

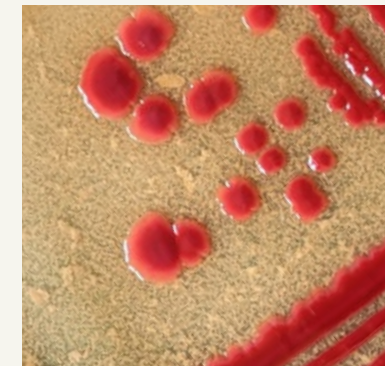
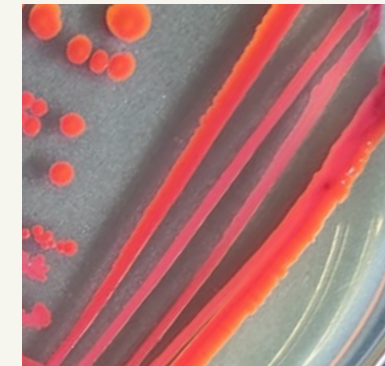
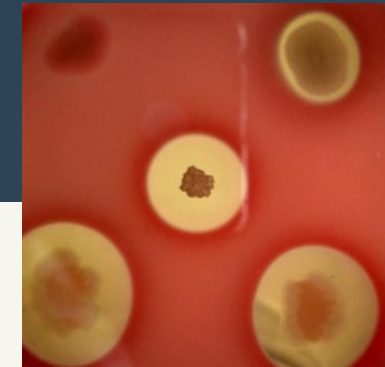
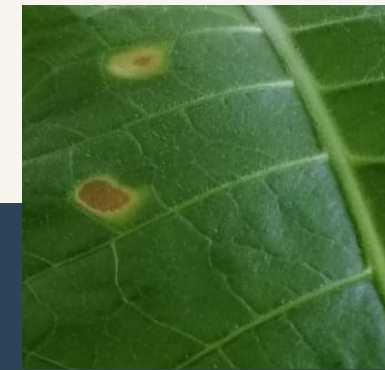
KEAMANAN BIOPESTISIDA

Kunci Sukses Formulasi



Penulis:
Supriadi
Rohimatun
Miftakhurohmah

Penyunting:
Antarjo Dikin



KEAMANAN BIOPESTISIDA: Kunci Sukses Formulasi

KEAMANAN
BIOPESTISIDA
Kunci Sukses
Formulasi

Biopestisida memberikan harapan untuk mengendalikan hama dan penyakit tanaman secara ramah lingkungan. Buku ini berisi uraian tentang aspek keamanan dari biopestisida yang perlu diperhatikan sejak awal dalam pengembangan biopestisida.

Semoga dapat menambah khasanah ilmu tentang biopestisida, sekaligus merangsang penelitian dan pengembangan biopestisida yang lebih bermutu.

Penulis: Supriadi, dkk.



Sekretariat Badan Litbang Pertanian
Jalan Ragunan No.29 Pasar Minggu
Jakarta Selatan, 12540
Telp. (021) 7806202 Fax. (021) 7800644
Website: <https://press.litbang.pertanian.go.id/>
Email: iaardpress@litbang.pertanian.go.id



KEAMANAN BIOPESTISIDA: Kunci Sukses Komersialisasi

KEAMANAN BIOPESTISIDA: Kunci Sukses Komersialisasi



Keamanan Biopestisida: Kunci Sukses Komersialisasi

Supriadi

@2022 IAARD Press

Hak cipta dilindungi Undang-undang ada pada Penerbit IAARD PRESS. Hak Penerbitan ada pada Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Dilarang menggandakan sebagian atau seluruh isi buku ini dengan cara apapun tanpa izin dari Penerbit.

Katalog dalam terbitan (KDT)

SUPRIADI

KEAMANAN BIOPESTISIDA: Kunci Sukses Komersialisasi/ penulis, Supriadi, Rohimatun, dan Miftakhurohmah; penyunting, Antarjo Dikin. -- Jakarta: IAARD Press, 2022.

xv + 120 hlm.: ill., tab.; 21 cm.

ISBN: 978-602-344-327-7

1. Biopestisida 2. Komersialisasi 3. Pengendalian Hama dan Penyakit
I. Judul II. Rohimatun III. Dikin, Antarjo

655.53:631

Penulis:

Supriadi

Rohimatun

Miftakhurohmah

Penyunting:

Antarjo Dikin

Perancang Kover dan Tata Letak :

Tim Kreatif IAARD Press dan Muhammad Hajid An Nur

Penerbit

IAARD PRESS

Jl. Ragunan No 29, Pasar Minggu, Jakarta 12540

Email: iaardpress@pertanian.go.id

Anggota IKAPI No: 445/DKI/2012

PRAKATA

Pengendalian hama dan penyakit tanaman menggunakan biopestisida, baik secara sendiri maupun kombinasi dengan pestisida kimia, telah menjadi strategi pengendalian hama terpadu (PHT) yang sedang banyak dikembangkan di bidang pertanian berkelanjutan di seluruh dunia. Hal ini dilaksanakan karena dianggap paling aman terhadap manusia, hewan, dan lingkungan. Namun, dalam prakteknya di lapangan masih terbatas jumlah produk biopestisida yang sudah terdaftar. Salah satu penyebabnya adalah karena produk biopestisida yang dikembangkan masih tidak stabil keefektifannya dan belum memenuhi persyaratan keamanan. Sejak tahun 1988 FAO telah mensyaratkan kejelasan jenis bahan aktif, asal usul bahan aktif, jenis formula, toksisitas, dan residu sebagai kriteria keamanan biopestisida.

Buku KEAMANAN BIOPESTISIDA: Kunci Sukses Komersialisasi, selain membahas metode pengujian keamanan biopestisida, tetapi juga menguraikan secara ringkas beberapa metode identifikasi agens hayati mikrob, baik secara konvensional maupun molekuler. Teknik identifikasi secara konvensional, umumnya mudah dilakukan dan tidak memerlukan fasilitas yang mahal, namun hasilnya perlu didukung dengan analisis molekuler agar hasil identifikasinya lebih pasti.

Akhir-akhir ini sudah sangat berkembang teknik identifikasi mikrob secara molekuler yang hasilnya dapat diperoleh lebih cepat dibandingkan dengan identifikasi secara konvensional.

Diharapkan dengan memahami persyaratan keamanan suatu biopestisida maka Buku KEAMANAN BIOPESTISIDA: Kunci Sukses Komersialisasi akan menjadi salah satu referensi dalam kegiatan penelitian dan pengembangan biopestisida supaya lebih terarah dan hasilnya dapat dimanfaatkan secara lebih luas oleh pengguna. Semoga buku ini akan menambah khasanah ilmu tentang biopestisida, sekaligus memacu lebih banyak penelitian dan pengembangan sampai menjadi produk komersialnya.

Tim Penulis

KATA PENGANTAR

Pestisida telah banyak digunakan secara luas untuk mengendalikan berbagai macam Organisme Pengganggu Tanaman (OPT). Penggunaan pestisida merupakan upaya pengendalian OPT terakhir ketika teknik pengendalian yang lain tidak dapat digunakan. Namun, pestisida justru sering digunakan sebagai teknik pengendalian OPT yang pertama kali. Bahkan, pestisida juga sering dipakai sebelum benih ditanam. Hal ini dikarenakan pestisida dirasakan lebih praktis dan cepat terlihat hasilnya. Penggunaan pestisida yang tidak bijaksana telah banyak diketahui menimbulkan berbagai dampak negatif.

Pestisida berbahan alami atau biasa disebut biopestisida telah banyak diteliti dan beberapa telah mencapai tahap komersialisasi. Biopestisida dapat menjadi alternatif pengendalian hama dan penyakit tanaman di masa depan karena Indonesia memiliki megadiversifikasi kekayaan hayati tanaman dan mikrob. Namun, produk biopestisida yang komersial masih sangat terbatas karena perkembangan penelitiannya masih terkendala oleh banyak faktor. Salah satunya adalah keamanan biopestisida. Informasi keamanan biopestisida sangat penting supaya tidak membahayakan manusia, hewan, dan lingkungan.

Beberapa hasil penelitian menyebutkan biopestisida aman terhadap organisme nontarget dan lingkungan. Walaupun demikian, biopestisida tetap pestisida yang merupakan bahan yang berpotensi dapat membahayakan manusia dan lingkungan. Oleh karena itu, pengujian keamanan hayati biopestisida sangat diperlukan agar pestisida yang telah diformulasi benar-benar telah teruji keamanannya. Buku KEAMANAN BIOPESTISIDA:

Kunci Sukses Komersialisasi berisi informasi tentang cara-cara pengujian keamanan biopestisida yang sebaiknya dilakukan sejak awal kegiatan penelitian dan pengembangan biopestisida.

Buku ini ditulis oleh peneliti Badan Litbang Pertanian yang berpengalaman dalam penelitian dan pengembangan biopestisida sehingga dapat menjadi salah satu acuan pegangan untuk penelitian dan pengembangan biopestisida.

Jakarta, 2022

DAFTAR ISI

PRAKATA.....	v
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
BAB 2. BIOPESTISIDA	3
BAB 3. JENIS BIOPESTISIDA	7
Biopestisida dari Tumbuhan (Pestisida Nabati)	7
Biopestisida dari Mikrob	9
BAB. 4 LANDASAN HUKUM DAN DATABASE KEAMANAN BIOPESTISIDA	15
Dasar Hukum.....	15
Database Keamanan Biopestisida	17
BAB 5. UJI HEMOLISIS DAN HIPERSENSITIVITAS.....	19
Uji Hemolisis.....	19
Uji Hipersensitivitas.....	21
BAB 6. FITOTOKSISITAS.....	23

BAB 7. TOKSISITAS PADA MUSUH ALAMI DAN LARVA UDANG.....	29
Uji Toksisitas terhadap Musuh Alami.....	29
Uji Toksisitas Ikan dan Udang	36
BAB 8. RESISTENSI TERHADAP ANTIBIOTIK DAN REAKSI ALERGI	49
Resistensi terhadap Antibiotik	49
Reaksi Alergi.....	51
Tes Reaksi Alergi Metode Tusuk Kulit	52
Tes Reaksi Alergi Metode Penetapan Imunosorben Tertaut Enzim (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay/ELISA</i>).....	52
Bab 9. ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MIKROB AGENS HAYATI SECARA KONVENSIONAL	54
Isolasi Mikrob Potensial	54
Isolasi Mikrob dari Bagian Permukaan Tanaman	55
Isolasi Mikrob dari Rizosfir.....	56
Isolasi Mikrob Endofit	56
Isolasi Mikrob dari Serangga	57
Penyimpanan Kultur Bakteri.....	59
Karakterisasi Secara Konvensional	60
Bentuk Sel dan Sifat Gram	60
Kelarutan dalam Larutan KOH 3%	62
Bentuk Spora.....	63
Uji Oksidasi dan Fermentasi.....	63
Produksi Pigmen Fluoresen.....	65
Bab 10. KARAKTERISASI AGENS HAYATI SECARA MOLEKULER.....	66
Penyiapan Sampel untuk Isolasi DNA.....	66
Isolasi DNA.....	67
Amplifikasi DNA	69

Sikuensing dan Analisis Sikuen	73
Bab 11. BAHAN BIOPESTISIDA NABATI.....	76
DAFTAR PUSTAKA	84
LAMPIRAN	103
TENTANG PENULIS.....	110
TENTANG PENYUNTING	113
INDEKS.....	115

DAFTAR GAMBAR

- Gambar 1. Situs the plantlist.org yang dapat digunakan untuk merujuk nama ilmiah tumbuhan sumber biopestisida (Sumber: *The PlantList* (<http://www.theplantlist.org/>) 8
- Gambar 2. Situs worldfloraonline.org yang dapat digunakan untuk merujuk nama ilmiah tumbuhan sumber biopestisida (Sumber: <http://www.worldfloraonline.org/> 8
- Gambar 3. Uji hemolisis lima isolat bakteri pada media agar darah. Isolat tidak menunjukkan hemolisis (anak panah), sedangkan empat isolat lainnya positif β hemolisis.....21
- Gambar 4. Gejala reaksi HR pada daun tembakau. Reaksi HR menunjukkan positif (A) dan negatif (B, C, dan D).....22
- Gambar 5. Prosedur berurutan untuk menguji efek samping pestisida terhadap artropoda berguna30
- Gambar 6. Kontainer yang digunakan untuk menetasakan nauplius *A. salina* (Pellosi *et al.*, 2013) (A) dan nauplius *A. salina* (foto: Juan Camilo Jaramillo) (B)40
- Gambar 7. Alur pengujian toksisitas metode BSLA43
- Gambar 8. Koloni-koloni tunggal isolat bakteri pada media agar yang diperoleh dengan teknik isolasi cara gores. No. 1 = goresan pertama, 2=goresan kedua, dan 3 = goresan ketiga.....58
- Gambar 9. Massa DNA bakteri Gram negatif di dalam larutan KOH 3% membentuk larutan yang kental dan dapat ditarik membentuk “benang”62
- Gambar 10. Mesin PCR (A) dan alat elektroforesis (B)72

Gambar 11. Produk PCR bagian ITS isolat <i>B. bassiana</i> (Sayed <i>et al.</i> , 2018)	73
Gambar 12. Pohon filogeni lima isolat <i>Heterorhabditis</i> asal Jawa Timur dan Bali, yang menyertakan beberapa spesies lain dalam genus <i>Heterorhabditis</i> dan <i>Caenorhabditis elegans</i> sebagai <i>outgrup</i> (Chaerani <i>et al.</i> , 2018).....	75

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Data keamanan dari beberapa bahan aktif biopestisida ...	18
Tabel 2.	Kategori penilaian keamanan pestisida terhadap organisme berguna tingkat laboratorium	31
Tabel 3.	Kategori penilaian keamanan pestisida terhadap organisme berguna tingkat semilapangan	35
Tabel 4.	Kategori penilaian keamanan pestisida terhadap organisme berguna tingkat lapang.....	36
Tabel 5.	Bobot dan panjang baku rata-rata hewan uji (n = 60)	36
Tabel 6.	Klasifikasi toksisitas pestisida terhadap udang galah	38
Tabel 7.	Persentase kista yang menetas dan berhasil <i>molting</i> berdasarkan suhu media.....	42
Tabel 8.	Indeks toksisitas Meyer dan Clarkson	45
Tabel 9.	Bukti penelitian keterkaitan antara hasil metode pengujian toksitas BSLA dan AOTiM	45
Tabel 10.	Toksitas beberapa ekstrak tanaman terhadap larva udang dan tikus	46
Tabel 11.	Perbandingan hubungan antara toksisitas berdasarkan nilai LD ₅₀ pada tikus dengan manusia dengan angka Gosselini.....	47
Tabel 12.	Batas nilai konsentrasi (<i>cut-off</i>) dalam pengujian resistensi dari mikroba agens hayati terhadap antibiotik	50
Tabel 13.	Kriteria dasar respons ketahanan strain mikroba terhadap antibiotik	51

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Jenis pestisida, golongan, nama bahan aktif, dan nama dagang biopestisida yang terdaftar di Indonesia103
- Lampiran 2. Minyak asiri dari beberapa jenis tanaman yang mempunyai aktivitas sebagai fungisida, bakterisida, herbisida, dan insektisida.....105

BAB 1.

PENDAHULUAN

Dampak buruk penggunaan pestisida kimia yang berlebihan terhadap manusia, hewan, dan lingkungan telah mendorong peneliti untuk mencari alternatif pestisida yang lebih aman. Penggunaan biopestisida berbasis agens hayati dan nabati secara sendiri atau kombinasi dengan pestisida kimia telah menjadi strategi baru dalam pengelolaan hama terpadu (PHT) dalam pertanian berkelanjutan, walaupun prakteknya di lapangan masih terbatas (Verma *et al.*, 2021).

Biopestisida memiliki banyak keunggulan, tetapi jumlah produk yang dikomersialkan masih sangat sedikit. Salah satu alasan utamanya adalah karena prosedur pendaftarannya masih disamakan dengan pestisida kimia dengan kandungan bahan aktif tunggal atau kombinasi yang telah diketahui secara kuantitatif dan kualitatif. Padahal, cara kerja biopestisida sifatnya lebih kompleks karena mengandung campuran bahan aktif yang berbeda dan bervariasi secara kuantitatif dan kualitatif (Schreiber, 2020). Beberapa kendala lainnya dalam pengembangan biopestisida, khususnya pestisida nabati, adalah (1) terbatasnya bahan baku karena jarang sekali tanaman sumber biopestisida dibudidayakan secara khusus karena ketersediaan lahan terbatas dan tidak dapat bersaing dengan komoditas tanaman pangan atau lainnya; (2) formulasi biopestisida masih banyak tantangan karena satu tanaman dapat memiliki banyak zat aktif yang berbeda dalam sifat kimianya; (3) ekstraksi bahan aktif dari tanaman masih menggunakan pelarut organik sehingga limbahnya kemungkinan

dapat mencemari lingkungan; (4) memiliki umur simpan yang pendek karena mudah terdegradasi (terurai); (5) cara kerjanya tak terbatas (*broad spectrum*), (6) keefektifannya sangat dipengaruhi oleh lingkungan, terutama suhu dan kondisi lingkungan, sehingga hasilnya sering tidak konsisten (Essiedu *et al.*, 2020). Dalam beberapa literatur disebutkan bahwa masa simpan biopestisida masih pendek dibandingkan dengan yang sintetik yang bisa mencapai 2-5 tahun. Sebagai contoh, biopestisida berbahan mikrob hidup yang belum diformulasikan memiliki masa simpan 1-3 bulan, ekstrak tanaman selama 3 bulan, dan minyak nabati hanya 6 bulan (Supriadi, 2015).

Buku KEAMANAN BIOPESTISIDA: Kunci Sukses Komersialisasi, dikhususkan menguraikan satu aspek penting dari rangkaian penelitian untuk menguji keamanan dari suatu biopestisida sebelum masuk skala pengujian efikasi dan komersialisasi. Sesuai dengan pedoman FAO dan WHO, agens hayati yang digunakan dalam bidang pertanian harus aman terhadap manusia, hewan, dan lingkungan.

Sistematika penulisan buku ini terdiri atas tujuh topik tentang pengujian keamanan biopestisida. Tiga topik pertama, yaitu (1) hemolisis, (2) hipersensitivitas, dan (3) fitotoksisitas harus dijadikan sebagai kriteria untuk menyeleksi awal calon biopestisida yang potensial dikembangkan. Apabila ketiga kriteria tersebut tidak dapat dipenuhi maka calon biopestisida tidak layak dikembangkan lebih lanjut. Empat topik lainnya adalah kriteria tentang (4) toksisitas terhadap musuh alami, (5) toksisitas terhadap hewan air (ikan dan larva udang), (6) reaksi alergi atau iritasi, dan (7) resistensi terhadap antibiotik. Di samping itu, untuk menghasilkan bahan biopestisida berasal dari tumbuhan (pestisida nabati) yang bermutu, maka kejelasan jenis tumbuhan atau tanaman, pemilihan bagian tanaman, cara penanganan simplisia, dan metode ekstraksi bahan aktif menjadi topik tambahan yang perlu dicermati.

BAB 2.

BIOPESTISIDA

Definisi biopestisida secara umum adalah bahan kimia yang berasal dari bahan alami untuk mengendalikan organisme pengganggu. Menurut EPA tahun 2014, biopestisida yang berasal dari bahan alami ini, terdiri atas tiga kelompok, yaitu (1) pestisida biokimia, yang mengandung senyawa alami untuk mengendalikan hama atau organisme pengganggu tumbuhan secara luas; (2) pestisida mikrob, yang mengandung mikroorganisme (bakteri, virus serangga, jamur, aktinomiset, protozoa, dll.) sebagai agens hayati untuk mengendalikan hama/patogen secara langsung atau tidak langsung melalui senyawa yang dihasilkannya; dan (3) *plant-incorporated protectants* (PIPs), yaitu tanaman hasil rekayasa genetik yang mengandung materi genetik untuk mengendalikan hama/patogen (Leahy *et al.*, 2014).

Dampak buruk penggunaan pestisida kimia yang berlebihan terhadap manusia, hewan, dan lingkungan telah mendorong peneliti untuk mencari alternatif pestisida yang lebih aman. Beberapa keunggulan biopestisida dibanding dengan pestisida kimia adalah mudah terdegradasi di alam, relatif lebih aman terhadap manusia, hewan, dan lingkungan (selektif), serta dapat dipadukan dengan komponen pengendalian lain (Dadang dan Prijono, 2009). Kelebihan lainnya dari biopestisida adalah apabila digunakan secara terintegrasi dengan cara pengendalian lainnya

maka hasil dan mutu panen lebih baik, biayanya lebih murah, memiliki kinerja dan mekanisme kerja bahan aktif yang unik, kemungkinan terjadinya resistensi pada hama dan patogen sangat kecil, dampak negatifnya bagi konsumen sangat rendah, tidak ada risiko meninggalkan residu bahan kimia dalam hasil panen, serta dapat digunakan dalam pertanian organik (Marrone, 2019).

Sampai saat ini, perusahaan yang memproduksi biopestisida masih terbatas jumlahnya. Menurut Leahy *et al.* (2014), meskipun tren perkembangan biopestisida ke depan diperkirakan akan meningkat sekitar 15% per tahun, pangsa pasar biopestisida secara global masih kecil. Total penjualan biopestisida diprediksi mencapai USA \$ 3 miliar atau 5% dari total pasar pengendalian tanaman secara keseluruhan. Tren global perdagangan produk biopestisida masih akan menunjukkan menaik, dengan total sekitar US\$ 5 milyar pada tahun 2020 dan US\$ 11 milyar tahun pada tahun 2025 (Cary dan Wilson, 2017). Di antara kelompok jenis mikrob, produk biopestisida mengandung bahan aktif bakteri, seperti *Bacillus* spp. masih lebih banyak (18%) dibandingkan dengan jamur (17%), dan virus (16%).

Di Indonesia, penggunaan formula pestisida biologi masih sangat sedikit. Menurut data tahun 2012, dari total 2.475 formulasi pestisida yang beredar, hanya ada 31 buah formulasi biopestisida, yaitu insektisida biologi (22), fungisida biologi (7), atraktan nabati (1), dan rodentisida biologi (1) (Supriadi, 2015). Pemanfaatan pestisida nabati diyakini mampu menjawab permasalahan residu pestisida pada produk pertanian karena pestisida nabati mudah terurai (Wiratno *et al.*, 2013).

Salah satu contoh biopestisida yang paling awal dikembangkan dan sampai sekarang masih banyak digunakan adalah *Bacillus thuringiensis*. Sel bakteri atau metabolit sekunder berupa senyawa protein dari *B. thuringiensis* bersifat racun atau mengganggu makan larva serangga hama. Sampai saat ini, sudah diidentifikasi

ratusan senyawa yang berkhasiat sebagai insektisida dan fungisida dari kultur *B. thuringiensis*, antara lain protein Vip, *cytolytic* (Cyt), dan *crystalline*, serta toksin (β -*exotoxins* dan δ -*endotoxins*) (Han, 2016). Senyawa biopestisida yang diisolasi dari *B. thuringiensis* tidak menimbulkan alergi dan mudah terdegradasi oleh cairan di dalam sistem pencernaan.

