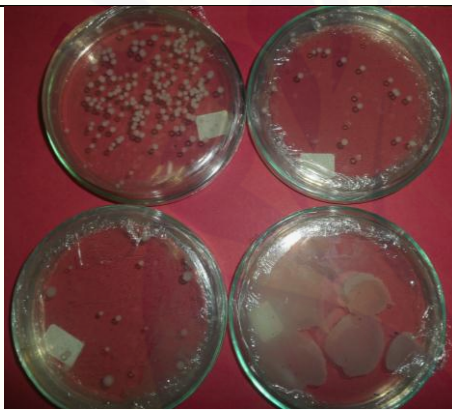
Hari ke-60



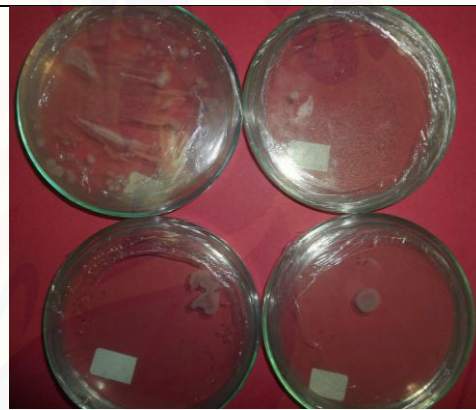
Gambar 35. Koloni bakteri dalam cawan 1:1 Molase.



Gambar 36. Koloni bakteri dalam cawan 1:1 Limbah tahu.



Gambar 37. Koloni bakteri dalam cawan 2:3 Molase.



Gambar 38. Koloni bakteri dalam cawan 2:3 Limbah tahu.

Lampiran D. Hasil Analisis Kandungan Nitrogen

KEMENTERIAN PENDIDIKAN NASIONAL
POLITEKNIK NEGERI JEMBER
LABORATORIUM TANAH
Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember 68121
Telp.(0331) 333532 pes.128, Fax. (0331) 333531

LAPORAN ANALISIS

Nomor : 09 /Lab Tanah/VI/2015

Tanggal Masuk : 18 Juni 2015
Pengirim : Luthfiyatul H
Alamat : Jl. Kalimantan No. 12 Jember
Tanggal Selesai : 26 Juni 2015
Jenis Sampel/jumlah : Tanah / 4 Sample

HASIL ANALISIS

NO	PARAMETER	HASIL ANALISA	
		N - Total	N - Tsd
1	1 A	0,02 %	2,27 ppm
2	1 B	0,03 %	2,39 ppm
3	2 A	0,02 %	2,29 ppm
4	2 B	0,04 %	2,43 ppm

Jember, 26 Juni 2015
Kepala Laboratorium Tanah



U. Madijid, MP.
NIP. 19590612 198703 1 001

C. Molase / Tetes

NO	PARAMETER	SATUAN	HASIL ANALISA
1	N - Total	%	0,29
2	P - Total	mg/ 100 g	15,2
3	P ₂ O ₅	%	0,18
4	K ₂ O	%	0,39
5	C - Org	%	56,79
6	C/N Ratio	-	19,58

Jember, 14 Agustus 2015
Kepala Laboratorium Tanah


Ir. Abdul Madjid, MP.
NIP.19590612 198703 1 001



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
POLITEKNIK NEGERI JEMBER

LABORATORIUM TANAH

Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember 68121
Telp.(0331) 333532 pes.128, Fax. (0331) 333531

LAPORAN ANALISIS

Nomor : 06 /Lab Tanah/III/2016

Tanggal Masuk : 04 Maret 2016
Pengirim : Luthfiyatul Hasanah
Alamat : Jl. Kalimantan No. 12 Jember
Tanggal Selesai : 11 Maret 2016
Jenis Sampel/jumlah : Air Tahu / 5 Sample

HASIL ANALISIS

NO	KODE SAMPLE	N-Total (%)
1	Air Tahu	0,87
2	A (1:1)	0,89
3	A (2:3)	0,92
4	B (1:1)	0,98
5	B (2:3)	1,02

Jember, 11 Maret 2016
Kepala Laboratorium Tanah



Ir. Abdul Majid, MP.
NIP.19590612 198703 1 001