Pelajaran utama dari kasus biopestisida *B. thuringiensis* yang telah mendunia adalah **efektif** dan **aman**. Itulah dua kata kunci sukses biopestisida yang harus selalu kita pegang dalam mengembangkan produk-produk biopestisida. Pada umumnya, kunci sukses pertama, yaitu keefektifan, sudah sangat dipahami. Namun, kunci sukses kedua, yaitu keamanan, masih perlu dikaji secara seksama. Kegiatan evaluasi keamanan calon biopestisida seharusnya dilakukan sejak awal dimulai kegiatan penelitian. Apabila sudah terindikasi akan menimbulkan masalah keamanan, maka segera dievaluasi dan atau diganti dengan bahan yang tidak berbahaya.

Supriadi (1995) menyatakan bahwa di dalam Pedoman Pengujian Produk Biopestisida menurut FAO (1988) telah disebutkan beberapa informasi penting yang harus disertakan dalam pengajuan dokumen untuk mendapatkan ijin edar atau komersialisasi biopestisida. Hal sama juga dinyatakan oleh *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD), bahwa biopestisida dan produknya harus terjamin keamanan dan mutunya sehingga memenuhi standar baku (OECD, 2012).

Kriteria keamanan dari produk biopestisida, meliputi **pertama** adalah kejelasan identitas agens hayati, seperti nama umum, nama latin, strain, habitat asal, proses pembuatan formula, metode identifikasi agens hayati, serta kandungan bahan aktif, bahan pembawa, dan metode analisisnya. Dengan telah berkembangnya teknik molekuler untuk mengidentifikasi suatu agens hayati, maka informasi hasil identifikasi perlu disertakan. Kriteria **kedua**

adalah karakteristik formulasi, seperti sifat fisika dan kimia, jumlah bahan aktif di dalam biopestisida (cfu/g, cfu/ml, dst.), jenis formulasi (WP, EC, dst), jenis dan sifat bahan pembawa, ketahanan terhadap faktor lingkungan (penyinaran matahari, UV, suhu, kelembapan, kekeringan, dst.), lama ketahanan hidup (*self life*), dan metode analisis bahan aktif dalam formula. Kriteria **ketiga** adalah informasi tentang karakteristik biologi dari biopestisida, meliputi asal usulnya apakah dari alam atau hasil rekayasa genetik, cara penyebaran di alam, target organisme pengganggu, dosis dan frekuensi aplikasi, dan mekanisme kerja bahan aktif. Kriteria **keempat** adalah data efikasi dan keamanan biopestisida dan produknya, berupa hasil pengujian toksisitas agens hayati dan formulanya, seperti toksisitas oral, dermal, pernafasan, iritasi, dan hipersensitivitas atau reaksi alergi. Kriteria yang **kelima** adalah data residu dan pengaruh biopestisida terhadap lingkungan, meliputi resistensi dan toksisitas terhadap tanaman (fitotoksitas), musuh alami atau organisme nontarget lain, seperti ikan, burung, dan lebah.

BAB 3.

JENIS BIOPESTISIDA

Biopestisida dari Tumbuhan (Pestisida Nabati)

Sebagian besar tumbuhan yang dapat digunakan sebagai sumber pestisida nabati memiliki manfaat lain, seperti bahan baku obat-obatan, rempah, tanaman hias, pangan, dan atau pakan (Pawar *et al.*, 2013), bahkan gulma (Tampubolon *et al.*, 2018). Beberapa famili yang digunakan sebagai bahan baku pestisida nabati, antara lain Apiaceae, Apocynaceae, Asteraceae, Caesalpiniaceae, Cupressaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Liliaceae, Myrtaceae, Piperaceae, Poaceae, Rutaceae, Sapotaceae, Solanaceae, dan Zingiberaceae (Dadang dan Prijono, 2008; Vidyasagar dan Tabassum, 2013; Isman 2014). Raveau *et al.* (2020) membuat daftar minyak asiri yang berasal dari beberapa jenis tanaman yang mempunyai aktivitas antijamur, antibakteri, dan bersifat sebagai herbisida; serta Isman (2020) dan Iqbal & Pavela (2019) menyusun daftar minyak asiri beberapa jenis tanaman yang mempunyai aktivitas sebagai insektisida (Lampiran 2).

Pestisida nabati mengandung senyawa kimia yang dapat mengakibatkan satu atau lebih pengaruh biologi terhadap organisme pengganggu tumbuhan, baik pengaruh respons fisiologi (*physiological responses*) maupun respons tingkah laku (*behavioural responses*). Pengaruh fisiologi yang ditimbulkan akibat paparan pestisida nabat, antara lain gangguan pertumbuhan dan perkembangan OPT target, sedangkan respons tingkah laku,

misalnya gangguan aktivitas makan dan peneluran serangga (Dadang dan Prijono, 2008).

Penyebutan suatu jenis tumbuhan yang berpotensi sebagai pestisida nabati harus sesuai dengan nama resminya. Nama latin dan nama umum suatu tumbuhan dapat mengacu pada beberapa situs, seperti The Plant List (<http://www.theplantlist.org/>) atau The World Flora Online (<http://www.worldfloraonline.org/>). Sebagai contoh, *Curcuma domestica* Valetton memiliki nama resmi *Curcuma longa* L. dan *Eugenia aromatica* (L.) Baill. dengan nama resminya *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry.



Gambar 1. Situs the plantlist.org yang dapat digunakan untuk merujuk nama ilmiah tumbuhan sumber biopestisida (Sumber: The PlantList (<http://www.theplantlist.org/>))



Gambar 2. Situs worldfloraonline.org yang dapat digunakan untuk merujuk nama ilmiah tumbuhan sumber biopestisida (Sumber: <http://www.worldfloraonline.org/>)

Penggunaan pestisida nabati di Indonesia memiliki prospek yang baik karena kepemilikan lahannya sempit (0,3 ha), penyiapan bahan baku dan pembuatannya lebih mudah, dan dapat dilakukan sendiri (Dadang, 2015). Beberapa syarat yang perlu dipenuhi supaya pestisida nabati aman digunakan adalah tidak membahayakan lingkungan dan serangga berguna, efisien, tidak fitotoksik, tidak bersifat antagonis jika diaplikasikan secara campuran, dan bahan bakunya mudah didapat/dibudidayakan (Dadang dan Prijono, 2008; Dadang, 2015).

Biopestisida dari Mikrob

Bahan aktif dari suatu biopestisida dapat terdiri atas satu atau lebih mikroorganisme atau virus, atau mengandung produk-produk metabolit sekundernya. Biopestisida dari mikrob terdiri dari mikroinsektisida, nematoda patogen serangga, biopestisida dari bakteri dan virus.,

Mikoinsektisida. Mikroinsektisida adalah cendawan entomopatogen yang digunakan untuk mengendalikan serangga hama. Setidaknya, ada lebih dari 800 spesies cendawan entomopatogen yang telah diidentifikasi dan 12 spesies di antaranya sudah diproduksi secara komersial. Namun, yang paling banyak diproduksi adalah *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, dan *Isaria fumosorosea* (Maina *et al.*, 2018). Cendawan entomopatogen menginfeksi serangga dengan mekanisme menempel pada integumen serangga kemudian mengecambahkan konidia dan membentuk struktur tabung infeksi atau apresoria untuk menembus integumen serangga. Penetrasi tabung infeksi dibantu oleh sejumlah enzim sehingga miselia jamur dapat menyebar melalui haemocoel dan menyerang beragam jaringan otot, badan lemak, saluran malpighi, mitokondria, dan hemosit sampai akhirnya serangga yang

terinfeksi mati (Ortiz-Urquiza dan Keyhani, 2013; Maina *et al.*, 2018).

Nematoda patogen serangga. Nematoda patogen serangga atau disebut juga nematoda entomopatogen (*entomo pathogenic nematodes*) disingkat EPN. Di antara EPN yang sudah diketahui keefektifannya adalah berasal dari family Steinernematidae, dengan spesies *Steinernema carpocapsae*, *S. feltiae*, dan *S. riobravis* dan Heterorhabditidae, dengan spesies *Heterorhabditis megidis*, *H. bacteriophora* (Han dan Ehlers, 2000; Gulzar *et al.*, 2020; Kary *et al.*, 2021). Beberapa negara di Eropa, Amerika Serikat, dan Kanada sudah menjual produk biopestisida berbahan EPN tersebut (Sharma *et al.*, 2011).

Steinernema spp. dan *Heterorhabditis* spp. memiliki kisaran inang yang sangat luas, tidak membahayakan mamalia maupun vertebrata, tidak menyebabkan kerusakan lingkungan, dan kompatibel jika dikombinasikan dengan teknik pengendalian hama lainnya (Kaya dan Gaugler, 1993). Poinar (1990) menyebutkan sasaran utama EPN dari golongan serangga hama, terdiri atas ordo Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Orthoptera, Tysanoptera, dan Siphonaptera.

Fase juvenil infeksi EPN dapat masuk ke dalam tubuh inang melalui lubang-lubang alami serangga, seperti mulut, anus, spirakel (Koppenhöfer *et al.*, 2000), luka, dan integumen kemudian masuk ke haemocoel serangga (Kaya dan Gaugler, 1993). Proses infeksi EPN terhadap serangga hama terjadi karena adanya interaksi mutualistik antara EPN dengan bakteri simbion *Xenorhabdus*, yang terdapat di dalam saluran pencernaan juvenil infeksi EPN (Poinar, 1979). EPN berperan sebagai vektor *Xenorhabdus* karena membawa bakteri ke inang tanpa hambatan faktor lingkungan (Dunphy *et al.*, 1985). Adanya bakteri simbion dalam EPN tersebut menyebabkan inang dapat terbunuh dengan cepat karena bakteri simbion meracuni haemolimfa. Kondisi ini

dinamakan septimesia (Dunphay *et al.*, 1985; Kaya dan Gaugler, 1993). Selain itu, bakteri simbiosis menyediakan nutrisi yang cocok dan lingkungan yang lebih sesuai bagi perkembangan dan reproduksi EPN (Kaya dan Gaugler, 1993). Hal tersebut dikarenakan *Xenorhabdus* mampu memproduksi antibiotik, berupa bakteriosin, yang dapat menghambat perkembangan mikroorganisme sekunder yang ada dalam tubuh serangga inang (Arosz, 1996). Bakteri simbiosis yang lepas akan berkembang dan dapat mematikan serangga inang dalam waktu 24–48 jam (Burnell dan Stok, 2000).

Biopestisida dari bakteri. Banyak jenis bakteri yang sudah dikemas menjadi biopestisida. Bakteri paling terkenal dan terbesar adalah *Bacillus thuringiensis*. *B. thuringiensis* telah dikomersialkan lebih dari 70 tahun (Marrone, 2019). Ada empat subspecies *B. thuringiensis* yang banyak digunakan sebagai biopestisida, yaitu *kurstaki*, *aizawai*, *morrisoni*, dan *israelensis* (Federici *et al.*, 2010).

Secara umum, terdapat empat toksin yang dihasilkan oleh *B. thuringiensis*, yaitu α -eksotoksin, β -eksotoksin, γ -eksotoksin, dan δ -endotoksin. Jenis α -eksotoksin diketahui toksik terhadap mencit dan vertebrata. β -eksotoksin atau thuringiensin, dibentuk pada saat pertumbuhan vegetatif bakteri dan disekresikan ke dalam media. Thuringiensin diketahui memengaruhi transkripsi RNA, ganti kulit, dan metamorfosis pada serangga. Toksin dalam kristal protein (protoksin) dikenal sebagai δ -endotoksin dan setiap subspecies mempunyai δ -endotoksin yang berbeda yang infeksi pada serangga yang berbeda pula. Toksin ini dibentuk dalam sel sporangia *B. thuringiensis* dan dianggap ideal dalam pengendalian hama karena spesifik terhadap hama dan kurang toksik terhadap manusia dan musuh alami berbagai tanaman. Agar efektif, *B. thuringiensis* harus dimakan oleh serangga stadium larva. *B. thuringiensis* tidak efektif terhadap imago. Lebih dari 150 jenis serangga, sebagian besar Lepidoptera diketahui rentan terhadap *B. thuringiensis* (Vega dan Kaya, 2012).

Pemanfaatan tanaman hasil rekayasa genetik yang mengandung gen Bt telah menjadi strategi paling efektif untuk mengendalikan hama. Tanaman Bt adalah tanaman yang direkayasa secara genetik untuk mengandung endospora (atau kristal) toksin Bt supaya tahan terhadap hama serangga tertentu. Gen Bt yang dimasukkan ke dalam tanaman, antara lain Cry1Ac dan Cry1Ab. Hasilnya adalah tanaman mengandung racun Bt. Apabila tanaman Bt dimakan serangga hama maka serangga tersebut akan keracunan dan mati. Pengembangan tanaman Bt dapat mengurangi kelimpahan hama sasaran dan pengurangan penggunaan insektisida, serta populasi musuh alami (Abbas, 2018).

Biopestisida dari virus. Virus yang menyerang serangga bentuknya submikroskopik, obligat, dan hidupnya hanya di dalam sel (intraseluler). Terdapat sekitar 1.200 virus yang menyerang serangga, tetapi yang paling lama dan sudah banyak dikembangkan sebagai biopestisida adalah *Baculovirus*. Inang dari *Baculovirus* sangat spesifik karena hanya menyerang serangga dari ordo Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera, Neuroptera, Coleoptera, Trichoptera, dan Crustasea (Erayya *et al.*, 2013). *Baculovirus* berbentuk batang berukuran 40-70 nm × 250-400 nm, terdiri atas selubung lipoprotein yang menyelimuti kapsid, dan mengandung inti DNA-protein.

Di dalam program pengendalian hayati hama, famili Baculoviridae memiliki peran yang penting. Oleh karena itu, studi tentang patogenisitas dan spesifitas inang Baculoviridae sangat intensif. *Nucleo Polyhedra Virus* (NPV) merupakan salah satu virus patogen serangga yang paling penting di antara famili Baculoviridae. NPV sering menyerang serangga dari Famili Lepidoptera (Murillo *et al.*, 2003), seperti *Helicoverpa armigera* (Indrayani, 2003) dan *Spodoptera exigua* (Samsudin dan Santoso, 2014). Lebih dari 500 spesies Lepidoptera diserang NPV. Partikel infeksius dari virus atau virion ini dapat terbungkus oleh *single* SNPV atau *multiple* MNPV (Erraya *et al.*, 2013).

NPV memperbanyak diri di dalam inti sel (nukleus) serangga inang. Untuk dapat menginfeksi sel serangga inang, polihedra NPV harus tertelan bersama dengan pakan yang dikonsumsinya melalui alat mulut. Di dalam saluran pencernaan inilah, NPV menginfeksi inti sel inang (Vega dan Kaya, 2012). NPV akan bereproduksi di dalam sel midgut (usus bagian tengah) serangga atau jaringan lain. Akibatnya tubuh lemak, epidermis, dan sel darah serangga akan terinfeksi. Setelah 5-12 hari sejak infeksi NPV, serangga akan mati. Lamanya waktu kematian tergantung pada dosis virus, stadia instar larva, dan faktor lingkungan, seperti temperatur.

Protein selubung NPV mengandung gen *gp64* yang memiliki peran penting dalam mematikan serangga, yaitu sebagai reseptor pengikat sel serangga inang. Gen *gp64* dapat masuk ke dalam sel inang, dalam hal ini serangga, melalui proses endositosis. Kerja gen *gp64* akan optimal pada kondisi pH rendah (Li dan Blissard, 2009).

Ada dua tahap proses infeksi NPV pada sel inang. Pada tahap pertama, NPV menyerang usus tengah. Pada tahap kedua (sekunder), NPV akan menyerang sel-sel dari organ tubuh yang lain, seperti sel darah (leukosit dan limfosit), trakhea, hipodermis, dan sel lemak (Ignoffo dan Couch, 1981). Proses infeksi primer terjadi di usus tengah. Badan inklusi akan melepas virion dari selubung proteinnya pada kondisi alkalis (Etebari *et al.*, 2007). Virion-virion tersebut kemudian akan menembus jaringan peritrofik dan mikrovili, dan akan memisahkan sel-sel kolumnar dan goblet. Selanjutnya, virion-virion yang baru terbentuk tadi akan menginfeksi seluruh sel jaringan serangga. Proses ini disebut dengan infeksi sekunder. Pembentukan badan inklusi (polihedra) terjadi sebagai hasil infeksi sekunder pada jaringan sel darah, trakhea, hipodermis, dan sel lemak (Vega dan Kaya, 2012).

Tahap akhir infeksi NPV ditandai dengan tubuh larva inang menjadi rapuh dan hancur. Tubuh larva mengeluarkan cairan yang berisi partikel virus. Apabila larva serangga mampu mencapai tahap menjadi pupa maka pupa yang terbentuk menunjukkan warna menjadi kehitaman, teksturnya rapuh, dan keluar cairan keruh (Samsudin dan Santoso, 2014). Larva *H. armigera* yang terinfeksi NPV akan menuju ke bagian pucuk-pucuk/ujung-ujung tanaman, dengan posisi menggantung dan kaki palsu mencengkeram bagian tanaman (Samsudin, 2016). Polyhedra NPV mengandung beberapa sampai banyak virion. Jutaan polyhedra yang terkandung pada cairan tubuh serangga yang mati akan pecah dan jatuh pada daun-daun dan sisa-sisa tanaman, kemudian akan termakan oleh ulat sehat yang lain (Vega dan Kaya, 2012; Erraya *et al.*, 2013).

BAB. 4

LANDASAN HUKUM DAN DATABASE KEAMANAN BIOPESTISIDA

Seperti telah diuraikan pada bab sebelumnya, biopestisida hanya dapat dikomersialkan setelah memenuhi persyaratan mutu dan keamanan (FAO, 1988; Supriadi, 2015; OECD, 2012). Walaupun banyak referensi menyebutkan bahwa biopestisida aman, namun beberapa formulasi dapat memberikan dampak kurang baik terhadap serangga berguna. Sebagai contoh, ekstrak tembakau 5-10% dapat mematikan predator *Helopeltis* spp. (Hemiptera; Miridae), yaitu dari golongan laba-laba (Arachnida) dan kepik Reduviidae (Wiryadiputra, 2003).

Dasar Hukum

Seperti telah diuraikan pada bab sebelumnya, biopestisida hanya dapat dikomersialkan setelah memenuhi persyaratan mutu dan keamanan (FAO, 1988; Supriadi, 2015; OECD, 2012). Di Indonesia, keamanan biopestisida telah diatur dalam Keputusan Menteri Pertanian Nomor 411/Kpts/TP.120/6/95 tentang Pemasukan Agens Hayati ke Dalam Wilayah Negara Republik Indonesia (Mentan RI, 1995) dan Keputusan Menteri Pertanian Nomor 43 tahun 2019 tentang Pendaftaran Pestisida (Mentan RI, 2019).

Keputusan Menteri Pertanian Nomor 43 tahun 2019 mengatur beberapa bahan pestisida yang akan dikomersialkan di Indonesia, baik sintesis maupun hayati. Bahan-bahan yang dapat digunakan dalam pestisida berupa bahan aktif dan tambahan yang tidak memiliki efek karsinogenik (berdasarkan *International Agency for Research on Cancer/IARC* kategori I dan IIa; dan *Food and Agriculture Organization (WHO Joint Meeting on Pesticide Residues (JMPR)*); tidak bersifat mutagenik dan teratogenik berdasarkan FAO dan WHO; bahan aktif mikrobnnya tidak mengandung gen ketahanan terhadap antibiotik yang biasa digunakan dalam pengobatan pada manusia; dan/atau termasuk *Persistent Organic Pollutants* berdasarkan Konvensi Stockholm.

Di Indonesia, keamanan biopestisida telah tercakup secara implisit di dalam Keputusan Menteri Pertanian Nomor 411/Kpts/TP.120/6/95 tentang Pemasukan Agens Hayati ke Dalam Wilayah Negara Republik Indonesia (Mentan RI, 1995). Pengaturan agens hayati dari luar negeri yang akan dimasukkan ke Indonesia untuk formulasi biopestisida, baik untuk keperluan penelitian maupun pengujian, secara khusus diatur pada Pasal 1-4. Pasal tersebut menyebutkan bahwa setiap pemasukan agens hayati dari luar negeri ke dalam wilayah negara Republik Indonesia, tidak membahayakan hewan, ikan, tumbuhan, keselamatan, dan kesehatan manusia, serta lingkungan.

Aturan keamanan biopestisida secara eksplisit juga dimuat dalam Keputusan Menteri Pertanian Nomor 43 tahun 2019, bahwa bahan aktif dan bahan tambahan dari pestisida yang akan dikomersialkan di Indonesia harus aman terhadap manusia, hewan, dan lingkungan, yaitu (a) tidak memiliki efek karsinogenik berdasarkan *International Agency for Research on Cancer/IARC* kategori I dan IIa, serta *Food and Agriculture Organization (FAO) Joint Meeting on Pesticide Residues (JMPR)*; (b) tidak bersifat mutagenik dan teratogenik berdasarkan FAO dan WHO; (c) bahan aktif mikrobnnya tidak mengandung gen ketahanan terhadap

antibiotik yang biasa digunakan dalam pengobatan pada manusia; dan (d) tidak termasuk *Persistent Organic Pollutants* berdasarkan Konvensi Stockholm.

Database Keamanan Biopestisida

Informasi tentang keamanan biopestisida, khususnya agens hayati mikrob, yang sudah atau sedang dikembangkan, dapat ditelusuri melalui beberapa situs, seperti *Environmental Protection Agency* (EPA) (<https://search.epa.gov/>), *European Food Safety Authority* (EFSA) (<http://www.efsa.europa.eu/en/publications>), *Canadian Environmental Protection Act* (<https://laws-lois.justice.gc.ca/eng/acts/c-15.31/>), dan lainnya. Informasi data keamanan dari EFSA diterbitkan secara reguler melalui jurnal ilmiah, yaitu *EFSA Journal*. Di dalam jurnal tersebut kita dapat menemukan informasi tentang hasil-hasil kajian ilmiah yang dilakukan oleh Tim Ahli terhadap usulan biopestisida mikrob yang akan digunakan di Eropa. Tim Ahli EFSA, bekerja atas dasar permintaan Komisi Negara-Negara Eropa (*The European Commission*), Parlemen Eropa (*European Parliament*), Negara-Negara Anggota Parlemen (*Member States*), atau atas inisiatif dari EFSA sendiri. Hasil-hasil kerja tim ahli itu secara berkala diperbarui (*updated*). Contohnya, pada terbitan tahun 2019, kita dapat menemukan informasi tentang keamanan dari beberapa jenis biopestisida bakteri yang aman digunakan untuk pangan dan pakan. Artikel tersebut berjudul *Update of the List of QPS-Recommended Biological Agents Intentionally Added to Food or Feed as Notified to EFSA* [*EFSA Journal* (2019) doi: 10.2903/j.efsa.2019.5753]. Beberapa informasi yang dapat kita pahami dari artikel tersebut, antara lain nama-nama bahan mikrob yang menjadi bahan aktif formula biopestisida, jenis evaluasi keamanan yang sudah dilakukan, dan metode pengujiannya (Tabel 1).

Tabel 1. Data keamanan dari beberapa bahan aktif biopestisida

Nama	Evaluasi data keamanan	Referensi
<i>Beauveria bassiana</i> strain PPRI 5339 untuk mengendalikan hama pada tanaman Solanaceae, Cucurbitaceae, dan tanaman hias.	Informasi tentang sifat biologis dan teknis dari bahan aktif. Metode untuk mengidentifikasi sampai pada level strain, stabilitas dispersi, lama dapat disimpan, termasuk jumlah senyawa beauvericin. Data yang belum lengkap adalah (a) toksisitas pada mamalia, (b) suhu terbaik untuk perbanyakan, (c) potensi toksisitas metabolit sekunder terhadap manusia.	<i>EFSA Journal</i> (2018) 16 (4), 5230
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> (strain PB 54, SA 11, SA 12, dan EG 2348) untuk mengendalikan hama pada anggur, tomat, dan kubis.	Data yang belum lengkap adalah: (a) pembentukan toksin, (b) keamanan bagi operator, pekerja, dan lainnya, (c) toksisitas terhadap mamalia, (d) persistensi spora di dalam tanah.	<i>EFSA Journal</i> (2012). doi: 10.2903/j.efsa.a.2012.2540.

BAB 5.

UJI HEMOLISIS DAN HIPERSENSITIVITAS

Evaluasi awal keamanan mikrob, khususnya bakteri, yang akan digunakan sebagai agens hayati dapat dilakukan dengan menguji sifat hemolisis dan hipersensitifitas. Pengujian hemolisis digunakan sebagai indikator awal keamanan terhadap manusia dan hewan (Thakkar *et al.*, 2015), sedangkan hipersensitivitas sebagai indikator patogenisitas terhadap tumbuhan (Wick, 2010).

Uji Hemolisis

Penilaian risiko agens hayati mikrob, terutama bakteri, terhadap manusia dan hewan dapat diketahui dengan mengujinya terhadap sel-sel darah merah. Banyak bakteri yang menghasilkan toksin dan mendegradasi sel darah merah sehingga warnanya berubah menjadi jernih atau hijau-kebiruan (Buxton, 2005). Uji hemolisis pada media agar darah (*blood agar medium*) dapat dilakukan di laboratorium yang memiliki fasilitas standar.

Media agar darah dapat dibuat mengikuti pedoman yang disampaikan oleh *American Society for Microbiology* (Buxton, 2005). Media agar darah yang biasa digunakan adalah *Soybean - Casein Digest Agar* (*Trypticase Soy Agar* atau *Tryptic Soy Agar/TSA*, atau *Blood Agar Base*) yang diperkaya dengan 5% darah domba. Pengambilan darah domba hanya dapat dilakukan oleh tenaga

ahli yang sudah terlatih. Oleh karena itu, sebaiknya menggunakan media darah yang sudah jadi.

Media agar darah siap pakai biasanya dibuat mengikuti metode Buxton (2005), yaitu dengan komposisi bahan 15 g *pancreatic digested casein*, 5 g *papaic digested soy meal*, 5 g NaCl, 15 g agar, dan 1 l air destilat. Semua bahan dimasukkan satu per satu ke dalam air destilat di dalam wadah gelas. pH media diatur pada 7,3. Selanjutnya, media TSA disterilisasi di dalam autoklaf. Setelah proses sterilisasi, media didinginkan, tetapi masih berupa cairan, pada suhu kamar sampai suhu mencapai sekitar 45-50°C. Setelah itu, ke dalam media tersebut ditambahkan 5% (v/v) darah segar domba, kemudian dihomogenisasi hingga tercampur rata. Setelah rata, media dituangkan ke dalam cawan petri steril. Bakteri yang akan diuji digoreskan atau diteteskan pada permukaan media agar darah dan diinkubasikan pada suhu 28 °C.

Pada pengujian hemolisis biasanya dapat dimati tiga tipe reaksi hemolisis, yaitu (1) beta (β) hemolisis, perubahan warna yang sangat jelas dari merah darah menjadi jernih karena terjadinya lisis sel darah merah; (2) alpha (α) hemolisis, perubahan warna dari merah menyala menjadi hijau-kebiruan di sekitar koloni bakteri yang diuji, akibat dari berubahnya sel hemoglobin menjadi methemoglobin; dan (3) gamma (γ) hemolisis, tidak terjadi perubahan warna pada media agar darah di sekitar koloni bakteri yang diuji. Ilustrasi hasil pengujian hemolisis disajikan pada Gambar 3.

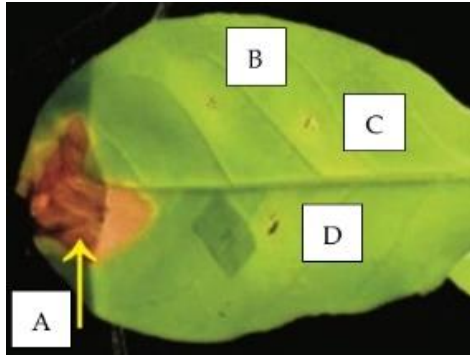


Gambar 3. Uji hemolisis lima isolat bakteri pada media agar darah. Isolat tidak menunjukkan hemolisis (anak panah), sedangkan empat isolat lainnya positif β hemolisis.

Uji Hipersensitivitas

Uji hipersensitivitas (HR) dilakukan untuk mengetahui risiko agens hayati bakteri terhadap tanaman uji. Bagian tanaman yang biasa digunakan dalam uji HR adalah daun tembakau. Penggunaan daun tembakau karena memiliki permukaan yang lembut dan terdapat rongga yang cukup besar di antara tulang-tulang daun sehingga mudah menyuntikkan suspensi bakteri. Kebanyakan bakteri patogen akan menginduksi reaksi HR apabila diinjeksikan ke dalam jaringan tanaman yang bukan inangnya (Lelliott dan Stead, 1987).

Pengujian HR dilakukan dengan cara menyuntikkan suspensi bakteri menggunakan jarum suntik (diameter 0,6 mm) pada jaringan daun. Uji HR yang positif ditunjukkan dengan adanya jaringan yang mati di sekitar tempat inokulasi yang terjadi 1-2 hari setelah inokulasi (Gambar 4). Suspensi bakteri yang digunakan sebaiknya berumur 1-2 hari dan kerapatan selnya sekitar 10⁸-10⁹ cfu (*colony forming unit*) atau kekeruhannya (*optical density*, OD λ 600 = 0,3-0,4). Kondisi tanaman tembakau pada waktu penujian HR sebaiknya dipelihara pada keadaan teduh, tetapi cukup terang. Apabila tidak ada daun tembakau, maka dapat digunakan daun tomat.



Gambar 4. Gejala reaksi HR pada daun tembakau. Reaksi HR menunjukkan positif (A) dan negatif (B, C, dan D)

BAB 6.

FITOTOKSISITAS

Fitotoksistas adalah kapasitas suatu senyawa (seperti tanaman berupa produk perlindungan) yang dapat menyebabkan munculnya gejala kerusakan sementara atau permanen pada tanaman (*European and Mediterranean Plant Protection Organization*, 2014). Efek fitotoksistas dapat diamati pada tanaman saat muncul, selama pertumbuhannya, atau dapat diekspresikan saat panen. Gejalanya dapat memengaruhi keseluruhan tanaman atau bagian dari akar, pucuk, daun, bunga, dan buah-buahan. Gejala fitotoksistas pada tanaman dapat ditunjukkan dengan *burn* atau nekrosis di bagian ujung, tepi, maupun seluruh permukaan daun, pengerutan, klorosis di bagian pucuk maupun seluruh daun, distorsi, *stunting*, maupun pertumbuhan abnormal lain (Short, 1981).

Potensi keracunan dari suatu bahan dapat berasal dari (1) jenis tanaman, yang berhubungan dengan ketebalan, lekukan, dan posisi daun; bagian tanaman, apakah aplikasi dilakukan di pucuk, daun muda, ataupun daun tua; (2) senyawa kimia, meliputi jenis dan konsentrasi ekstrak/minyak yang diaplikasikan; (3) bahan tambahan lain, misalnya pelarut, perekat, anti-UV, dan lain sebagainya; (4) kesehatan tanaman; (5) komposisi/kandungan ekstrak/minyak; dan (6) lingkungan, seperti sinar matahari.

Kandungan minyak atau cairan pekat dalam insektisida, yang berupa senyawa-senyawa nonpolar, sering kali menimbulkan efek fitotoksik karena dapat merusak lapisan kutikula atau membran sel daun. Penggunaan konsentrasi ekstrak kasar lebih dari 0,5%

cenderung menyebabkan fitotoksik pada tanaman (Priyono 1999). Namun, kondisi tersebut tidak selalu terjadi. Penggunaan ekstrak tanaman dalam bentuk campuran dapat meningkatkan konsentrasi senyawa kimia tertentu sehingga menimbulkan gejala fitotoksisitas (Dadang dan Priyono 2008). Senyawa nonpolar yang terkandung di dalam minyak atau cairan pekat insektisida seringkali menimbulkan efek fitotoksik karena dapat merusak lapisan kutikula atau membran sel daun (Priyono, 2003). Oleh karena itu, kandungan minyak atau ekstrak dalam konsentrasi siap semprot tidak boleh menyebabkan keracunan pada tanaman, seperti daun dan titik tumbuh. Di sisi lain, kemampuan menyebabkan fitotoksisitas suatu minyak atau ekstrak tanaman memiliki manfaat yang dapat digunakan sebagai bioherbisida (Raveau, 2020). Ada 21 jenis minyak asiri, termasuk minyak cengkeh, berpotensi sebagai herbisida (Lampiran 2).

Indikator atau parameter yang digunakan untuk menilai gejala fitotoksisitas individu dapat mengacu pada standar EPPO yang tertuang dalam *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (2014), misalnya:

- (1) keterlambatan kemunculan (*delay of emergence*) atau pertumbuhan tanaman di plot yang diberi perlakuan dalam beberapa hari;
- (2) pengurangan jumlah tanaman (*thinning*) per petak atau per satuan luas atau persatuan panjang baris;
- (3) keterlambatan atau percepatan pertumbuhan (*delay or acceleration in reaching growth stages*) atau persentase tanaman mencapai tahap pertumbuhan dalam beberapa hari;
- (4) penghambatan atau stimulasi (*inhibitions or stimulations*) jumlah organ, tinggi, panjang tunas, diameter, dll. (mutlak atau relatif);

- (5) perubahan warna, nekrosis, dan deformasi (*modifications in colour, necrosis, deformation*): jumlah tanaman (atau bagian tanaman) yang terkena dampak per plot (atau per satuan luas, dll.) atau penggunaan skala (misalnya tidak ada, sedikit, sedang, kuat), atau dalam persentase luas permukaan yang terkena, atau relatif terhadap plot yang tidak dirawat;
- (6) berkurangnya produksi (*yield reduced*) untuk menilai kuantitas dan kualitas hasil spesifik tanaman.

Beberapa metode yang dapat digunakan untuk pengujian fitotoksisitas meliputi:

- a. **Pengolesan.** Metode pengujian pengolesan mengikuti Dadang *et al.* (2007). Formulasi biopestisida yang akan diuji dibuat beberapa taraf konsentrasi perlakuan, kemudian dioleskan menggunakan kuas pada beberapa bagian tanaman, seperti daun muda maupun tua. Olesan yang dibentuk berupa bulatan berdiameter 1 cm. Gejala fitotoksisitas diamati pada hari ke-1 setelah pengolesan hingga hari ke-10, dengan mengamati bagian yang diolesi, apakah terjadi gejala fitotoksisitas atau tidak.
- b. **Perendaman benih.** Pengujian biopestisida dengan metode pengujian perendaman benih dapat mengikuti metode yang dilakukan oleh Fatma *et al.* (2018) menggunakan benih bawang merah (*Allium cepa*). Benih umbi bawang merah dipilih yang sehat dan berukuran sama. Selanjutnya, benih dicuci terlebih dahulu dengan menggunakan akuades kemudian direndam dalam larutan biopestisida selama 24 jam, dengan konsentrasi 5 – 30 atau 10 – 150 (6 - 7 taraf konsentrasi) berdasarkan nilai LC₅₀ hasil pengujian probit. Perlakuan kontrol menggunakan akuades. Masing-masing taraf diulang sebanyak tiga kali. Masing-masing ulangan terdiri dari 20 benih bawang merah.

Setelah 24 jam, benih bawang merah perlakuan dan kontrol ditempatkan pada kertas saring dua lapis, yang dibasahi oleh akuades, pada petridish, selama 15 hari (suhu $25 \pm 1^\circ\text{C}$). Kelembapan dijaga selama masa inkubasi ini. Parameter yang diamati untuk mengetahui munculnya gejala fitotoksisitas, antara lain (1) persentase perkecambahan yang diamati pada hari ke-3 setelah disemai pada kertas saring dengan menghitung jumlah benih yang berkecambah dari jumlah benih yang diberi perlakuan (Scott *et al.*, 1984; Akinci dan Akinci 2010); (2) kelangsungan hidup (%); (3) panjang akar dihitung pada hari ke-15; (3) panjang tunas dihitung pada hari ke-15; (4) rasio panjang akar dan tunas. Setelah tujuh hari kelangsungan hidup (%) dihitung sebagai rasio antara jumlah bibit yang bertahan hidup dan jumlah bibit perlakuan, pada hari ke-15; (5) indeks vigor perkecambahan. Indeks vigor perkecambahan ditentukan dengan mengalikan perkecambahan (%) dan panjang bibit, yang dihitung pada hari ke-15 (Abdul-Baki dan Anderson 1973); (6) fitotoksisitas (%), yang dihitung pada hari ke-15 (Chou *et al.*, 1978); dan (7) indeks toleransi dihitung pada hari ke-15, dengan membandingkan rerata akar terpanjang dalam larutan Zn terhadap rerata panjang akar terpanjang dalam akuades (Turner dan Marshal 1972).

- c. **Penyemprotan.** Metode pengujian penyemprotan dapat mengikuti Wati *et al.* (2021) pada tanaman sayuran, seperti sawi, packchoi, kangkung, dan tomat. Pengujian dilakukan beberapa tahap. Pengujian awal dilakukan dengan menyemprotkan larutan biopestisida yang akan diuji kemudian disemprotkan menggunakan alat semprot sederhana, seperti *hand sprayer*, pada daun tanaman. Konsentrasi semprot bahan uji berkisar antara 1-10%. Apabila sudah diketahui konsentrasi efektifnya, maka konsentrasi semprot untuk pengujian toksisitas adalah sama dengan

konsentrasi anjuran (N), ditambah dengan konsentrasi lebih rendah (N-1) dan lebih tinggi dari konsentrasi anjuran (N+1). Sebagai pembanding digunakan air dan larutan kimia yang sudah diketahui toksisitasnya pada tanaman uji. Pengamatan gejala fitotoksitas dilakukan pada hari setelah penyemprotan, selanjutnya pada hari ke-3 dan 7 setelah penyemprotan. Pengamatan dilakukan dengan melihat gejala, seperti bagian daun yang terbakar, bercak kuning, dan nekrosis.

- d. **Enzimatis.** Metode pengujian fitotoksitas secara enzimatis dapat mengikuti Fatma *et al.* (2018), yaitu dengan melakukan pengujian aktivitas enzim katalase, peroksidase, dan superoksidase dismutase.

Pengujian aktivitas enzim katalase (CAT) dimulai dari menyiapkan bahan daun segar sebanyak 100 mg, kemudian menggerusnya dalam 4 ml buffer ekstraksi (pH 7,0), dalam alu dan mortar yang telah didinginkan. Setelah itu, ekstrak disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh dicampur dengan 0,005 M H₂O₂ dalam buffer kalium fosfat (pH 7,0). Sebanyak 2 N H₂SO₄ ditambahkan untuk menghentikan reaksi setelah 5 menit. Reaktan distandarisasi terhadap 0,1 N KMnO₄. Aktivitas CAT ditentukan dengan metode Euler dan Josephson (1927).

Pengujian aktivitas enzim peroksidase dilakukan dengan menimbang daun segar sebanyak 50 mg kemudian menggerusnya dalam 10 ml buffer ekstraksi dalam alu dan mortar yang telah didinginkan sebelumnya. Setelah itu, ekstrak disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 15 menit. Setelah dilakukan sentrifugasi, sebanyak 1 ml ekstrak diambil dan ditambahkan 5 ml buffer fosfat 0,1 M (pH 6,0), 1 ml 0,01% H₂O₂, dan 1 ml 0,5% (b/v) p-

fenilendiamin. Untuk menghentikan reaksi ditambahkan 5 N H₂SO₄. Absorbansi dibaca pada 485 nm (Luck 1963).

Pengujian superoksidase dismutase dilakukan dengan menimbang daun segar sebanyak 100 mg kemudian dihomogenisasi dalam campuran ekstrak yang mengandung buffer fosfat (pH 7,0), EDTA, dan PVP dalam mortar dan alu yang telah didinginkan kemudian disentrifugasi selama 15 menit. Ekstrak enzim ditambahkan ke tabung reaksi yang mengandung buffer fosfat (pH 7,8), *nitro blue tetrazolium* (NBT), metionin, riboflavin, dan EDTA. Selanjutnya, sampel disimpan di bawah sinar matahari selama 15 menit untuk menyelesaikan reaksi. Absorbansi dibaca pada 560 nm. Metode Beauchamp dan Fridovich (1971) dimodifikasi dapat digunakan untuk menentukan satu unit CAT sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghambat 50% reduksi fotokimia NBT.

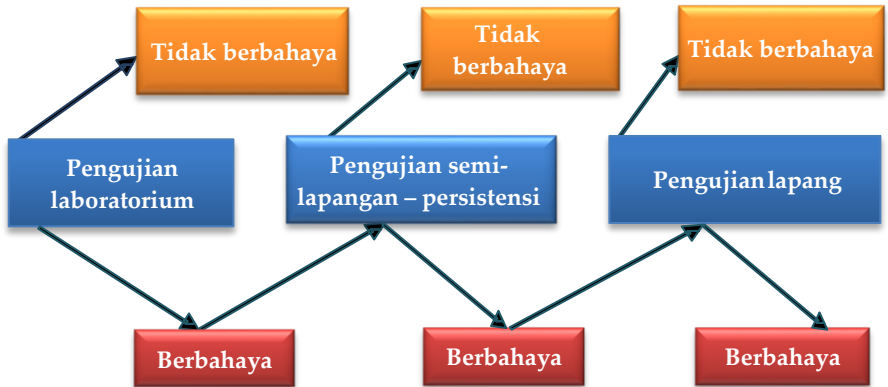
BAB 7.

TOKSISITAS PADA MUSUH ALAMI DAN LARVA UDANG

Bahan baku biopestisida, di samping mempunyai khasiat untuk mengendalikan hama atau patogen, juga berpotensi menyebabkan keracunan pada manusia, hewan, dan lingkungan. Terbunuhnya organisme bukan sasaran (nontarget), seperti musuh alami serangga (predator, parasitoid, dan entomopatogen) karena aplikasi pestisida, dapat menyebabkan gangguan ekosistem pertanian (Speight *et al.*, 2008). Uji keamanan hayati terhadap organisme bukan sasaran sangat perlu dilakukan untuk menilai risiko potensial aplikasi insektisida yang diakibatkan terhadap musuh alami dalam suatu ekosistem pertanian (Sterk *et al.*, 2002).

Uji Toksisitas terhadap Musuh Alami

Untuk melakukan pengujian keamanan hayati, kita dapat merujuk ke metode standar yang dilakukan oleh Hassan (1985) dan dikembangkan oleh kelompok kerja *International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants, West Palaearctic Regional Section* (IOBC/WPRS). Pengujian tersebut terdiri atas tiga tahap, yaitu pengujian laboratorium, semi lapangan, dan lapangan (Hasan 1985), yang dapat digambarkan dalam skema Gambar 5.



Gambar 5. Prosedur berurutan untuk menguji efek samping pestisida terhadap artropoda berguna

Pengujian laboratorium. Prosedur pengujian laboratorium adalah sebagai berikut:

- a) organisme yang akan diuji, dipaparkan pada lapisan tipis pestisida di permukaan substrat, seperti pelat kaca, daun, atau tanah berpasir;
- b) pengujian menggunakan konsentrasi pestisida yang direkomendasikan; lapisan pestisida diaplikasikan merata pada permukaan substrat dengan dosis 1-2 mg cairan per cm² pada kaca atau daun dan 6 mg cairan per cm² pada pasir (tanah);
- c) organisme yang digunakan merupakan hasil perbanyakan dari laboratorium yang umurnya seragam;
- d) periode pemaparan yang memadai sehingga pengaruhnya akan terlihat;

- e) tempat pengujian memiliki ventilasi yang memadai;
- f) menggunakan pembanding/kontrol, yaitu air dan bahan lain yang memang terbukti beracun terhadap organisme uji;
- g) parameter yang diamati berupa mortalitas maupun kemampuan lain organisme uji, seperti kemampuan bertelur dan lain sebagainya.

Kategori penilaian yang digunakan seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Kategori penilaian keamanan pestisida terhadap organisme berguna tingkat laboratorium

Kategori	Mortalitas	Keterangan
1	< 50%	tidak berbahaya (<i>harmless</i>)
2	50-79%	sedikit berbahaya (<i>slightly harmful</i>)
3	80-99%	cukup berbahaya (<i>moderately harmful</i>)
4	> 99%	berbahaya (<i>harmful</i>)

Sumber: Hassan (1985).

Pengujian tingkat laboratorium dilakukan pada kondisi yang memungkinkan organisme uji kontak secara intensif pada substrat. Jika hasil pengujian menunjukkan kategori aman di tingkat laboratorium, maka tidak perlu dilakukan pengujian lanjut. Hal ini disebabkan karena intensitas kontak dengan residu di tingkat semilapangan maupun lapang tidak setinggi di tingkat laboratorium. Oleh sebab itu, pestisida yang telah dinyatakan aman di laboratorium dianggap tidak menimbulkan dampak yang berarti pada organisme berguna (Dadang dan Priyono, 2008).

Contoh pengujian di laboratorium dilakukan oleh Ujjan *et al.* (2017) menguji pengaruh biopestisida yang mengandung ekstrak daun tembakau dengan pembanding insektisida sintetik golongan organofosfat dan neonikotinoid terhadap serangga predator *Menochilus sexmaculatus* (Coleoptera: Coccinellidae) di laboratorium. Organofosfat dan neonikotinoid masing-masing merupakan insektisida sintetik racun syaraf dari golongan 1B dan

4A menurut klasifikasi IRAC (*Insecticide Resistance Action Committee*) (2022). Masing-masing telur, larva instar ke-1 sampai 4, pupa, dan imago *M. sexmaculatus* disemprot dengan konsentrasi tertentu kemudian dimasukkan ke dalam petridish dan diberi makan aphid. Mortalitas serangga uji diamati setelah 24, 48, 72, 96, dan 120 jam setelah aplikasi. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak daun tembakau toksik terhadap serangga predator tersebut, namun lebih rendah dibandingkan dengan insektisida sintetik organofosfat dan neonikotinoid.

Contoh lainnya dilakukan oleh Santos *et al.* (2015) yang menguji formula azadirachtin EC (11,4 g b.a/l) yang mengandung limonoid, azadirachtin, dan 3- tigloylazadirachtol. Formula azadirachtin tersebut diujikan terhadap larva dan pupa ektoparasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). Pengujian formula terhadap larva dan pupa *T. radiata* dilakukan dengan cara menempatkan ranting kemuning (*Murayya paniculata*) yang terdapat nimfa instar ke-4 dan 5 *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), hasil perbanyakan di laboratorium, ke pucuk bibit kemuning dan ditumbuhkan di wadah plastik (volume 50 ml). Setelah semua nimfa berpindah ke bibit maka ranting dikeluarkan dan jumlah nimfa *D. citri* dihitung. Selanjutnya, bibit yang terdapat nimfa *D. citri* tersebut dipindahkan ke dalam kurungan kemudian imago betina ektoparasit *T. radiata* dilepaskan ke dalam kurungan. Rasio *T. radiata* terhadap *D. citri* adalah 1:10, satu ekor imago betina *T. radiata* dilepaskan pada populasi 10 ekor *D. citri*. Imago betina *T. radiata* diberi waktu selama 48 jam untuk memarasit inangnya (*D. citri*). Setelah 48 jam, imago betina parasitoid *T. radiata* dikeluarkan dari kurungan sedangkan nimfa *D. citri* dibiarkan di dalam kurungan. Setelah empat hari sejak *T. radiata* dikeluarkan, dihitung nimfa *D. citri* yang terparasit (ditandai nimfa terlihat mengeras seperti mumi) dan kemudian disemprot dengan formula pestisida pada konsentrasi setara LC₉₀ pada pengujian toksisitas *D. citri*. Setelah sembilan hari sejak

imago betina parasitoid *T. radiata* dikeluarkan, pupa *T. radiata* disemprot dengan formula pestisida pada konsentrasi setara LC₉₀ pada pengujian toksisitas *D. citri*.

Pengamatan terhadap larva *T. radiata* dilakukan setelah 10 hari sejak perlakuan dan terhadap pupa dilakukan lima hari setelah perlakuan, dengan cara menghitung parasitoid yang keluar pada masing-masing unit perlakuan. Toksisitas formula terhadap larva dan pupa dihitung berdasarkan jumlah parasitoid yang keluar pada perlakuan dan kontrol, menggunakan formula Henderson and Tilton (1955):

$$E (\%) = 100 \times [1 - (Ta \times Cb) / Tb \times Ca]$$

- E = mortalitas serangga (%)
- Tb = jumlah serangga sebelum perlakuan pada perlakuan
- Ta = jumlah serangga setelah perlakuan pada perlakuan
- Cb = jumlah serangga sebelum perlakuan pada kontrol
- Ca = jumlah serangga setelah perlakuan pada kontrol

Hasil penelitian Santos *et al.* (2015) tersebut menunjukkan formula azadirachtin tidak berbahaya terhadap larva dan pupa parasitoid *T. radiata*, namun dapat menyebabkan kematian terhadap serangga imago/dewasanya sebesar 77,8% setelah 24 jam perlakuan. Walaupun menunjukkan toksisitas yang tinggi terhadap fase imago, formula biopestisida tersebut memiliki durasi aktivitas yang membahayakan yang singkat, yaitu kurang lebih tiga hari (Santos *et al.*, 2015).

Pengaruh formula bioinsektisida terhadap entomopatogen dapat dilakukan dengan pengujian sinergisme dengan melihat hasil toksisitasnya terhadap serangga uji. Sebagai contoh, Rohimatun *et al.* (2015) melakukan pengujian formula minyak mimba, cengkeh, dan serai wangi yang dikombinasikan dengan cendawan *B. bassiana* dan *M. anisopliae*. Masing-masing minyak sesuai konsentrasi perlakuan dicampur dengan cendawan

entomopatogen, kemudian dilakukan pengujian toksisitas terhadap *H. antonii* menggunakan metode semprot serangga. Hasil pengujian menunjukkan bahwa *B. bassiana* bersinergi kuat dengan minyak mimba yang ditunjukkan dengan kemampuan cendawan tersebut berkembang dalam petridish yang medianya diberi perlakuan minyak mimba. Di samping itu, mortalitas *H. antonii* yang diberi perlakuan kombinasi *B. bassiana* dan minyak mimba cukup tinggi.

Pengujian semilapangan. Apabila pengujian tingkat laboratorium menunjukkan berbahaya, maka pengujian keamanan terhadap organisme berguna dapat dilanjutkan ke tingkat pengujian semilapangan dengan prosedur sebagai berikut

- a) lokasi pengujian di semilapangan, seperti rumah kaca atau tempat yang didesain seperti lapang;
- b) organisme yang digunakan merupakan hasil perbanyakan dari laboratorium yang umurnya seragam;
- c) aplikasi dilakukan dengan cara disemprotkan di tanaman yang memiliki daun yang lebat (titik limpasan);
- d) menggunakan konsentrasi pestisida yang direkomendasikan;
- e) menggunakan pembanding, yaitu kontrol air dan bahan yang memang beracun terhadap organisme uji;
- f) tersedia inang atau mangsa di dekat area pengujian;
- g) periode pemaparan yang memadai sehingga pengaruhnya akan terlihat.

Kategori penilaian yang digunakan seperti yang tertera pada Tabel 3.

Tabel 3. Kategori penilaian keamanan pestisida terhadap organisme berguna tingkat semilapangan

Kategori	Mortalitas	Keterangan
1	< 25%	tidak berbahaya (<i>harmless</i>)
2	25-50%	sedikit berbahaya (<i>slightly harmful</i>)
3	51-75%	cukup berbahaya (<i>moderately harmful</i>)
4	> 75%	berbahaya (<i>harmful</i>)

Sumber: Hassan (1985).

Pengujian lapangan. Apabila pengujian tingkat semilapangan menunjukkan berbahaya, maka pengujian keamanan terhadap organisme berguna dapat dilanjutkan ke tingkat pengujian lapangan dengan prosedur sebagai berikut:

- a) menggunakan tanaman yang biasa dihuni oleh organisme uji;
- b) menggunakan organisme uji atau arthropoda yang dipelihara di laboratorium atau yang berkembang biak secara alami;
- c) pengambilan sampel dilakukan pada waktu sebelum dan sesudah perlakuan;
- d) dosis/konsentrasi yang digunakan dan jumlah perlakuan sesuai dengan rekomendasi praktik pertanian yang baik (SOP, *Good Agricultural Practice*) menggunakan pembandingan, yaitu kontrol air dan bahan yang memang diketahui berbahaya terhadap organisme uji;
- e) individu yang mati dan yang hidup diamati, kemudian dihitung untuk dilakukan analisis statistik.

Kategori penilaian yang digunakan seperti yang tertera pada Tabel 4.

Tabel 4. Kategori penilaian keamanan pestisida terhadap organisme berguna tingkat lapang

Kategori	Mortalitas	Keterangan
1	< 25%	tidak berbahaya (<i>harmless</i>)
2	25-50%	sedikit berbahaya (<i>slightly harmful</i>)
3	51-75%	cukup berbahaya (<i>moderately harmful</i>)
4	> 75%	berbahaya (<i>harmful</i>)

Sumber: Hassan (1985).

Uji Toksisitas Ikan dan Udang

Pengujian toksisitas terhadap ikan mengikuti metode Koesoemadinata (2000). Jenis ikan yang digunakan adalah ikan mas (*Cyprinus carpio*), nila (*Oreochromis niloticus*), dan lele (*Clarias batrachus*), sedangkan jenis udangnya adalah udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*) dan udang air asin (*Artemia salina*). Bobot ikan dan udang yang ideal untuk pengujian toksisitas ditampilkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Bobot dan panjang baku rata-rata hewan uji (n = 60)

Hewan uji	Bobot rata-rata (g)	Panjang baku rata-rata (cm)
Ikan mas	1,4 ± 0,2	4,5 ± 0,3
Ikan nila	1,7 ± 0,1	3,8 ± 0,3
Ikan lele	0,6 ± 0,5	4,8 ± 0,5
Udang galah	0,5 ± 0,1	4,9 ± 0,3

Sumber: Koesoemadinata (2000).

Beberapa persyaratan penanganan hewan uji harus dipenuhi. Persyaratan tersebut antara lain, hewan perlu diadaptasikan terlebih dahulu dalam kondisi laboratorium selama 7-10 hari. Apabila selama masa adaptasi terdapat kematian hewan uji lebih dari 10% dan atau hewan uji terkena penyakit atau cacat lebih dari 1%, maka populasi hewan uji tidak dapat digunakan. Selama masa adaptasi, hewan uji diberi pakan komersial (3-5% bobot

badan/hari). Sehari sebelum digunakan untuk pengujian, hewan uji dipuasakan terlebih dahulu.

Uji toksisitas ikan. Pengujian yang digunakan mengikuti metode baku Uji Toksisitas Akut dengan Sistem Penggantian Air (*Renewel Test*) (OECD 2012), dengan prosedur sebagai berikut:

- a) pengujian menggunakan bak kaca ($p = 50$ cm, $l = 30$ cm, $t = 30$ cm) yang dilengkapi dengan pipa pelimpasan dari PVC untuk memudahkan penggantian larutan uji selama pengujian;
- b) volume campuran sebanyak 20 l, berupa campuran insektisida yang terdispersi secara homogen dalam air sumur dengan konsentrasi sesuai pengujian;
- c) jumlah hewan uji yang digunakan per ulangan sebanyak sepuluh ekor yang diulang sebanyak tiga kali;
- d) selama pengujian larutan uji harus diperhatikan aerasi dan kadar oksigennya ($> 60\%$ saturasi);
- e) parameter mutu air yang harus diperhatikan, meliputi fisika dan kimia, seperti suhu ($^{\circ}\text{C}$), oksigen terlarut (mg/l), pH, CO_2 bebas (mg/l), N-ammonia (N-NH_3) (mg/l), kesadahan total (mg CaCO_3/l), dan alkalinitas total (mg CaCO_3/l);
- f) larutan uji harus memenuhi kriteria pengujian toksisitas (US-EPA 2002), larutan uji diganti setiap 48 jam sekali dengan konsentrasi perlakuan pestisida uji yang sama. Penggantian ini bertujuan untuk (1) menjaga konsentrasi larutan pestisida uji dalam kondisi konstan karena adanya proses penguapan, adsorpsi pada dinding kaca bak uji, dan penyerapan oleh tubuh ikan; serta (2) membersihkan larutan uji dari kotoran hewan yang dapat menurunkan mutu air karena terjadi peningkatan kadar amonia.

Uji toksisitas udang galah. Pengujian toksisitas dengan udang galah menggunakan bak kaca ($p = 50$ cm, $l = 30$ cm, $t = 30$ cm), dengan tinggi air 10 cm. Kondisi pengujian lain sama seperti pada pengujian terhadap ikan. Pengujian toksisitas akut terhadap udang galah dilakukan melalui dua tahap:

- a) uji pendahuluan, untuk menentukan **rentang** konsentrasi yang dapat mematikan hewan uji 0-100% dalam waktu 48 jam;
- b) uji lanjutan menggunakan enam konsentrasi uji berdasarkan hasil uji pendahuluan yang ditentukan berdasarkan deret logaritmik ditambah kontrol, dengan waktu pemaparan 96 jam.

Pengamatan mortalitas pada hari pertama dilakukan setiap jam, selanjutnya setiap 24, 48, 72, dan 96 jam. Hewan uji yang mati segera diambil agar tidak mencemari yang masih hidup. Data yang diperoleh dianalisis probit (Finney, 1971). Hasil analisis dinyatakan dalam nilai LC_{50} (*Median Lethal Concentration*) dengan limit kepercayaan 95%. Hasil perhitungan dapat ditentukan toksisitasnya berdasarkan klasifikasi sesuai Tabel 6.

Tabel 6. Klasifikasi toksisitas pestisida terhadap udang galah

LC_{50} (mg/l)	Kriteria
< 0,5	Sangat toksik
0,5 – 5	Toksik
5 – 50	Toksik sedang
>50	Kurang toksik

Sumber: Bathe et al. (1974).

Uji toksisitas udang air asin (*Artemia salina*)

Efek racun biopestisida terhadap organisme nontarget dapat diketahui dengan pengujian *Brine Shrimp Lethality Assay* (BSLA). Pengujian dengan metode BSLA menggunakan nauplius (larva udang instar ke-1) *A. salina* untuk menilai secara dini toksisitas

biopestisida yang akan dikembangkan sebagai pestisida (Hamidi *et al.*, 2014).

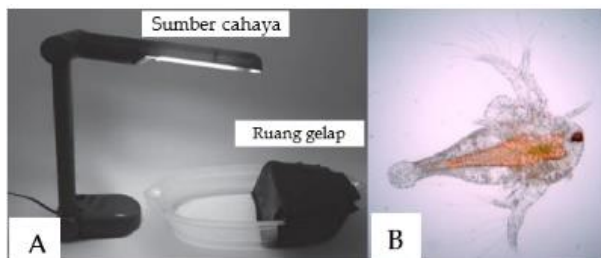
Pengujian toksisitas menggunakan metode BSLA mempunyai beberapa keuntungan, yaitu (a) **cepat** (monitoring dapat diperpanjang hingga maksimum 60 jam, tetapi kebanyakan pengujian yang telah dilakukan untuk perhitungan LC₅₀ adalah data 24 jam); (b) **sederhana** (tidak diperlukan pelatihan khusus untuk dapat menjalankan peralatan dan pengujian); (c) **tidak banyak persyaratan yang diperlukan** (tidak ada prosedur aseptik, tidak ada peralatan khusus, sampel pengujian yang diperlukan relatif sedikit, serta organisme uji dengan umur dan kondisi fisiologis yang sama dapat diperoleh dengan mudah dan dalam jumlah yang banyak); (d) **mudah dalam mendapatkan hewan uji**, (kista/telur *A. salina* dijual dan tersedia secara komersial sehingga pengujian dapat dilakukan di seluruh dunia dengan bahan orisinil dan tanpa masalah ketersediannya); (e) **tidak mahal** (jumlah kista yang dibutuhkan tiap pengujian sangat sedikit sehingga harganya dapat diabaikan); dan (f) **ulangan dapat dilakukan dalam jumlah yang banyak** (Hamidi *et al.*, 2012).

Penggunaan metode BSLA untuk menguji toksisitas suatu formulasi harus memenuhi beberapa kriteria. Beberapa kriteria yang harus dipenuhi ketika menggunakan metode BSLA, antara lain (a) kondisi eksperimental (suhu, salinitas, aerasi, cahaya, dan pH) terstandar; (b) wilayah geografis asal kista harus sama untuk pengujian; (c) umur nauplius *A. salina* yang digunakan untuk pengujian sama untuk setiap pengujian; dan (d) harus ada kontrol positif dan negatif, untuk memeriksa sensitivitas larva dan kesesuaian dengan prosedur yang terstandar (Vanhaecke *et al.*, 1981).

Sebelum menggunakan *A. salina* sebagai bahan untuk pengujian, ada beberapa tahap yang harus disiapkan. Penyiapan nauplius *A. salina* dilakukan dengan merendam 1 g kista *A. salina*

di dalam wadah berisi 2 l air laut buatan (40 g NaCl dalam 2 l air) yang telah disaring dengan saringan halus dan dilengkapi penerangan dari lampu pijar 40 - 60 W, serta diaerasi selama 48 jam (Muaja *et al.*, 2013).

Wadah penetasan kista terdiri dari atas dua ruangan yang dipisah dengan sekat. Sekat pertama ditutup dengan kain supaya kondisinya gelap dan digunakan untuk penetasan, sedangkan sekat lainnya terbuka dan disinari dengan cahaya lampu (Gambar 6). Sekat pemisah kedua ruangan dilubangi supaya nauplius *A. salina* yang menetas dalam kompartemen penetasan kista dapat bermigrasi ke bagian yang disinari cahaya.



Gambar 6. Kontainer yang digunakan untuk menetas kista *A. salina* (Pellosi *et al.*, 2013) (A) dan nauplius *A. salina* (foto: Juan Camilo Jaramillo) (B)

Pasokan air ke dalam tempat penetasan harus bertekanan cukup supaya proses penetasan berhasil karena kista *A. salina* akan menetas apabila air laut buatan mengandung 90% oksigen jenuh (Vanhaecke *et al.*, 1981). Selain itu, distribusi oksigen dalam air laut akan dicapai melalui aerasi konstan dan tekanan dalam larutan selama 48 jam untuk mencapai fase nauplius *A. salina* dewasa.

Penetasan diawali dengan penaburan sedikit kista kering *A. salina* ke dalam kompartemen yang gelap lalu ditaburkan lagi 0,06% sebagai pakan larva. Setelah 24 jam, larva akan menetas menjadi instar ke-2 kemudian berkembang menjadi instar ke-3 dan 4 (Parra

et al., 2001). Setelah 36 jam inkubasi pada suhu kamar (22-29°C), nauplius *A. salina* akan keluar dari cangkang telur dan tertarik sumber cahaya ke kontainer yang disinari cahaya.

Beberapa faktor yang memengaruhi sensitivitas nauplius *A. salina* adalah pH dan suhu air, intensitas cahaya, serta instar (Hamidi *et al.*, 2014).

pH air. pH merupakan faktor yang sangat penting untuk penetasan kista *A. salina*. Rentang pH optimal adalah $8,0 \pm 0,5$. Jika perlu, pH harus disesuaikan menggunakan NaOH atau Na_2CO_3 , untuk menghindari kematian larva *A. salina* akibat penurunan pH selama inkubasi (Vanhaecke *et al.*, 1981; Parra *et al.*, 2001).

Suhu. Variasi suhu memengaruhi proses penetasan kista *A. salina*. Suhu sedang cenderung lebih hangat memungkinkan kista lebih cepat menetas. Pada suhu 20 °C kista *A. salina* yang menetas sebanyak 50% setelah 30 jam sejak ditetaskan, sedangkan pada suhu 24 °C sebanyak 50% kista yang menetas dalam waktu 21 jam. Pada suhu 24°C, > 60% nauplius berhasil *molting* (ganti kulit) ke instar ke-2 pada 16 jam setelah menetas, sedangkan pada 20 °C dibutuhkan 35 jam untuk sampai pada tahap yang sama (Tabel 7) (Sorgeloos *et al.*, 1978).

Stimulus cahaya. Perkembangan embrio *A. salina* dirangsang oleh cahaya. Jika tidak ada cahaya, perkembangan embrio *A. salina* akan terhambat (Sorgeloos *et al.*, 1978; Sorgeloos 1973).

Tabel 7. Persentase kista yang menetas dan berhasil *molting* berdasarkan suhu media

Suhu media (°C)	Kista yang menetas (%)	Waktu menetas (jam)	Capaian fase perkembangan
20	50	30	I
24	50	21	I
Suhu media (°C)	Kista yang menetas (%)	Waktu menetas + waktu molting (jam)	Capaian fase perkembangan
20	~ 60	30 + 35	II
24	>60	21 + 16	II

Instar A. salina yang digunakan. Nauplius *A. salina* hanya mengkonsumsi kuning telur mereka sebagai sumber makanan dan mereka lebih tahan terhadap kontrol positif (asam kromat) karena epitel saluran pencernaannya yang tidak berkembang dengan baik sehingga mampu menonaktifkan penyerapan nutrisi dan senyawa beracun di media luar (Sorgeloos *et al.*, 1978). Meskipun pengujian yang dilakukan pada kondisi suhu, salinitas, cahaya, tekanan, dan pH yang konstan, kepekaan nauplius *A. salina* akan berbeda, tergantung pada tahap perkembangannya (Hamidi *et al.*, 2014).

Mortalitas atau kematian merupakan respon organisme uji yang umum diamati. Toksisitas organisme air, seperti ikan, serangga air, maupun udang, dinyatakan dalam nilai LC₅₀, bukan LD₅₀ (LD = *Lethal Dose*). Hal ini dikarenakan banyaknya racun yang diberikan ke organisme tersebut tidak dapat diketahui dengan pasti. Dalam kaitannya dengan kecepatan kerja suatu pestisida, toksisitasnya dinyatakan dalam nilai LT₅₀ (LT = *Lethal Time*) (Dadang dan Priyono, 2008). Uji toksisitas BSLA dapat mengikuti metode yang diuraikan oleh Sangi *et al.* (2012). Secara umum, alur pengujian toksisitas BSLA disajikan pada Gambar 7.



Gambar 7. Alur pengujian toksisitas metode BSLA

Sebanyak 6 ml larutan uji dengan beberapa level konsentrasi (100; 50; 25; 12,5; dan 0 ppm) dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, ke dalam setiap tabung ditambahkan 10 ekor larva udang *A. salina* yang telah berumur dua hari. Kontrol positif adalah perlakuan yang mengandung senyawa beracun terhadap larva udang *A. salina*, misalnya vinkristin sulfat, potassium dikromat, timol, siklofosamid, kafein, atau DMSO murni. Sementara itu, kontrol negatif berupa pelarut yang digunakan untuk melarutkan ekstrak/minyak yang digunakan. Kontrol negatif bermanfaat untuk mengeliminasi faktor lain yang memengaruhi jumlah total nauplius yang mati (Hamidi *et al.*, 2014).

Toksistas ekstrak bahan pestisida nabati dapat ditentukan dalam kisaran konsentrasi 10, 100, dan 1000 $\mu\text{g/ml}$. Pengamatan mortalitas larva udang *A. salina* dilakukan setiap jam sampai jam ke-6 setelah perlakuan. Pengamatan mortalitas berikutnya dilakukan pada 12, 18, dan 24 jam setelah perlakuan. Analisis data perhitungan nilai LC dilakukan dengan cara transformasi %

kematian ke dalam log konsentrasi. Persentase mortalitas dihitung dengan rumus:

$$\text{Mortalitas} = [\text{jumlah larva yang mati} / \text{jumlah larva uji}] \times 100\%$$

Nilai LC_{50} diduga dari hasil analisis regresi probit (Finney, 1971). Metode statistik Finney dapat dihitung dengan menggunakan beberapa paket perangkat lunak, seperti POLO, PoloPlus, Stata, MatLab, R, dan SAS, IBM SPSS, yang memungkinkan penghitungan terkomputerisasi dengan interval kepercayaan tertentu. Perhitungan dengan analisis regresi probit tidak memberikan konsentrasi mematikan yang tepat, artinya penduga, dari bahan yang diuji. Namun, hasil analisis regresi probit tersebut adalah data awal yang signifikan untuk pengujian toksisitas selanjutnya. Dalam kebanyakan pengujian, percobaan diulang sebanyak tiga kali (Sharma *et al.*, 2013; Pisutthanan *et al.*, 2004; Parra *et al.*, 2001).

Hasil analisis probit nilai LC dan persamaan probit berupa persamaan: $y = a + bx$

y = probit mortalitas pada konsentrasi C

a = intersep

b = kemiringan garis

x = log konsentrasi

Dari persamaan tersebut dapat dihitung nilai LC_{50} dengan memasukkan nilai probit (50% kematian). Tingkat toksisitas bahan uji, yang dinyatakan sebagai nilai LC_{50} , selanjutnya dapat dibandingkan dengan indeks toksisitas Meyer atau Clarkson seperti pada Tabel 8 (Hamidi *et al.*, 2012).

Tabel 8. Indeks toksisitas Meyer dan Clarkson

Indeks toksisitas Meyer*		Indeks toksisitas Clarkson**	
LC ₅₀ (µg/ml)	Kriteria	LC ₅₀ (µg/ml)	Kriteria
> 1000	tidak beracun	> 1000	tidak beracun
< 1000	toksik	500 – 1000	toksik rendah
		100 – 500	toksik sedang
		0 – 100	sangat beracun

Keterangan: *Meyer et al. (1982); **Clarkson et al. (2004).

Dikarenakan isu etik dalam pengujian toksikologi, penggantian hewan uji dengan model alternatif sangat penting. Keefektifan pengujian dengan *A. salina* untuk memprediksi toksisitas ekstrak tumbuhan, dapat dievaluasi dengan membandingkan LC₅₀ *A. salina* dengan LD₅₀ pengujian toksisitas akut pada tikus dan mencit (Sharma et al., 2013; Naidu et al., 2014; Parra et al., 2001). Beberapa penelitian menunjukkan metode pengujian toksisitas BSLA menggunakan *A. salina* berkorelasi dengan metode pengujian toksitas lainnya, seperti Uji Toksisitas Mulut Akut pada Tikus (*Acute Oral Toxicity Assay in Mice/AOTAiM*) (Parra et al., 2001). Beberapa bukti adanya korelasi BSLA dengan AOTAiM disajikan pada Tabel 9. Parra et al. (2001) meneliti toksisitas 20 ekstrak tumbuhan dari spesies yang berbeda menggunakan BSLA dan studi in vivo dengan tikus (Tabel 10).

Tabel 9. Bukti penelitian keterkaitan antara hasil metode pengujian toksitas BSLA dan AOTiM

Tanaman	Pelarut	Kriteria toksisitas LC ₅₀		Referensi
		BSLA	AOTAiM	
<i>Metha spicata</i>	metanol	> 1000 µg/ml (tidak toksik)	> 5000 mg/kg (tidak toksik)	Naidu et al. (2014)
<i>Pterocarpus indicus</i>	etanol	23,6 mg/l (tidak toksik)	> 15.000 mg/kg (tidak toksik)	Angelina et al. (2014)
<i>Swietenia mahagoni</i>	metanol	2500 – 8000 mg/kg (tidak toksik)	> 5000 mg/kg (tidak toksik)	Sahgal et al. (2010)

Tabel 10. Toksisitas beberapa ekstrak tanaman terhadap larva udang dan tikus

Spesies tanaman	LD ₅₀ (µg/ml) larva udang	LD ₅₀ (mg/kg) tikus
<i>Aloe vera</i> (L.) Burm.	3,59	120,65
<i>Artemisia absinthium</i> L.	15,74	2.499,10
<i>Citrus aurantium</i> L.	3,99	476,94
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC. Ex Nees) Stapf	9,83	460,00
<i>Datura stramonium</i> L.	12,86	821,93
<i>Justicia pectoralis</i> Jacq.	60,14	3.531,11
<i>Musa x paradisiaca</i> L.	15,10	383,97
<i>Ocimum basilicum</i> L.	9,92	956,50
<i>Ocimum gratissimum</i> L.	18,76	2.081,00
<i>Ocimum tenuiflorum</i> L.	18,75	1.540,00
<i>Orthosiphon aristatus</i> (Blume) Miq	16,72	5.026,31
<i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr.	32,78	2.560,00
<i>Piper auritum</i> Kunth	26,67	1.802,00
<i>Plantago major</i> L.	4,74	182,54
<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.	52,29	4.902,92
<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.	82,27	8.193,00
<i>Ruta graveolens</i> L.	5,39	219,45
<i>Senna alata</i> (L.) Roxb.	7,74	1.459,32
<i>Stachytarpheta jamaicensis</i> (L.) Valh	14,51	2.035,12
<i>Thuja occidentalis</i> L.	11,94	440,00

Sumber: Parra et al. (2001).

Hasil uji in vivo menggunakan tikus uji menunjukkan bahwa toksisitas ekstrak air *Plectranthus amboinicus* paling tidak beracun (LC₅₀ udang = 82,27 µg/ml; LD₅₀ tikus = 8193,0 mg/kg), sedangkan ekstrak *Aloe vera* paling beracun (LC₅₀ BSLA = 3,59 µg/ml; LD₅₀ tikus = 120,6 mg/kg). Apabila hasil uji toksisitas in vivo menggunakan larva *A. salina* sejalan dengan in vitro, maka uji toksisitas awal dengan metode BSLA dapat digunakan. Lebih lanjut, Gosselin et al. (1984) mengelompokkan nilai LD₅₀ oral untuk manusia dengan tikus seperti yang tertera pada Tabel 11.

Tabel 11. Perbandingan hubungan antara toksisitas berdasarkan nilai LD₅₀ pada tikus dengan manusia dengan angka Gosselini

LD ₅₀ tikus (mg/kg)	Toksisitas manusia
< 5	luar biasa beracun (<i>super toxic</i>)
5-50	ekstrim beracun (<i>extremely toxic</i>)
50-500	sangat beracun (<i>very toxic</i>)
500-5.000	cukup beracun (<i>moderately toxic</i>)
5.000-15.000	sedikit beracun (<i>slightly toxic</i>)
>15.000	tidak beracun (<i>non-toxic</i>)

Sumber: Gosselin *et al.* (1984).

Hasil pengujian toksisitas menggunakan ikan dan udang dengan metode yang telah diuraikan di atas, tentunya sangat beragam. Faktor-faktor yang memengaruhi keragaman hasil pengujian, antara lain

- (1) bahan aktif dan formulasi pestisida uji (Jarvinen dan Tanner, 1982; Priyamvadadewi *et al.*, 1981);
- (2) *mode of action* (cara kerja) pestisida uji;
- (3) jenis ikan (Macek dan Allister, 1970);
- (4) ukuran dan stadia ikan yang diuji (Singh dan Narain, 1982; Bull dan McNerny, 1974; Hashimoto *et al.*, 1981);
- (5) adsorpsi dan metabolisme tubuh ikan (US-EPA, 1980; Rao *et al.*, 1981);
- (6) musim (Singh dan Narain, 1982);
- (7) kualitas air (Cairns *et al.*, 1975; Inglis dan Davis, 1972; Weber, 1972);
- (8) nilai BCF (*Biological Concentration Factor*);
- (9) sistem pengujian yang digunakan, apakah dengan sistem statis (*static test*) atau mengalir (*flowthrough test*) (Mayer dan Ellersieck, 1986). Rasio sistem statis dan sistem mengalir adalah < 2 (Racke, 1993). Pada sistem statis, kadar oksigen

terlarut dapat menurun karena adanya kematian ikan yang diuji. Konsentrasi bahan uji akan menurun seiring dengan waktu pemaparan. Perbedaan antara konsentrasi nominal dan konsentrasi aktual dalam wadah pengujian berkisar 30-45% (Schimmel *et al.*, 1977). Hal ini akan memengaruhi akurasi dan reproduibilitas hasil pengujian toksisitas akut pada sistem tersebut;

- (10) faktor fisika dan kimia. Peningkatan suhu dapat mengakibatkan peningkatan toksisitas biota akuatik (Mayer dan Ellersieck, 1986).

BAB 8.

RESISTENSI TERHADAP ANTIBIOTIK DAN REAKSI ALERGI

Resistensi terhadap Antibiotik

Agens hayati yang akan digunakan pada pakan tambahan harus memerhatikan sensitifitasnya terhadap antibiotik. Semakin tidak tahan/tidak resisten terhadap antibiotik maka semakin baik (EFSA, 2012a). Sebagai contoh, agens hayati yang tahan terhadap ampisilin (nilai *Minimum Inhibitory Concentration*/MIC > 2 µg/ml) tidak cocok digunakan dalam pakan tambahan karena ampisilin banyak digunakan pada pengobatan manusia dan hewan (EFSA, 2012).

Walaupun kriteria ketahanan terhadap antibiotik belum menjadi persyaratan pengujian keamanan untuk agens hayati yang akan digunakan pada pengendalian hama dan patogen tanaman, tetapi alangkah baiknya hal ini sudah mulai diperhatikan pada waktu seleksi agens hayati. Hal ini disebabkan karena sifat ketahanan terhadap antibiotik dari suatu bakteri dapat dipindahkan melalui mekanisme transformasi gen ketahanan. Oleh karena itu, penggunaan biopestisida yang mengandung bakteri yang tahan terhadap jenis-jenis antibiotik, yang biasa digunakan pada manusia dan hewan, dikhawatirkan dapat

berdampak pada sistem kekebalan tubuh manusia atau hewan terhadap antibiotik tertentu.

Resistensi bakteri terhadap antibiotik dapat dilihat berdasarkan respons pertumbuhan bakteri terhadap perlakuan antibiotik pada konsentrasi minimum (MIC). Pertumbuhan bakteri yang rentan atau sensitif terhadap antibiotik akan memperlihatkan zona bening di sekitar koloni bakteri, sedangkan yang resisten atau tahan tidak akan memperlihatkan zona bening.

Jenis-jenis antibiotik yang telah disepakati untuk pengujian adalah ampisilin, vankomisin, gentamisin, kanamisin, streptomisin, eritromisin, klindamisin, tetrasiklin, dan khloramfenikol. Untuk beberapa kasus tertentu, juga ditambahkan antibiotik tilosin, apramisin, nalidiksik asid, sulfonamid, dan trimetoprim. Kisaran konsentrasi untuk setiap jenis antibiotik yang akan diujikan terhadap mikroorganisme hayati berbeda-beda (Tabel 12). Sementara itu, kriteria dasar untuk menentukan respons tahan (resisten) atau rentan (sensitif) dapat dilihat pada Tabel 13.

Tabel 12. Batas nilai konsentrasi (*cut-off*) dalam pengujian resistensi dari mikroorganisme hayati terhadap antibiotik

Jenis antibiotik	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)
Ampisilin	1 - 8
Eritromisin	0,50 - 4
Gentamisin	4 - 64
Kanamisin	8 - 64
Khloramfenikol	2 - 8
Silindamisin	0,25 - 4
Streptomisin	8 - 64
Tetrasiklin	2 - 8
Vankomisin	2 - 4

Sumber: EFSA (2012).

Tabel 13. Kriteria dasar respons ketahanan strain mikroba terhadap antibiotik

Kriteria	Keterangan
Sensitif	Strain yang diuji menunjukkan respons sensitif pada konsentrasi sama atau lebih besar dari nilai <i>cut off</i> ($S \leq \times \text{mg/l}$)
Resisten I	Strain yang diuji menunjukkan respons tahan pada konsentrasi lebih besar dari nilai <i>cut off</i> ($R > \times \text{mg/l}$)

Keterangan: Batas nilai cut off konsentrasi antibiotik untuk menilai ketahanan suatu mikroba agens hayati mengacu pada kriteria yang sudah ditetapkan EFSA (2012).

Reaksi Alergi

Alergi adalah respons imunitas tubuh berupa inflamasi, seperti panas, bengkak, nyeri, dan gangguan fungsi organ tubuh, akibat adanya benda asing atau alergen yang memicu terbentuknya antibodi E (IgE). Mikroba yang menjadi bahan aktif dari suatu formula biopestisida dan menghasilkan senyawa toksin, juga dapat memicu reaksi alergi pada manusia (Nordengr na *et al.*, 2018). Oleh karena itu, perlu dipastikan bahwa biopestisida tidak menimbulkan reaksi alergi yang membahayakan manusia, terutama kepada mereka yang kontak langsung dengan pestisida, seperti operator penyemprotan dan petani di lapangan.

Metode pengujian alergi sudah sangat berkembang untuk mendeteksi reaksi tubuh terhadap senyawa kimia berasal dari bahan makanan, kosmetik, cemaran udara, polen, debu, bulu hewan peliharaan, dan lainnya. Ada beberapa macam metode untuk menguji reaksi alergi, tetapi yang paling umum digunakan adalah metode **Tes Tusuk Kulit (Skin Prick/Puncture Testing)**. Tes alergi dapat dilakukan pada kulit hewan coba, seperti tikus. Di samping pengujian secara langsung, senyawa pemicu alergi juga dapat dideteksi secara tidak langsung menggunakan metode serologi. Apapun jenis metodenya, maka pengujian reaksi alergi

harus dilakukan oleh tenaga profesional, yaitu petugas khusus yang sudah terlatih.

Berikut adalah prosedur umum pengujian alergi yang dapat dilakukan untuk menguji keamanan biopestisida:

Tes Reaksi Alergi Metode Tusuk Kulit

Ekstrak tanaman atau mikroba yang menjadi bahan aktif formula biopestisida diteteskan atau disuntikkan pada permukaan kulit hewan uji ke dalam jaringan kulit dengan cara menusukkan ujung jarum steril. Apabila timbul gatal-gatal dan benjolan warna merah pada kulit dalam waktu 15-20 menit setelah pengujian maka berarti tes alergi positif.

Saat ini, tes intradermal mengikuti prosedur Golden *et al.* (2001), dengan menggunakan jarum 26 G untuk menyuntikkan secara intradermal. Konsentrasi ekstraksi antigen berkisar 0,01 – 0,05 ml. Batasan dari konsentrasi ekstrak adalah 1:500 sampai 1:1.000. Antigen disuntikkan ke intradermal hingga timbul gelembung berdiameter 3 mm. Reaksi alergi dinilai setelah 15-20 menit. Tetapi pada kasus tertentu, reaksi alergi baru dapat dibaca setelah 24 – 48 jam. Reaksi dianggap positif jika ditemukan bengkak dan kemerahan yang lebih besar dibandingkan gelembung awal, yaitu 3 mm, namun kriteria positif dalam tingkatan skala subjektif.

Tes Reaksi Alergi Metode Penetapan Imunosorben Tertaut Enzim (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay/ELISA*)

Ekstrak jamur *T. harzianum* dapat menimbulkan reaksi alergi pada kulit individu yang peka, berdasarkan respons peningkatan intensitas antibodi IgE menggunakan metode ELISA. Metode ELISA untuk mendeteksi IgE dilakukan oleh Das dan Gupta-Bhattacharya (2009) dengan prosedur sebagai berikut: sumur

mikrotiter ELISA diisi dengan 100 µl ekstrak antigen *T. harzianum* dalam larutan buffer (1:10 w/v dalam 0,1 M Tris-HCl, pH 7,4). Setelah diinkubasikan pada suhu 4 °C selama 16 jam, sumur dicuci dengan larutan *phosphate - buffer saline* (PBS) yang mengandung 0,5% Tween 20 (PBST) dan sisa buffer dikeringkan dengan cara menepukkan piring ELISA pada telapak tangan. Selanjutnya, ditambahkan larutan *blocking buffer* lalu diinkubasikan selama 3 jam pada suhu 25 °C dengan 1% BSA di PBS, diikuti dengan inkubasi berturut-turut dengan 100 µl serum pasien dan IgE-HRP peroksidase konjugat (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) dalam pengenceran yang tepat (1:1.000 dalam larutan *blocking buffer*). Selanjutnya, ke dalam campuran tersebut ditambahkan O-fenilen diamina dihidroklorida (OPD) dengan 0,01% H₂O₂ digunakan sebagai substrat. Absorbansi diukur pada 492 nm dan hasilnya dinyatakan sebagai nilai P/N (rasio kepadatan optik serum pasien terhadap normal kontrol).

Bab 9.

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MIKROB AGENS HAYATI SECARA KONVENSIONAL

Identitas agens hayati mikrob dari suatu produk biopestisida harus dinyatakan secara jelas melalui hasil-hasil pengujian yang mengacu pada standar baku. Dengan berkembangnya teknologi molekuler dalam identifikasi mikrob, termasuk bakteri, maka cara paling tepat adalah menggunakan metode pengujian secara molekuler. Namun, untuk menduga lebih awal, beberapa metode pengujian konvensional dapat digunakan, misalnya pembentukan spora dari suatu bakteri merupakan salah satu ciri khas dari *Bacillus* spp. Banyak *Bacillus* spp. yang berpotensi sebagai agens hayati.

Isolasi Mikrob Potensial

Sebelum masuk pada tahapan identifikasi, langkah pertama adalah mengisolasi mikrob yang potensial sebagai agens hayati. Mikrob potensial sebagai agens hayati dapat berasal dari beragam sumber tanaman dan serangga. Untuk tanaman, mikrob dapat diambil dari permukaan bagian tanaman sebelah atas, seperti daun (filosfir) dan ranting; bagian bawah tanaman, seperti akar, rimpang, dan umbi; atau dari sekitar akar (rizosfir); dan dari dalam jaringan tanaman (bakteri endofit).

Beberapa jenis media agar yang dapat digunakan untuk mengisolasi mikrob adalah:

- (a) *Nutrien Agar* (NA);
- (b) *Sucrose Peptone Agar* (SPA), terdiri dari sukrosa 20 g/l, pepton 5 g/l, KH_2PO_4 0,5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g/l, dan agar 14 g/l (Hayward, 1960; Lelliott dan Stead, 1987);
- (c) *Trypticase Soya Agar* (TSA), terdiri dari tripton 15,0 g/l, *soy peptone* 5 g/l, NaCl 5,0 g/l, dan agar 15 g/l; pH 7,3 atau media TSA siap pakai (TSA 15,0 g/l dan agar 15 g/l) (Hallmann *et al.*, 2006), King's B dari King *et al.* (1954); protease pepton 20,0 g/l, gliserol 10,0 g/l, K_2HPO_4 1,5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g/l, dan agar 15,0 g/l, pH 7,2 (Lelliott dan Stead, 1987),
- (d) *Yeast Dextrose Chalk Agar* (YDCA), terdiri dari *yeast extract* 10 g/l, dekstroza 20 g/l, CaCO_3 20 g/l, dan agar 15 g/l; pH 7,2 (Schaad, 2001).

Isolasi Mikrob dari Bagian Permukaan Tanaman

Isolasi mikrob dari bagian permukaan tanaman dapat mengacu pada metode Batool *et al.* (2016). Daun dicuci dengan air steril, dipotong kecil-kecil, direndam sebentar di dalam larutan kloroks (NaOCl) 70%, dan dikeringanginkan. Selanjutnya, sebanyak 3 g sampel daun diambil dan dihancurkan di dalam larutan *phosphate buffer saline* (PBS) steril (NaCl 8,0 g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,7 g/l, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,4 g/l (Lelliott dan Stead, 1987) dengan mortal steril atau alat pengocok (vorteks). Ekstrak tanaman yang diperoleh selanjutnya diencerkan secara berseri sebanyak $10\times$ di dalam akuades steril atau PBS steril. Selanjutnya, dari setiap pengenceran diambil 100 μl dan disebarakan pada permukaan media agar, seperti NA, PDA, maupun TSA. Setelah diinkubasikan beberapa hari pada suhu 28 °C, beberapa koloni tunggal, yang mewakili bentuk koloni tertentu diambil dan

dipindahkan pada media agar yang baru. Pemindahan atau subkultur dapat dilakukan beberapa kali sampai benar-benar diperoleh koloni tunggal.

Isolasi Mikrob dari Rizosfir

Sebanyak 1-2 g sampel tanah diambil dari permukaan akar kemudian dilarutkan di dalam 20 ml akuades steril. Setelah dikocok, sebanyak 1 ml suspensi tanah diambil dan diencerkan secara berseri $10\times$ di dalam air steril. Selanjutnya, dari setiap pengenceran diambil 100 μl dan disebar pada permukaan media agar, seperti NA, PDA, maupun TSA. Kultur yang tumbuh dipilih dan dimurnikan, seperti diuraikan sebelumnya.

Isolasi Mikrob Endofit

Prosedur untuk mengisolasi mikrob bakteri endofit biasanya mengacu pada Hallmann *et al.* (2006). Ada tiga tahapan yang perlu dilakukan, yaitu (a) penyucian dengan air kran yang mengalir, (b) sterilisasi permukaan sampel bagian tanaman sumber mikrob endofit, dan (c) isolasi mikrob.

Tahapan penyiapan sampel bagian tanaman untuk mendapatkan mikrob endofit adalah menyuci sampel bagian tanaman dengan air mengalir (air kran) untuk membersihkan partikel tanah atau debu yang menempel, merendam di dalam etanol 96% selama 0,5-1 menit, merendam di dalam larutan sodium hipoklorit 1-5% selama 1-4 menit, membilas dengan air steril, dan mengeringanginkan di dalam kondisi aseptik. Konsentrasi dan waktu perendaman disesuaikan dengan kehalusan jenis sampel. Semakin halus sampel maka semakin kecil konsentrasinya dan semakin sebentar waktu perendamannya.

Setelah proses sterilisasi selesai, maka perlu dilakukan pengecekan kesterilan permukaan sampel bagian tanaman (*sterility check*) untuk memastikan bahwa sampel sudah steril permukaannya sehingga apapun jenis mikroba yang diisolasi berasal dari jaringan tanaman, bukan kontaminan pada permukaan sampel bagian tanaman. Cara pengecekan kesterilan dilakukan dengan cara meletakkan sampel pada permukaan media agar, seperti TSA 10%, PDA, atau NA. Apabila setelah sampel diinkubasikan pada kondisi optimum dan tidak ada pertumbuhan mikroba yang keluar dari permukaan sampel, artinya sampel yang digunakan sudah steril dan siap untuk diproses untuk diisolasi mikroba endofitnya.

Media yang digunakan untuk mengisolasi bakteri adalah media TSA atau media King's B, sedangkan media yang digunakan untuk mengisolasi jamur adalah PDA, atau media *malt extract-peptone-yeast extract*. Untuk mengurangi pertumbuhan mikroba yang tidak diinginkan (kontaminan), biasanya ditambahkan bakterisida atau fungisida ke dalam media untuk mengisolasi mikroba endofit.

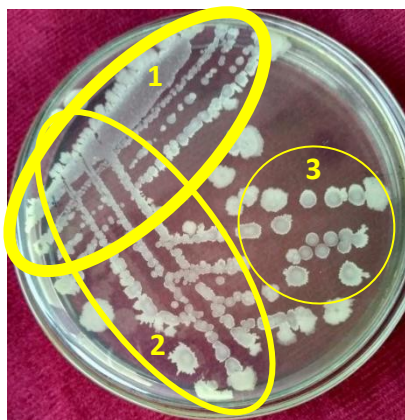
Tahap berikutnya adalah mengisolasi mikroba endofit. Metode yang sering digunakan adalah maserasi, yaitu melumatkan atau menumbuk sampai halus sampel bagian tanaman dalam mortar atau vortek steril.

Isolasi Mikroba dari Serangga

Serangga dapat menjadi sumber mikroba yang potensial sebagai agens hayati (entomopatogen). Sampel serangga yang digunakan biasanya serangga yang sudah mati dan menunjukkan gejala serangan terinfeksi oleh mikroba (jamur atau bakteri). Salah satu teknik yang digunakan untuk mendapatkan mikroba entomopatogen diuraikan oleh Priyatno *et al.* (2016) yang mengisolasi entomopatogen dari serangga hama, seperti wereng

cokelat, kepik hitam, uret, laba-laba, dan *Brontispa* sp. Serangga dari lapang yang menunjukkan gejala sakit atau mati terindikasi akibat mikroba, berturut-turut direndam di dalam alkohol 70% selama tiga menit, larutan sodium hipoklorit (NaOCl) 0,1% selama tiga menit, dan kemudian dibilas dengan air steril sebanyak tiga kali. Selanjutnya, serangga dikeringkan dengan kertas absorben steril kemudian diletakkan pada media agar, seperti PDA. Jamur yang tumbuh dari tubuh serangga diamati dengan mikroskop cahaya kemudian diisolasi pada media agar, dimurnikan, dan disimpan sebagai jamur potensial sebagai agens hayati.

Untuk mengisolasi bakteri entomopatogen maka metodenya adalah mengambil sebanyak kira-kira 1 g bangkai serangga kemudian dimasukkan ke dalam botol yang berisi 10 ml NaCl 0,85% steril pada pH 6,8. Setelah dikocok dengan alat pengocok (vorteks) selama 5 menit, campuran hasil pengocokan diambil sebanyak 100 µl dan disebar pada permukaan media agar, seperti TSA 20% atau NA.



Gambar 8. Koloni-koloni tunggal isolat bakteri pada media agar yang diperoleh dengan teknik isolasi cara gores. No. 1 = goresan pertama, 2=goresan kedua, dan 3 = goresan ketiga

Penyimpanan Kultur Bakteri

Kandidat kultur bakteri yang diperoleh dari koloni tunggal disimpan di dalam botol kultur (Bijou) berisi air steril dan atau pada botol kultur berisi media agar miring. Setiap isolat bakteri dibuat duplo (dua botol), satu untuk kegiatan rutin dan lainnya sebagai cadangan.

Kultur koleksi bakteri yang ada di dalam botol berisi air steril kemudian disimpan pada ruangan ber-AC (22 °C). Tidak disarankan untuk menyimpan kultur bakteri di dalam kulkas (5 °C).

Setiap isolat dalam botol penyimpanan perlu diberi nomor atau kode. Tidak ada aturan baku mengenai pembuatan kode isolat. Namun, ada yang menggunakan inisial institusi sebagai kode huruf, seperti UW berarti University of Wisconsin, diikuti dengan angka, seperti UW 001.

Setiap informasi berkaitan dengan kode isolat dicantumkan dalam suatu Buku Koleksi Kultur. Setiap kode isolat mempunyai informasi yang penting, seperti (a) jenis sumber asal, seperti tanah, akar, dan daun; (b) lokasi; (c) tanggal pengambilan, dan lain sebagainya. Informasi itu akan menjadi penting apabila isolat tertentu bernilai ekonomis, harus dilindungi secara hukum.

Apabila karakterisasi isolat bakteri sudah dilakukan dan ternyata diperoleh kandidat isolat bakteri yang potensial sebagai biopestisida, maka isolat tersebut harus disimpan dengan cara yang lebih awet, seperti di dalam ampul dan liofilisasi. Beberapa laboratorium mikrobiologi mempunyai sarana untuk membuat sediaan kultur liofil bakteri. Dengan cara ini, maka suatu isolat dapat bertahan lama, bisa sampai tahunan.

Untuk menjaga keamanan suatu isolat maka sebaiknya isolat yang punya nilai komersial perlu didepositokan pada Kultur

Koleksi Mikrob dengan perjanjian hanya untuk disimpan dan tidak boleh digunakan oleh orang lain tanpa ijin dari pemilik isolat.

Karakterisasi Secara Konvensional

Identifikasi sifat-sifat morfologi dan fisiologis suatu bakteri dapat dilakukan secara konvensional. Untuk memastikan identitas suatu bakteri biasanya perlu dilakukan serangkaian pengujian. Namun, untuk menduga identitas lebih awal, dapat dilakukan beberapa pengujian dugaan (*presumptive*). Pedoman pengujian awal sifat morfologis dan fisiologis bakteri dapat mengikuti protokol standar, seperti Lelliott dan Stead (1987).

Beberapa pengujian awal yang dapat dilakukan, antara lain (a) bentuk sel; (b) sifat Gram (pewarnaan Gram atau kelarutan dalam larutan KOH 3%); (c) keberadaan spora di dalam sel (endospora); (d) kemampuan mengoksidasi oksigen (uji oksidasi dan fermentasi; O/F); dan (e) pembentukan pigmen fluoresen pada media King's B.

Bentuk Sel dan Sifat Gram

Banyak *Bacillus* spp. yang berpotensi sebagai biopestisida mikrob. Pembentukan spora di dalam sel bakteri (endospora) paling penting dalam identifikasi genus *Bacillus* sampai tingkat genus (Niall dan De Vos, 2015). Bentuk sel suatu bakteri dapat diketahui sewaktu pengamatan sifat Gram melalui mikroskop. Bahan-bahan yang diperlukan untuk pewarnaan Gram adalah larutan Hucker's Kristal Violet, dengan melarutkan 2,0 g kristal violet dalam 20 ml etanol 95%, dan larutan Lugol dibuat dengan melarutkan 0,8 g amonium oksalat ke dalam 80 ml air destilat. Selanjutnya, keduanya dicampurkan larutan Kristal violet dan Lugol, kemudian disimpan di dalam botol kaca berwarna gelap. Larutan ketiga adalah larutan safranin yang dibuat dengan cara

melarutkan zat warna safranin O sebanyak 2,5 g dalam 100 ml etanol 95%.

Tahap berikutnya adalah membuat sediaan lapisan tipis bakteri. Lapisan tipis bakteri dibuat dengan cara membersihkan gelas slide dari lapisan lemak, dengan cara menyelupkan dalam etanol kemudian dipanaskan, dengan cara melalukan sepintas pada nyala api Bunsen. Setelah sediaan lapisan bakteri pada gelas slide menjadi dingin, teteskan air destilat pada permukaan gelas slide kemudian larutkan satu ose kultur bakteri yang akan diuji. Aduk-aduk suspensi bakteri kemudian ratakan pada permukaan gelas slide dan biarkan sampai kering.

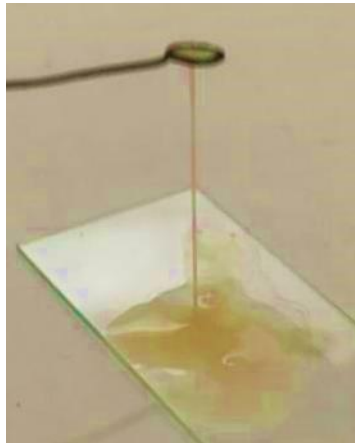
Proses pewarnaan sel bakteri dilakukan empat tahap. **Tahap pertama** adalah mewarnai dengan larutan Hucker's Kristal Violet, yaitu dengan cara meneteskan beberapa tetes larutan kristal violet pada seluruh permukaan sediaan bakteri, biarkan selama 1 menit, kemudian cuci warna kristal violet dengan cara meletakkan gelas slide pada cucuran air kran. Sisa air dikeringkan dengan cara meletakkan kertas tisu di atas sediaan lapisan bakteri. **Tahap kedua** adalah meneteskan larutan Lugol selama 1 menit, kemudian cuci dengan air kran seperti pada proses sebelumnya. **Tahap ketiga** adalah meneteskan etanol pada sediaan bakteri selama 30 detik. **Tahap keempat** adalah mewarnai sediaan bakteri dengan larutan safranin selama 20 detik. Keringkan sediaan lapisan bakteri kemudian amati di bawah mikroskop cahaya.

Sel-sel bakteri yang terlihat berwarna merah berarti Gram negatif, sedangkan yang berwarna biru berarti Gram positif. Sel-sel bakteri Gram negatif terlihat berwarna merah karena pada waktu proses tahap ketiga, yaitu meneteskan etanol, sel bakteri dapat mempertahankan warna merah kristal violet, sedangkan bakteri Gram positif terlihat berwarna biru karena tidak dapat mempertahankan warna merah kristal violet sehingga warna bakteri berasal dari pemberian warna Lugol iodin.

Kelarutan dalam Larutan KOH 3%

Bacillus spp. bersifat Gram positif, tetapi reaksinya kadang bervariasi ketika diwarnai dengan warna kristal violet. Di samping pewarnaan, sifat Gram dapat diketahui dengan cara melarutkan suspensi bakteri dalam larutan KOH 3%. Pengujian sifat Gram dengan larutan KOH 3% tidak memerlukan sediaan kering bakteri pada gelas slide dan pengamatan mikroskop sehingga lebih mudah dan praktis.

Di dalam larutan KOH 3%, dinding sel bakteri Gram negatif akan hancur dan DNA keluar sel sehingga membentuk larutan yang kental (Gambar 9), sedangkan dinding sel bakteri Gram positif lebih tahan terhadap larutan KOH 3% dan sel-sel bakteri tetap utuh sehingga tidak ada massa DNA yang larut dalam KOH 3% (Powers, 1995).



Gambar 9. Massa DNA bakteri Gram negatif di dalam larutan KOH 3% membentuk larutan yang kental dan dapat ditarik membentuk “benang”

Bentuk Spora

Bacillus spp. memiliki spora di dalam selnya (endospora). Untuk mengetahui spora suatu bakteri maka perlu dibuat sediaan lapisan bakteri seperti diuraikan pada proses pewarnaan Gram. Sediaan lapisan bakteri dipanaskan dengan cara melakukan di atas nyala api bunsen.

Proses pewarnaan spora dimulai dengan menyiapkan sediaan kering lapisan bakteri, seperti pada proses pewarnaan Gram. Selanjutnya, sediaan lapisan bakteri diwarnai selama 10 menit dengan larutan zat warna *Malachite green* 5% dalam air destilat. Setelah itu, sisa-sisa zat warna *Malachite green* pada sediaan lapisan bakteri dicuci dengan air kran dan dikeringkan dengan kertas tisu. Selanjutnya, bakteri diwarnai selama 15 detik dengan zat warna safranin O (0,5%). Setelah sediaan lapisan bakteri dicuci dengan air kran dan dikeringkan dengan tissue, maka sediaan bakteri diamati di bawah mikroskop cahaya. Spora bakteri terlihat berwarna biru tua. Letak spora bisa di tengah atau di bagian ujung sel.

Uji Oksidasi dan Fermentasi

Pengujian sifat oksidasi dan fermentasi (O/F) merupakan bagian dari tahapan dalam mengumpulkan informasi tentang kondisi terbaik untuk perbanyakan calon biopestisida bakteri; apakah harus dalam keadaan perlu oksigen (aerob) atau tidak perlu oksigen (anaerob). Metode pengujian O/F pada dasarnya mengikuti Hugh dan Leifson (1953). Prinsip pengujian O/F menggunakan glukosa sebagai sumber karbohidrat; apakah glukosa dapat digunakan/dioksidasi oleh bakteri dalam keadaan aerob (oksidatif) atau anaerob (fermentatif) (Lelliott dan Stead, 1987).

Media O/F terdiri atas NaCl 5,0 g/l, K₂HPO₄ 0,3 g/l, agar 3,0 g/l, dan larutan *bromothymol blue* 0,03 g (15 ml larutan *bromothymol blue* 0,2 % dalam air). pH media diatur pada skala 7,1 dan warna media terlihat hijau tua. Sebanyak 90 ml media O/F dimasukkan ke dalam botol kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah dingin dan masih dalam keadaan cair, sebanyak 10 ml larutan D-glukosa 10% steril (disetrilkan dengan kertas filter) dimasukkan ke dalam media O/F. Konsentrasi akhir larutan D-glukosa dalam media O/F adalah 1%. Selanjutnya, media O/F yang mengandung D-glukosa dituangkan ke dalam botol atau tabung reaksi steril. Volume media O/F disesuaikan dengan ukuran botol. Untuk tabung reaksi bisa dimasukkan sebanyak 6 ml per tabung.

Tahap berikutnya adalah menginokulasikan bakteri ke dalam media O/F dalam tabung raksi. Inokulasi dilakukan dengan menggosokkan jarum pada koloni bakteri kemudian ditusukkan ke dalam media O/F. Inokulasi dibuat dua kali (ulangan). Permukaan media pada tabung pertama dibiarkan terbuka (aerob; oksidatif), sedangkan tabung kedua permukaannya ditutup dengan parafin cair steril. Segera setelah bakteri ditusukkan ke dalam media O/F, permukaan media ditutup dengan larutan parafin steril sebanyak 3-4 ml atau setinggi 1-2 cm dari permukaan media O/F supaya kondisi kultur dalam keadaan anaerob atau fermentatif. Kultur diinkubasikan di dalam inkubator selama 3 hari. Perubahan warna dari hijau tua menjadi kuning pada media yang ditutup parafin cair menunjukkan bakteri bersifat fermentatif. Apabila media O/F terbuka maka bakteri bersifat oksidatif, jika tertutup dan tidak ditutup parafin, maka bakteri bersifat oksidatif dan fermentatif.

Produksi Pigmen Fluoresen

Pengujian pigmen fluoresen pada media spesifik King's B mengikuti prosedur yang dibuat oleh King *et al.* tahun 1954 (Lelliot dan Stead, 1987). Namun, tidak semua bakteri yang menghasilkan pigmen fluoresen dapat dideteksi pada media King's B. Media King's B terdiri atas proteosa pepton 20,0 g/l, gliserol 10,0 g/l, KH_2PO_4 1,5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g/l, dan agar-agar 15,0 g/l. pH media diatur pada skala 7,2 kemudian disterilkan dalam otoklaf suhu 121 °C selama 15 menit. Selanjutnya, media King's B dituang ke dalam cawan petri steril dan diinokulasi dengan cara menggoreskan kultur bakteri dengan jarum ose pada permukaan agar. Setelah 3-4 hari di dalam inkubator, bakteri yang menghasilkan pigmen fuoresen akan terlihat menghasilkan warna kuning yang berpijar di bawah sinar ultra violet (UV).

Bab 10.

KARAKTERISASI AGENS HAYATI SECARA MOLEKULER

Sejalan dengan perkembangan teknologi identifikasi mikrob, saat ini karakterisasi secara molekuler menjadi andalan utama karena lebih akurat dan lebih cepat. Karakter molekuler agens hayati menjadi data penting untuk mengonfirmasi hasil identifikasi berdasarkan morfologi (secara konvensional). Tahapan kegiatan karakterisasi molekuler agens hayati secara umum, meliputi penyiapan sampel, isolasi DNA, amplifikasi DNA secara PCR, sikuensing, dan analisis sikuen (Islam *et al.*, 2019).

Penyiapan Sampel untuk Isolasi DNA

Sampel untuk isolasi DNA agens hayati dapat berasal dari kultur murni maupun langsung dari sampel di lapangan. Kultur murni bakteri dan cendawan yang digunakan untuk identifikasi secara konvensional, dapat digunakan sebagai sampel untuk isolasi DNA. Isolat murni cendawan ditumbuhkan pada media cair kemudian dipanen. Sebagai contoh, *B. bassiana* yang ditumbuhkan pada media PDB (*Potato Dextrose Broth*), diinkubasi selama 72 jam, miselium dipanen menggunakan kertas filter, kemudian dicuci dengan air steril (Minarni *et al.*, 2021). Seperti halnya dengan cendawan, isolat murni bakteri untuk sampel isolasi DNA umumnya juga dibiakkan pada media cair, seperti

media NB (*nutrient broth*). Sel bakteri dipanen dengan cara disentrifugasi. Pelet bakteri yang diperoleh dapat digunakan sebagai sampel untuk isolasi DNA (Islam *et al.*, 2019).

Nematoda entomopatogen umumnya dikoleksi dari sampel tanah. Ekstraksi nematoda dari sampel tanah dilakukan dengan metode *baiting*, yaitu menggunakan larva serangga inangnya. Larva serangga dimasukkan pada sampel tanah hasil koleksi dalam kondisi lembap. Larva yang mati ditempatkan pada *white trap* modifikasi atau diinkubasi di atas kertas saring lembap dalam petri, untuk pemanenan nematoda (Caoili *et al.*, 2018; Chaerani *et al.*, 2018).

Virus merupakan parasit obligat yang tidak dapat “hidup” (aktif) di luar sel inangnya. Oleh karena itu, sampel untuk isolasi DNA virus adalah inangnya. Sebagai contoh, sampel NPV entomopatogen *S. litura* diperoleh dengan cara mengoleksi larva sakit (instar ke-3 sampai 5) dari tanaman di lapangan. Larva yang menunjukkan gejala terinfeksi *Baculovirus* disimpan pada freezer (-20 °C) sampai digunakan untuk sampel isolasi DNA (Ahmad *et al.*, 2018).

Isolasi DNA

Tahapan isolasi DNA, meliputi (1) pemecahan dinding sel, membran sel, dan membran inti sel untuk mengeluarkan DNA dari sel jaringan; (2) membuang lipid membran; (3) membuang protein; (4) presipitasi DNA; dan (5) pencucian DNA (Kalbande *et al.*, 2012). Isolasi DNA dapat dilakukan menggunakan larutan bufer ekstraksi yang diracik sendiri atau menggunakan kit yang tersedia secara komersial. Penggunaan bufer ekstraksi dapat menghemat biaya, namun membutuhkan waktu lama (antara 5 - 7 jam). Sementara itu, isolasi DNA menggunakan kit umumnya hanya memerlukan waktu sekitar 2-4 jam, tetapi harganya lebih mahal. Sebagai contoh, harga kit ekstraksi DNA sekitar Rp. 3-4 juta

per 100 sampel. Prosedur kerja ekstraksi DNA menggunakan kit umumnya lebih mudah. Kita hanya mengikuti protokol yang disebutkan oleh produsennya.

Isolasi DNA, dengan menggunakan bufer ekstraksi, umumnya menggunakan metode CTAB. Metode ini awalnya diperkenalkan oleh Doyle dan Doyle (1990). Secara umum, prosedur isolasi DNA dengan metode CTAB diuraikan di bawah ini:

- (1) **Pengeluaran DNA dari sel jaringan.** Sampel yang telah ditempatkan dalam mortar ditambah nitrogen cair, kemudian digerus sampai halus. Setelah halus, dimasukkan bufer CTAB [CTAB 2%; 1,4 M NaCl; 0,2% 2-mercaptoethanol, 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; PVP-40 1%]. Untuk laboratorium yang sulit memperoleh nitrogen cair, sampel dapat langsung ditambah bufer CTAB, kemudian digerus. Setelah digerus, sampel dipindahkan pada tabung eppendorf ukuran 1,5 ml diinkubasi pada suhu 65 °C selama 30-60 menit, kemudian dibiarkan sampai mendekati suhu ruang.
- (2) **Pembuangan lipid dan protein.** Larutan yang mengandung sampel ditambahkan campuran khloroform: isoamyl alkohol (24:1; v/v) sebanyak volume yang sama dengan larutan sampel. Selanjutnya, campuran yang mengandung sampel tadi disentrifuse pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke tabung eppendorf baru.
- (3) **Presipitasi DNA.** Supernatan yang telah dimasukkan ke dalam tabung eppendorf ditambah isopropanol dingin (-20 °C) sebanyak 2/3 volume kemudian dicampur dengan cara membolakbalikkan tabung eppendorf sampai diperoleh endapan DNA (seperti putih telur). Jika endapan DNA belum diperoleh, larutan dapat disimpan pada suhu ruang atau di dalam freezer (-20 °C) selama 1 jam hingga semalaman. Larutan DNA disentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama

15 menit pada suhu 4 °C. Selanjutnya, supernatan dibuang (pelet DNA berupa endapan pada dasar *microtube* ditinggal). Bila pelet DNA belum terlihat, larutan dapat disentrifuse lagi pada kecepatan lebih tinggi dan waktu lebih lama.

- (4) **Pencucian DNA.** Endapan pelet DNA yang diperoleh dicuci dua kali dengan 70% ethanol dingin (-20 °C) sebanyak 150 µl. Setiap penyucian dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit;
- (5) **Pengeringan pelet DNA.** Pelet DNA dikeringanginkan di suhu ruang selama ± 15 – 20 menit atau dengan menggunakan *vaccum*. Pelet DNA dilarutkan menggunakan *nuklease free water* sebanyak 50 µl. DNA yang larut siap digunakan atau dapat disimpan di refrigerator (-20 °C) sampai digunakan.

Metode CTAB berhasil digunakan untuk isolasi DNA beberapa agens hayati dari kelompok cendawan dan bakteri, diantaranya cendawan entomopatogen *B. bassiana* dan *M. anisopliae* (Sari dan Rosmeita, 2019) serta bakteri patogen *Ganoderma boninense* (Irma *et al.*, 2018). Sampai saat ini, literatur untuk isolasi DNA NPV dan nematoda entomopatogen menggunakan metode CTAB belum ditemukan. Namun, penelitian lain telah berhasil menggunakan metode CTAB untuk isolasi DNA virus patogen tanaman (Miftakhurohmah *et al.*, 2020) dan nematoda patogen tanaman (Djiwanti dan Miftakhurohmah, 2022). Dengan demikian, metode CTAB berpotensi digunakan untuk isolasi DNA NPV dan nematoda entomopatogen.

Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dengan PCR (*Polymerase chain reaction*) adalah proses melipatgandakan DNA secara *in vitro* sehingga dapat digunakan untuk kegiatan identifikasi. Tahapan amplifikasi DNA meliputi: (1) denaturasi, yaitu pemisahan utas ganda DNA;

(2) *annealing*, penempelan primer; dan (3) ekstensi, pemanjangan DNA. Ketiga tahapan tersebut diulang beberapa kali (30 - 40 kali), yang biasa dikenal dengan istilah siklus PCR.

Target PCR untuk karakterisasi molekuler adalah bagian genom agens hayati yang dapat mewakili karakter setiap spesies yang diidentifikasi. Bagian genom bakteri, cendawan, dan nematoda yang umum digunakan untuk karakterisasi molekuler adalah bagian *Internal Transcribed Spacer* (ITS) (Chaerani *et al.*, 2018; Sari dan Rosmeita, 2019) dan 16S rRNA (Islam *et al.*, 2019). Namun, untuk karakterisasi molekuler NPV, Toprak (2004) dan Ahmad *et al.* (2018) menggunakan bagian genom *lef-8*.

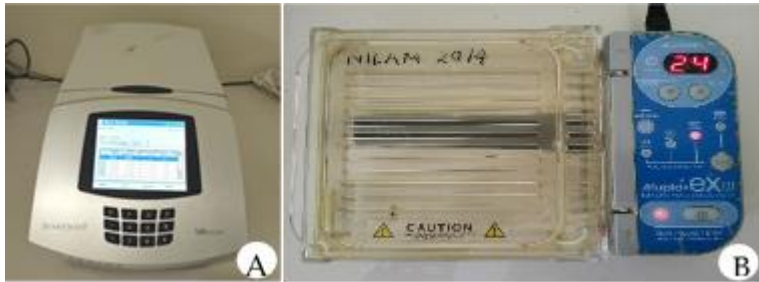
Pemilihan primer yang tepat untuk spesies agens hayati yang akan diidentifikasi menjadi tahapan penting sebelum dilakukan amplifikasi DNA. Pemilihan primer dapat dilakukan dengan studi literatur, sesuai spesies agens hayati yang akan diidentifikasi. Amplifikasi DNA agens hayati dapat menggunakan primer universal maupun spesifik spesies. Beberapa primer universal dan spesifik agens hayati telah banyak disebutkan dalam sejumlah literatur. Primer universal cendawan, ITS primer 4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' dan ITS primer 5: 5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3' berhasil digunakan untuk mengidentifikasi *Lecanicillium saksenae*, *Simplicillium sp.*, dan *Myrothecium sp.*, cendawan entomopatogen pada *Nilaparvata lugens* (Minarni *et al.*, 2021). Karakterisasi molekuler *Pseudomonas aeruginosa*, bakteri patogen cendawan *Ganoderma boninense*, dilakukan dengan menggunakan primer universal 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-GGTACCTTGTTA CGACTT-3') (Irma *et al.*, 2018). Primer universal, primer forward TW81 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') dan primer reverse AB28 (5'- ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') digunakan untuk identifikasi nematoda entomopatogen *H. indica*, *S. huense*, dan *S. pakistanense* (Chaerani *et al.*, 2018).

NPV pada *S. litura* diidentifikasi menggunakan primer *degenerate* prL8-1, 5'-CAGGAAACAGCTATGACCCAYGGHGAR ATGAC-3' dan prL8-2, 5'-CAGGAAACAGCTATGAC CAYRTAS1GGRTCYTCS2GC-3' (Toprak, 2004).

Bahan-bahan yang diperlukan untuk amplifikasi DNA adalah larutan DNA sampel, primer *forward* dan *reverse*, dan pereaksi PCR (enzim polymerase, dNTP, MgCl₂, dan bufer PCR). Masing-masing pereaksi PCR memiliki manfaat. Enzim polymerase berperan sebagai katalis dalam proses pembentukan rantai DNA, dNTP sebagai sumber nukleotida (A, T, G, dan C), MgCl₂ untuk menstimulasi aktivitas enzim polymerase, dan bufer PCR untuk menjaga stabilitas kondisi pH pereaksi PCR (Miftakhurohmah, 2015). Saat ini, sudah tersedia pereaksi PCR dalam bentuk larutan campuran, seperti Mytaq HS Red Mix (Bioline) atau Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher).

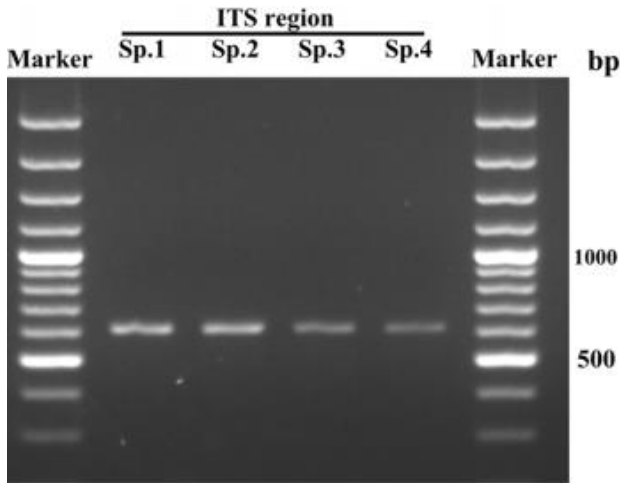
Total volume pereaksi PCR dapat menggunakan sebanyak 10, 20, 25 atau 50 µl. Komposisi masing - masing pereaksi PCR, umumnya adalah 1/2 volume pereaksi PCR mix, 0,4 µM primer *forward*, 0,4 µM primer *reverse*, 1/20 volume DNA *template*, ditambah *nuclease free water* hingga mencapai volume akhir yang diinginkan. Sebagai contoh, jika menggunakan volume PCR 10 µl, maka komposisinya adalah 5 µl PCR mix; 0,8 µl, masing - masing untuk primer *forward* dan *reverse* (konsentrasi primer 10 µM); 0,5 µl larutan DNA dan 2,9 µl *nuclease free water*.

Amplifikasi DNA dilakukan pada mesin PCR (Gambar 10a), dengan program sesuai literatur yang diacu. Sebagai contoh, amplifikasi DNA bakteri *P. aeruginosa* dengan primer 27F dan 1492 R dilakukan dengan program PCR adalah pre denaturasi (94 °C selama 5 menit), dilanjutkan dengan 35 siklus meliputi denaturasi (94 °C, 30 detik), *annealing* (55 °C, 30 detik), ekstensi (72 °C, 90 detik), dan diakhiri dengan ekstensi akhir (72 °C, 5 menit) (Irma *et al.*, 2018).



Gambar 10. Mesin PCR (A) dan alat elektroforesis (B)

Hasil PCR divisualisasi pada gel agarose dengan pewarna khusus. Ada dua macam pewarna gel agarose, yaitu (1) ethidium bromida (harganya murah, namun beresiko bagi kesehatan karena bersifat karsinogenik) dan (2) pewarna tidak bersifat karsinogenik, misalnya RedSafe™ nucleic acid (Intron Biotechnology). Penggunaan pewarna non karsinogenik memerlukan biaya lebih tinggi, namun lebih aman bagi kesehatan. Gel agarose dielektroforesis (Gambar 10b) pada tegangan 100 atau 50 Volt, selama 25 atau 50 menit, diamati di bawah sinar UV. Bila amplifikasi DNA berhasil dilakukan, akan muncul pita DNA dengan ukuran sesuai prediksi desain primer berdasarkan literatur yang diacu. Sebagai contoh, amplifikasi DNA *B. bassiana* menggunakan primer spesifik yang didesain untuk mengamplifikasi bagian ITS1 dan ITS2, menghasilkan pita DNA berukuran sekitar 593 pb (pasang basa) (Gambar 11) (Sayed *et al.*, 2018).



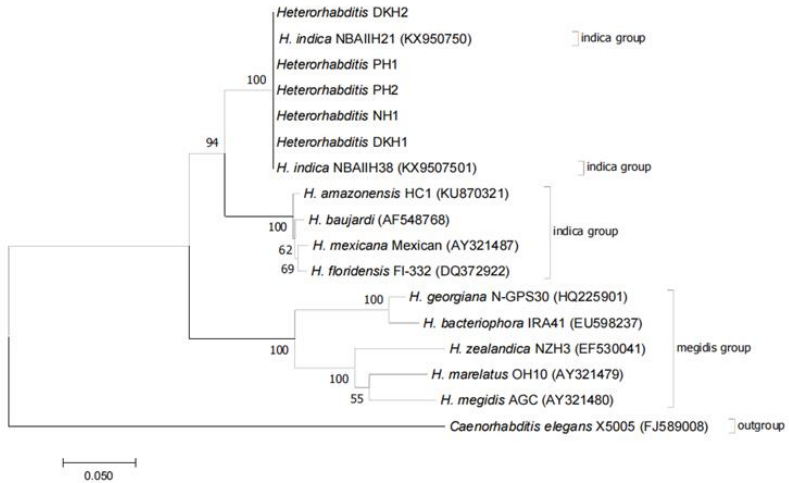
Gambar 11. Produk PCR bagian ITS isolat *B. bassiana* (Sayed *et al.*, 2018)

Sikensing dan Analisis Sikuen

Produk PCR yang diperoleh dikirimkan ke lembaga berbayar, misalnya *First Base* (Malaysia), untuk dilakukan proses sikensing. Sikuen yang didapatkan selanjutnya dianalisis awal dengan BLAST, untuk mengetahui spesiesnya. Bila hasil analisis BLAST sudah sesuai dengan target identifikasi, sikuen diedit kemudian disejajarkan dengan sikuen sejenis yang diperoleh di GenBank, dan yang terakhir dianalisis homologinya menggunakan program Bioedit. Hasil analisis homologi berupa persentase kemiripan sikuen nukleotida spesies yang diidentifikasi dengan sikuen spesies yang sama, koleksi GenBank. Sebagai contoh, hasil analisis homologi sikuen nukleotida isolat *Heterorhabditis* menunjukkan kemiripan sebesar 99- 100% dengan isolat *H. indica* strain NBAHIIIH21 dan NBAHIIIH38 dari India (Chaerani *et al.*, 2018).

Karakter molekuler lain yang diperlukan adalah penelusuran asal usul isolat berdasarkan analisis filogeni. Konstruksi pohon

filogeni dibuat menggunakan program MEGA. Metode yang umum digunakan adalah *neighbour joining*, dengan 1000× bootstrap ulangan (Miftakhurohmah *et al.* 2017). Dalam konstruksi pohon filogeni, selain sikuen spesies sejenis, diperlukan beberapa spesies lain sebagai pembanding, serta spesies dari genus atau famili lain sebagai *outgrup*. Ketika analisis filogeni yang dilakukan sudah benar, maka spesies yang diidentifikasi akan mengelompok dengan spesies sejenis, terpisah dari spesies lain. Demikian juga spesies *outgrup* akan membentuk kelompok sendiri. Kelompok dalam pohon filogeni diperkirakan berasal dari nenek moyang yang sama dan memiliki kesamaan karakter atau ciri yang tinggi dan dianggap memiliki hubungan yang sangat dekat (Hidayat dan Pancoro, 2008). Sebagai contoh, berdasarkan analisis filogeni, lima isolat *Heterorhabditis* asal Jawa Timur dan Bali mengelompok dengan isolat - isolat *H. indica* (Gambar 12). Hal ini menunjukkan bahwa isolat yang diperoleh tersebut termasuk ke dalam spesies *indica* (Chaerani *et al.*, 2018).



Gambar 12. Pohon filogeni lima isolat *Heterorhabditis* asal Jawa Timur dan Bali, yang menyertakan beberapa spesies lain dalam genus *Heterorhabditis* dan *Caenorhabditis elegans* sebagai *outgroup* (Chaerani *et al.*, 2018)

Bab 11.

BAHAN BIOPESTISIDA NABATI

Teknik penyiapan simplisia bahan pestisida nabati dapat mengacu pada pedoman umum pascapanen bahan baku obat tradisional yang disusun oleh Indartiyah *et al.* (2011) supaya mutu bahan dapat terjamin, kerusakan kandungan bahan aktif dapat diminimalkan, dan memperpanjang daya simpan. Secara umum, kegiatan teknologi penanganan pascapanen bahan baku tanaman, meliputi (1) sortasi awal/sortasi basah, (2) penyucian dan penirisan, (3) perajangan, (4) pengeringan, (5) sortasi akhir/sortasi kering, (6) pengkelasan (*grading*) dan penimbangan, (7) pengemasan, (8) pelabelan, serta (9) penyimpanan.

Sortasi Awal/Sortasi Basah. Pemisahan hasil panen yang baik dari yang rusak, cacat, sakit, maupun campuran bahan organik/anorganik lain perlu dilakukan secara hati-hati. Sortasi dapat dilakukan dengan menggunakan alat dan atau mesin sesuai dengan karakteristik hasil panen.

Penyucian dan Penirisan. Penyucian hasil panen merupakan bagian dari kegiatan menghilangkan kotoran fisik, kimiawi, dan biologis dengan menggunakan air. Kegiatan penyucian dilanjutkan dengan kegiatan penirisan, untuk menghilangkan air yang menempel di permukaan hasil panen. Penirisan dan pengeringan merupakan tahapan yang sangat penting dalam penyiapan bahan baku tanaman. Dengan kondisi iklim tropis yang lembab dan kadar air bahan tanaman yang baru dipanen masih tinggi maka bahan tanaman hasil penyucian harus segera

dikeringkan supaya tidak menjadi busuk, terutama bahan tanaman berupa herba atau daun. Penirisan dilakukan dengan menyimpan hasil cucian bahan tanaman pada rak-rak bambu di dalam ruangan yang dilengkapi dengan kipas angin atau *blower*. Tumpukan bahan tanaman tidak boleh terlalu tebal dan harus sesekali dibalik supaya semua bagian merata terkena hembusan angin sehingga cepat mengering.

Perajangan. Perajangan dimaksudkan untuk memperkecil volume bahan setelah dikeringanginkan. Sebagai contoh, bahan tanaman berupa tangkai daun, seperti nilam dan serai wangi, dipotong sepanjang 15-20 cm; rimpang jahe dipotong melintang dengan ketebalan 3-5 mm; rimpang temu lawak dipotong dengan ketebalan 7-8 mm; dan akar jeringau dipotong sepanjang 15-20 cm (Hernani dan Marwati, 2012; Ma'mun, 2014). Alat memotong atau parang sebaiknya menggunakan bahan *stainless steel*.

Pengeringan. Tahapan pengeringan dapat dilakukan dengan cara menjemur langsung di bawah sinar matahari dengan menggunakan atau tanpa penutup kain hitam. Pengeringan dengan sinar matahari menggunakan rumah pengering dari bahan fiber (*fiber-house drying type*) yang dilengkapi dengan *blower* di atasnya (Sembiring *et al.*, 2019) dan alat pengering (*oven*). Alat pengering yang lebih canggih lagi adalah *fresh dryer*. Bahan-bahan tanaman yang mengandung minyak asiri, seperti rimpang-rimpangan, maka penjemurannya harus dilakukan secara lebih hati-hati supaya minyak asirinya tidak menguap. Suhu yang dianjurkan untuk mengeringkan hasil rajangan rimpang-rimpangan adalah 36-45 °C (Indartiyah *et al.*, 2011).

Proses pengeringan bahan tanaman untuk bahan baku pestisida nabati dapat diakhiri apabila simplisia (= bahan tanaman yang telah dikeringkan) sudah dapat dipatahkan dengan mudah. Secara umum, simplisia yang kering memiliki kadar air sebesar 8-10%.

Sortasi Akhir/Sortasi Kering. Setelah selesai dilakukan pengeringan, bahan tanaman yang diproses sebelumnya disortasi kembali untuk memisahkan bahan yang baik dengan yang rusak. Proses sortasi dapat dilakukan bersamaan dengan pengkelasan.

Pengkelasan (*Grading*). Proses *grading* merupakan tahap akhir pembuatan simplisia sebelum dilakukan pengemasan, pelabelan, dan seterusnya. Tujuan *grading* adalah untuk mendapatkan simplisia yang seragam.

Penimbangan. Setelah dilakukan *grading*, simplisia ditimbang untuk mengetahui berat keringnya. Tujuannya agar dapat ditentukan rendemen hasil proses pengeringan dan pascapanen yang dilakukan.

Pengemasan. Tujuan pengemasan adalah mengumpulkan hasil produk dalam suatu unit sesuai pemanfaatannya, menyimpan produk supaya terhindar dari pencemaran, dan melindungi produk selama penyimpanan, perjalanan, dan pemasaran. Proses pengemasan harus dilakukan secara hati-hati agar bahan yang digunakan untuk pestisida tidak rusak. Kriteria bahan pengemas yang baik digunakan adalah mampu melindungi bahan dari kerusakan mekanis; tidak mengandung zat kimia yang dapat mengubah kandungan kimia, warna, rasa, bau, dan kadar air, serta tidak bersifat racun; praktis; mampu mencegah penyerapan air; mampu menahan pengaruh cahaya; dan ekonomis.

Pengemasan yang baik mampu melindungi bahan tanaman (simplisia) dari gangguan yang dapat menurunkan mutu dan daya simpan, antara lain serangan jamur pembusuk, serangga, bakteri, dan hewan pengerat, yang dipicu oleh kelembapan udara dan suhu yang tinggi, serta paparan sinar matahari. Oleh karena itu, perlu dipastikan bahwa simplisia yang akan disimpan mengandung kadar air rendah ($< 10\%$).

Pelabelan. Informasi penting yang perlu ada pada label tanaman, antara lain varietas tanaman, asal tanaman, bagian tanaman, tanggal pengeringan, dan kadar air. Apabila bahan tanaman diambil langsung dari lapangan, maka informasi tentang tanggal pengambilan, nama pemilik, alamat, serta letak geografis dan ketinggian tempat, perlu dicantumkan untuk penelusuran lebih lanjut kalau diperlukan. Untuk menangani bahan tanaman yang jumlahnya sangat banyak memerlukan fasilitas khusus, seperti ruang pencucian, alat perajang, dan fasilitas pengeringan. Namun, apabila jumlahnya terbatas maka peralatan yang digunakan dapat sederhana, seperti pisau *stainless steel*, kipas angin, dan rak-rak terbuat dari anyaman bambu, dan tempat penjemuran.

Penyimpanan. Penyimpanan merupakan kegiatan untuk mengamankan dan memperpanjang masa penggunaan produk. Penyimpanan dilakukan pada ruang dengan suhu, cahaya, dan kelembapan udara sesuai sifat dan karakteristik produk.

Bentuk sediaan bahan baku tanaman untuk pestisida nabati dapat berupa serbuk kering atau ekstrak kasar yang kental atau minyak asiri. Berikut diuraikan beberapa cara menyiapkan bahan pestisida berasal dari biji, buah, rimpang, ranting, daun, bunga, batang, akar, kulit, dan umbi. Bahan yang dihasilkan berupa serbuk, ekstrak kental, atau minyak asiri.

Biji. Bahan baku pestisida yang berbentuk biji, antara lain mimba, lada, ketumbar, sirsak, pala, mahoni, dan banyak jenis lainnya. Beberapa contoh penanganan biji antara lain, daging biji pala yang sudah kering (kadar air 10-15%) dihancurkan dengan mesin penggiling dengan kehalusan 3-5 mm, kemudian disuling dengan cara dikukus atau cara uap langsung selama \pm 20 jam (Ma'mun, 2014); ekstrak biji mimba yang sudah kering digiling menjadi serbuk kemudian dicampurkan dengan air panas (0,1 g per 20 ml) yang ditambah sedikit detergen untuk meningkatkan

penyerapan air ke dalam serbuk sehingga menjadi larutan (Sohail *et al.*, 2012); biji srikaya dikeringanginkan kemudian dihaluskan dengan alat penghalus sampai menjadi serbuk dan diekstraksi dengan cara merendam dalam pelarut metanol (1:10; w/v) selama 24 jam. Selanjutnya, hasil ekstraksi disaring dengan kertas filter (Whatman No. 1) dan metanolnya diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50 °C dengan tekanan 400-450 mmHg sampai diperoleh ekstrak kental (Dadang *et al.*, 2009).

Buah. Bahan baku pestisida yang berbentuk buah, contohnya cabe jawa, sirih hutan, dan lainnya. Buah cabe jawa yang digunakan sudah masak fisiologis yang dicirikan berwarna kemerahan dan tekstur masih keras. Buah cabe jawa dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa- sisa tanaman dan benda lainnya. Selajutnya, cabe jawa tersebut ditiriskan dan diiris-iris setebal setebal 3-5 mm menggunakan pisau *stainless steel*. Irisan simplisia cabe jawa disimpan pada rak-rak pengering dan dikeringanginkan di dalam ruangan yang dilengkapi dengan kipas angin atau AC suhunya sekitar ± 25 °C selama 4-14 hari kemudian dimasukkan ke dalam oven (≤ 50 °C) sampai kadar airnya sekitar 10% (Rohimatun *et al.*, 2020a).

Rimpang. Banyak jenis rimpang yang dapat digunakan sebagai bahan baku pestisida nabati, antara lain kunyit, temu lawak, jahe, lengkuas, kencur, dan bangle. Rimpang sebaiknya sudah cukup tua (7-9 bulan). Untuk rimpang jahe, misalnya, ciri rimpang yang sudah tua adalah permukaannya mengkilat, keras, dan dapat dilihat garis-garis ruas sekitar tujuh garis lingkaran pertumbuhan.

Rimpang dicuci dengan air mengalir untuk membersihkan dari sisa tanah dan kotoran lainnya, kemudian disortir untuk membuang bagian-bagian yang busuk, dan ditiriskan untuk menghilangkan sisa-sisa air cucian. Setelah ditiriskan, rimpang dirajang atau diiris dengan pisau *stainless steel*. Ketebalan irisan rimpang jahe 3-5 mm dan temu lawak 7-8 mm (Hernani dan

Marwati, 2012). Hasil rajangan disimpan pada rak-rak pengering, kemudian dikeringanginkan selama 7-14 hari pada ruangan yang dilengkapi dengan kipas angin dan suhunya sekitar ± 25 °C. Selanjutnya, rimpang yang sudah dikeringanginkan dimasukkan ke dalam oven (≤ 50 °C) sampai kadar airnya sekitar 10% (Rohimatun *et al.*, 2020a). Apabila simplisia kering akan dibuat menjadi serbuk, maka dapat digiling dengan mesin penepung yang terbuat dari *stainless steel*. Kehalusan partikel serbuk untuk rimpang (jahe, kunyit, dan lainnya) adalah 80-100 mesh (Indartiyah *et al.*, 2011).

Daun dan ranting. Jenis tanaman pestisida yang berasal dari daun dan ranting, antara lain daun cengkeh, sirih, serai wangi, tembakau, kumis kucing, babadotan, tagetes, dan kacang babi. Daun cengkeh yang sudah gugur dan beserakan di atas tanah dikumpulkan dan dibersihkan dari kotoran yang menempel atau benda lainnya, seperti butiran tanah dan rumput, kemudian dijemur atau dikeringanginkan. Daun cengkeh yang sudah kering dapat dihaluskan menjadi serbuk dan digunakan sebagai pestisida nabati atau terlebih dahulu disuling untuk mendapatkan minyak cengkeh (Ma'mun, 2014).

Terna nilam (ranting, batang, dan daun) dipanen dari tanaman berumur 5-6 bulan (panen pertama) dan panen berikutnya dilakukan setelah 3-4 bulan dari panen pertama. Proses pascapanen terna nilam untuk disuling minyaknya dapat mengikuti metode Ma'mun (2014). Terna nilam dikeringkan dengan cara dijemur pada rak-rak pengering atau lantai jemur dengan ketebalan lapisan jemuran 30 cm. Lama penjemuran 5 jam per hari selama dua hari atau tergantung cuaca, sampai kadar airnya mencapai 10-15%, yang ditandai dengan warna daun menjadi keabu-abuan dan tercium bau minyak nilam. Apabila cuaca mendung maka pengeringan dilakukan di dalam ruangan terbuka dan dihamparkan atau digantung yang dilengkapi

dengan *blower*. Terna nilam yang sudah kering sebaiknya langsung disuling.

Daun tembakau direndam di dalam air selama 24 jam kemudian air rendamannya disaring dengan kain muslin dan siap disemprotkan pada tanaman (Sohail *et al.*, 2012). Untuk mendapatkan ekstrak daun tembakau yang kental dapat dilakukan dengan metode Puripattanavong *et al.* (2013), yaitu daun tembakau kering dirajang kemudian direndam di dalam pelarut organik (2:5 ; w/v), seperti heksan, kloroform, etil asetat, metanol, atau etanol selama tiga hari. Selanjutnya, pelarut diuapkan dengan alat *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental.

Bunga. Beberapa bunga tanaman yang dapat dipakai sebagai sumber bahan pestisida nabati, antara lain *Tagetes*, *Tithonia diversifolia*/ki pahit (Rohimatun *et al.*, 2020b), piretrum (Wang *et al.*, 2021), dan sebagainya. Ekstraksi bunga dapat dilakukan dengan memotong bunga secara hati-hati, kemudian mengeringkannya hingga kadar air $\pm 10\%$ (Hernani dan Marwati, 2012). Setelah kering, semua bahan tanaman dihaluskan hingga diperoleh serbuk. Selanjutnya, serbuk diayak dengan pengayak kasa agar seragam. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi/perendaman. Serbuk bunga direndam dalam pelarut organik, misalnya dengan metanol perbandingan 1:10 (w/v) (Rohimatun *et al.*, 2020b).

Serbuk bunga direndam selama 48 jam pada suhu ruang (26 ± 2 °C; kelembapan relatif 66-86%). Semua hasil rendaman disaring dengan kertas saring melalui corong kaca. Penyaringan dilakukan bertingkat menggunakan kertas saring tipis kasar, kertas saring halus, dan kemudian kertas saring Whatman No. 1. Hasil saringan diuapkan dengan *rotary evaporator*. Ekstrak yang diperoleh siap untuk digunakan sebagai bahan pestisida atau disimpan dalam suhu ± 4 °C hingga siap digunakan (Rohimatun *et al.*, 2020b).

Akar. Akar tanaman jeringau dan akar tuba dipotong-potong sepanjang 15-20 cm kemudian dikeringkan, dihaluskan dengan mesin penghalus, dan disuling untuk diambil minyak asirinya (Ma'mun, 2014). Ekstraksi akar tuba dapat dilakukan juga dengan merajang akarnya sampai berukuran sekitar 0,5 cm, kemudian dimasukkan ke dalam blender (15 g per 100 ml akuades), disaring menggunakan filter ukuran 100 mesh, dan diambil filtratnya (Siswanto *et al.*, 2016).

Kulit. Pengolahan kulit kayu manis dilakukan dengan mengeringkan kayunya. Setelah kering, kayu digiling dengan ukuran sekitar 5 mm, kemudian disuling dengan selama 10 jam.

Umbi. Salah satu jenis umbi yang sering digunakan sebagai pestisida nabati adalah bawang putih. Ekstrak bawang putih dibuat dengan menghaluskan umbi bawang yang sudah kering dengan mesin penghalus. Selanjutnya, sebanyak 50 g serbuk umbi yang sudah kering direndam di dalam air selama 24 jam. Air rendaman disaring dengan muslin dan siap disemprotkan pada tanaman (Sohail *et al.*, 2012).

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, M.S.T. 2018. "Genetically engineered (modified) crops (*Bacillus thuringiensis* crops) and the world controversy on their safety". dalam *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28:52. <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0051-2>.
- Abdul-Baki, A.A. & Anderson, J.O. 1973. "Vigor Determination in Soyabean Application of Dairy Manure on Germination and Emergence of Some Selected Crops". dalam *Crop Science*, 13: 630–633.
- Ahmad, J.N., Musththaq, R., Ahmad, S.J.N., Maqsood, S., Ahuja, I. & Bones, A.M. 2018. "Molecular Identification and Pathological Characteristics of NPV Isolated from *Spodoptera litura* (Fabricius) in Pakistan". dalam *Pakistan Journal of Zoology*, 50 (6), 2229-2237. doi: 10.17582/ journal.pjz/2018.50.6.2229.2237.
- Akinci, I.E. & Akinci, S. 2010. "Effect of Chromium Toxicity on Germination and Early Seedling Growth in Melon (*Cucumis melo* L.)". dalam *African Journal of Biotechnology*, 9 (29): 4589–4594.
- Angelina, M., Dewijanti, I.D., Hartati, S. & Meilawati, L. 2014. "Acute Oral Toxicity and Brine Shrimp Lethality of *Pterocarpus indicus* Standardized Ethanol Extract". dalam *International Journal of PharmTech Research*, 6 (2): 676-685.
- Arosz, J. 1996. "Do Antibiotic Compound Produced In Vitro by *Xenorhabdus nematophilus* Minimize the Secondary Invasion of Insect Carcasses by Contaminating Bacteria". dalam *Nematologica*, 41: 367-377. doi: 10.1163/004425996X00092.

- Bathe, R., Sachsee, K., Ullman, L., Hormann, W.D., Zak, F. & Hess, R. 1974. "The Evaluation of Fish Toxicity in the Laboratory". dalam *Excepta Medica*, XVI: 113-124.
- Batool, F., Rehman, Y & Hasnain, S. 2016. "Phylloplane Associated Plant Bacteria of Commercially Superior Wheat Varieties Exhibit Superior Plant Growth Promoting". dalam *Frontiers in Life Science*, 9 (4): 313-322. doi: 10.1080/21553769.2016.1256842.
- Beauchamp, C. & Fridovich, I. 1971. "Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels". dalam *Analytical Biochemistry*, 44: 276-287. doi: 10.1016/0003-2697(71)90370-8.
- Bull, C.J. & Mc Inerny, J.E. 1974. "Behaviour of Juvenile Coho Salmon (*Onchorhynchus kisutch*) to Sumithion (Fenitrothion), an Organophosphorous Insecticide". dalam *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 31: 1867-1891. doi: 10.1139/f74-243.
- Burnell, A. & Stock, S.P. 2000. "Heterorhabditis, Steinernema and Their Bacterial Symbionts-Lethal Pathogens of Insects". dalam *Nematology*, 2: 31-42. doi: 10.1163/156854100508872.
- Buxton, R. 2005. "Blood Agar Plates and Hemolysis Protocols". dalam *American Society for Microbiology*, h. 1-9. <https://asm.org/getattachment/7ec0de2b-bb16-4f6e-ba07-2aea25a43e76/protocol-2885.pdf>.
- Cairns, Jr.J., Heath, A.G. & Parker, B.C. 1975. "The Effects of Temperature Upon the Toxicity of Chemical Substances on Aquatic Life". dalam *Journal of Testing and Evaluation*, 6 (2): 81 - 90. doi: 10.1007/BF00036747.
- Cary, D. & Wilson, N. 2017. "Dynamics of a Rapidly Growing Bioproducts Industry and Trade Associations". dalam *Bio Protection Global*. <https://ibma-global.org/wp-content/uploads/2020/12/201709gmusbioprotectionglobaldcnw.pdf>.

- Caoili, B.L., Latina, R.A., Sandoval, R.F.C. & Orajay, J.I. 2018. "Molecular Identification of Entomopathogenic Nematode Isolates from the Philippines and Their Biological Control Potential against Lepidopteran Pests of Corn". dalam *Journal of Nematology*, 50 (2): 99-110. doi: 10.21307/jofnem-2018-024.
- Chaerani, Prabowo, H. & Indrayani, I.G.A.A. 2018. "Isolation and Molecular Identification of Entomopathogenic Nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis*) from East Java and Bali". dalam *Jurnal AgriBiogen*, 14 (2): 85-96.
- Chou, C.H., Chiang, Y.C. & Khan, C.I. 1978. "Impact of Water Pollution on Crop Growth in Taiwan". dalam *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 19: 107-124.
- Dadang, Fitriyari, E.D. & Prijono, D. 2009. "Effectiveness of Two Botanical Insecticide Formulations to Two Major Cabbage Insect Pests on Field Application". dalam *Journal of ISSAAS*, 15 (1): 42-51.
- Dadang & Prijono, D. 2008. *Insektisida Nabati, Prinsip, Pemanfaatan, dan Pengembangan*. Bogor, Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. ISBN:978-979-25-3571-6.
- Dadang. 2015. *Pengembangan Pestisida Nabati untuk Mendukung Pertanian Ramah Lingkungan dan Berkelanjutan*. Orasi Ilmiah Guru Besar IPB, 16 September 2015. Bogor, Institut Pertanian Bogor. 82 hlm.
- Das, S. & Gupta-Bhattacharya, S. 2009. "*Trichoderma harzianum*: Occurrence in The Air and Clinical Significance". dalam *Aerobiologia*, 25: 137-145. doi: 10.1007/s10453-009-9119-5.
- Djiwanti, S.R. & Miftakhurohmah. 2022. "Molecular Detection and Identification of The Foliar Nematode *Aphelenchoides fragariae* on King of Bitters (*Andrographis paniculata*) in Indonesia". dalam *Australasian Plant Pathology*, 51: 301-304. <https://doi.org/10.1007/s13313-022-00854-z>.

- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1990. "A Rapid Total DNA Preparation Procedure for Fresh Plant Tissue". dalam *Focus*, 12: 13-15.
- Dunphy, G.B., Ruterford, T.A. & Webster, J.M. 1985. "Growth and Virulence of *Steinernema glaseri* Influenced by Different Subspecies of *Xenorhabdus nematophilus*". dalam *Journal of Nematology*, 17 (4): 476-482.
- [EFSA] European Food Safety Authority. 2012. "Guidance on the Assessment of Bacterial Susceptibility to Antimicrobials of Human and Veterinary Importance". dalam *EFSA Journal*, 10 (6): 2740. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2740.
- [EFSA] European Food Safety Authority. 2019. "Update of the List of QPS-Recommended Biological Agents Intentionally Added to Food or Feed as Notified to EFSA 10: Suitability of Taxonomic Units Notified to EFSA until March 2019". dalam *EFSA Journal*. doi: 10.2903/j.efsa.2019.5753.
- Euler, H.V. & Josephson, K. 1927. "Uber Katalase. I. Justus Liebigs Annalen Der.". dalam *Chemie*, 452 (1): 158-181. doi: 10.1002/jlac.19274520112.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2014. "PP 1/135 Phytotoxicity Assessment". dalam *EPPO Bulletin*, 44 (3): 265-273. doi: 10.1111/epp.12134.
- [US-EPA] United States Environmental Protection Agency. 1980. *Ambient Water Quality Criteria for Endosulfan*. US Environmental Protection Agency. EPA 440t5180046. Office of Water Regulation and Standard Criteria Division, Washinton DC. 154 hlm.
- [US-EPA] United States Environmental Protection Agency. 2002. *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*. United States Environmental Protection Agency Office of Water (4303T). 1200 Pennsylvania Avenue, NW. Washinton, DS 20460.

- Erayya, J.J., Sajeesh, P.K., & Upadhyay, V. 2013. "Nuclear Polyhedrosis Virus (NPV), A Potential Biopesticide: A Review". dalam *Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences*. 1(8), 30-33.
- Essiedu, J.A., Adepoju, F.O. & Ivantsova, M.N. 2020. "Benefits and Limitations in Using Biopesticides: A Review". dalam *AIP Conference Proceedings*, 2313. 080002: 1-5. doi: 10.1063/5.0032223.
- Etebari, K., Matindoost, L., Mirhoseini, S.Z. & Turnbull, M.W. 2007. "The Effect of BmNPV Infection on Protein Metabolism in Silkworm (*Bombyx mori*) Larva". dalam *Invertebrate Survival Journal*, 4 (1): 13-17.
- Fatma, F., Verma, S., Kamal, A. & Srivastava, A. 2018. "Phytotoxicity of Pesticides Mancozeb and Chlorpyrifos: Correlation with the Antioxidative Defense System in *Allium cepa*". dalam *Physiological and Molecular Biology of Plants*, 24 (1): 115-123. doi: 10.1007/s12298-017-0490-3.
- [FAO] Food and Agriculture Organization. 1988. *Guidelines for the Registration of Biological Pest Control Agents*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 7 hlm. <http://www.fao.org/3/bt476e/bt476e.pdf>.
- Federici, B.A., Park, H.-W. & Bideshi, D.K. 2010. "Overview of the Basic Biology of *Bacillus thuringiensis* with Emphasis on Genetic Engineering of Bacterial Larvicides for Mosquito Control". dalam *The Open Toxinology Journal*, 3: 154-171. doi: 10.2174/1875414701003010083.
- Finney, D.J. 1971. *Probit Analysis*. 3rd Edition. Cambridge at the University Press. 1971. 333 hlm.
- Golden, D.B., Kagey-Sobotka, A., Norman, P.S., Hamilton, R.G. & Lichtenstein, L.M. 2001. "Insect Sting Allergy with Negative Venom Skin Test Responses". dalam *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107: 897-901. doi: 10.1067/MAI.2001.114706.

- Gosselin, R.E., Smith, R.P. & Hodge, H.C. 1984. *Clinical Toxicology of Commercial Products*. 5th Edition. Williams & Wilkins, Baltimore, USA. ISBN 0683036327 9780683036329. 2009 hlm.
- Gulzar, A., Mukhtar, T. & Wright, D.J. 2020. "Effects of Entomopathogenic Nematodes *Steinernema carpocapsae* aneterord *Heterorhabditis bacteriophaga* on the Fitness of a Vip3A Resistant Subpopulation of *Heliothis virescens* (Noctuidae: Lepidoptera)". dalam *Plant Protection*, 79 (2): 281-292. doi: 10.1590/1678-4499.20190501.
- Hallmann, J., Berg, G. & Schulz, B. 2006. Isolation Procedures for Endophytic Microorganisms Soil Biology. Volume 9. Dalam: Schulz, B., Boyle, C. & Sieber, T.N. (eds.). *Microbial Root Endophytes*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. hlm. 299-319.
- Hamidi, M.R., Jovanova, B. & Panovska, T.K. 2014. "Toxicological Evaluation of the Plant Products Using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) Model". dalam *Macedonia Pharmaceutical Bulletin*, 60 (01): 9-18. doi: 10.33320/maced.pharm.bull.2014.60.01.002.
- Han, X. 2016. A Review of the Food and Feed Safety of the Cry1Ab Protein. *ILSI Research Foundation*. 15 hlm. doi: 10.13140/RG.2.2.18428.54400.
- Han, R. & Ehler, R-U. 2000. "Pathogenicity, Development, and Reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* Under Axenic In Vivo Conditions". dalam *Journal of Invertebrate Pathology*, 75: 55-58. doi: 10.1006/jipa.1999.4900.
- Hashimoto, Y., Okubo, E., Iyo, T., Yamaguchi, M. & Tanaka, S. 1981. "Changes in Susceptibility of Carp to Several Pesticides with Growth". dalam *Journal of Pesticides Science*, 7: 457– 461.
- Hassan, S.A. 1985. "Standard Methods to Test the Side-Effects of Pesticides on Natural Enemies of Insects and Mites Developed by the IOBC/WPRS Working Group 'Pesticides and Beneficial Organisms. International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants West Palaearctic Regional

- Section". dalam *Bulletin OEPP*, 15 (2): 214-255. doi: 10.1111/j.1365-2338.1985.tb00224.x.
- Henderson, C. & Tilton, E.W. 1955. Tests with Acaricides against the Brown Wheat Mite". dalam *Journal of Economic Entomology*, 48 (2): 157-161. doi: 10.1093/JEE/48.2.157.
- Hernani & Marwati, T. 2012. *Teknologi Pascapanen Tanaman Obat*. Bogor, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian. ISBN: 978-979-1116- 34-3.
- Hidayat, T. & Pancoro, A. 2008. "Kajian Filogenetika Molekuler dan Peranannya dalam Menyediakan Informasi Dasar untuk Meningkatkan Kualitas Sumber Genetik Anggrek". dalam *Jurnal AgroBiogen*, 4 (1): 35-40.
- Ignoffo, C.M. & Cough, T.L. 1981. The Nucleopolyhedrosis Virus of *Heliothis* spp. as a Microbial Insecticide. Dalam Burges, H.P. (ed.). *Microbial Control of Pest dan Plant Diseases 1970-1980*. Academic Press London dan New York, NY. hlm. 29-362.
- Ikbal, C. & Pavela, R. 2019. "Essential Oils as Active Ingredients of Botanical Insecticides against Aphids". dalam *Journal of Pest Science*, 92: 971-986. doi: 10.1007/s10340-019-01089-6.
- Indartiyah, N., Siregar, I., Agustina, Y.D., Wahyono, S., Djauhari, E., Hartono, B., Fika, W., Maryam, & Supriyatna, Y. 2011. *Pedoman Teknologi Penanganan Pascapanen Tanaman Obat*. Kementerian Pertanian Direktorat Jenderal Hortikultura Direktorat Budidaya dan Pascapanen Sayuran dan Tanaman Obat. 92 hlm.
- Irma, A., Meryandini, A. & Rupaedah, B. 2018. "Biofungicide Producing Bacteria: An In Vitro Inhibitor". dalam *Hayati Journal*, 25 (4): 152-159.
- Islam, A., Kabir, Md.S. & Khair, A. 2019. "Molecular Identification and Evaluation of Indigenous Bacterial Isolates for Their Plant Growth Promoting and Biological Control Activities against

- Fusarium* Wilt Pathogen of Tomato". dalam *Plant Pathology Journal*, 35 (2): 137-148. doi: 10.5423/PPJ.OA.06.2018.0104.
- Isman, M.B. 2020. "Bioinsecticides Based on Plant Essential Oils: a Short Overview". dalam *Zeitschrift für Naturforschung C*, 75 (7-8): 179-182. doi: 10.1515/znc-2020-0038.
- Inglis, A. & Davis, E.L. 1972. *Effects of Water Hardness on the Toxicity of Several Organic and Inorganic Herbicides to Fish*. US Fish and Wildlife Service, Department of Interior, Washington, DC. 12 hlm.
- Indrayani, I.G.A.A. 2003. "Agen Hayati Nuclear Polyhedrosis Virus dan Potensinya dalam Mengendalikan Penggerek Buah Kapas *Helicoverpa armigera* Hubner". dalam *Perspektif*, 2 (1): 20-30. doi: 10.21082/p.v2n1.2003.20-30.
- [IRAC] Insecticide Resistance Action Committee. 2022. *The IRAC Mode of Action Classification*. <https://irac-online.org/mode-of-action/>.
- Isman, M.B. 2014. "Botanical Insecticides: a Global Perspective". dalam *States of the Art and The Future Opportunities*. ACS Symposium Series Volume 1172, 2: 21-30. doi: 10.1021/bk-2014-1172.ch002.
- Jarvinen, A.W. & Tannel, D.K. 1982. "Toxicity of Selected Controlled Release and Corresponding Unformulated Technical Grade Pesticides to the Fathead Minnows *Pimephales promelas*". dalam *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 27 (3): 179-195. doi: 10.1016/0143-1471(82)90024-1.
- Kalbande, B.B., Ghonge, V.L., Sutar, S.R., Sable, S.V., Meshram, M.D. & Warade, J. 2012. "Principle of DNA Extraction and The Role of Various Components Used in DNA Extraction". dalam *Agrobios Newsletter*, XI (01): 6-8.
- Kary, N.E., Sanatipour, Z., Mohammadi, D. & Dillon, A. 2021. "Combination Effects of Entomopathogenic Nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema feltiae*, with

- Abamectin on Developmental Stages of *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera, Gelechiidae)". dalam *Crop Protection*, 143 (4): 105543. doi: 10.1016/j.cropro.2021.105543.
- Kaya, H.K. & Gaugler, R. 1993. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press. Boca Raton. 83 hlm.
- Koesoemadinata, S. 2000. "Toksistas Akut Formulasi Insektisida Endosulfan, Klorpirifos, dan Klorfluazuron pada Tiga Jenis Ikan Air Tawar dan Udang Galah". dalam *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, 6 (3-4): 36-43. doi: 10.15578/jppi.6.3-4.2000.36-43.
- Koppenhöfer, A.M., Grewal, P.S. & Kaya, H.K. 2000. "Synergism of Imidacloprid and Entomopathogenic Nematodes against White Grubs: The Mechanism". dalam *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 94: 283-293. doi: 10.1046/j.1570-7458.2000.00630.x.
- Leahy, J., Mendelsohn, M., Kough, J., Jones, R. & Berckes, N. 2014. "Biopesticide Oversight and Registration at the U.S. Environmental Protection Agency". dalam *Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities*, h. 3-18. doi: 10.1021/bk-2014-1172.ch001.
- Lelliott, R.A. & Stead, D.E. 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plant Vol 2*. British Society for Plant Pathology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London. 216 hlm.
- Li, Z. & Blissard, G.W. 2009. "The *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus GP64 Protein: Analysis of Transmembrane Domain Length and Sequence Requirements". dalam *Journal of Virology*, 89 (9): 4447-4461. doi:10.1128/JVI.02252-08.
- Luck, H. 1963. Peroxidase. dalam: Bergmeyer HU (ed.) *Methods of Enzymatic Analysis*. hlm. 895-897. Academic Press Inc., New York.

- Ma'mun. 2014. *Sirkuler Informasi Teknologi Tanaman Rempah dan Obat: Petunjuk Teknis Penanganan Bahan dan Penyulingan Minyak Atsiri*. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat. ISBN: 978-979-548-043-3.
- Macek, K.J. & Allister, W.A. 1970. "Insecticide Susceptibility of Some Common Fish Family". dalam *Transaction of the American Fisheries Society*, 98 (1): 20-27. doi: 10.1577/1548-8659(1970)99<20:ISOSCF>2.0.CO;2.
- Maina, U.M., Galadima, I.B., Gambo, F.M. & Zakaria, D. 2018. "A Review on the Use of Entomopathogenic Fungi in the Management of Insect Pests of Field Crops". dalam *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6 (1): 27-32.
- Marrone, P.G. 2019. "Pesticidal Natural Products – Status and Future Potential". dalam *Pest Management Science*, 75 (9): 2325-2340. doi: 10.1002/ps.5433.
- Mayer, F.L. & Ellersieck, M.R. 1986. *Manual of Acute Toxicity. Interpretation and Data Base of 410 Chemicals and 66 Species of Freshwater Animals*. Resource Publ 160 US Department of Interior, Washington DC. 12 hlm.
- [Mentan RI] Menteri Pertanian Republik Indonesia. 1995. Keputusan Menteri Pertanian Nomor 411/Kpts/TP.120/6/95 tentang Pemasukan Agens Hayati Ke Dalam Wilayah Negara Republik Indonesia.
- [Mentan RI] Menteri Pertanian Republik Indonesia. 2019. Permentan RI Nomor 43 Tahun 2019 tentang Pendaftaran Pestisida. 151 hlm.
- Miftakhurohmah. 2015. "Prinsip Dasar *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk Deteksi Patogen pada Tanaman secara Molekuler". dalam *Warta Balitro*, 32 (64): 13-15.
- Miftakhurohmah, Nyana, I.D.W., Damayanti, T.A. & Noveriza, R. 2017. "Identifikasi Molekuler *Cucumber mosaic virus* (CMV) Asal Tanaman Nilam (*Pogostemon cablin*)". dalam *Jurnal*

- Penelitian Tanaman Industri*, 23 (1): 11-17. doi: 10.21082/littri.v23n1.2017.11-17.
- Miftakhurohmah, Hidayat, S.H., Mutaqin, K.H., Soekarno, B.P.W. & Wahyuno, D. 2020. "Incidence and Severity of Mottle Disease in Black Pepper Plants (*Piper nigrum*) in Sukamulya Resesearch Station, Sukabumi Regency, West Java". dalam *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 418, 012054. doi: 10.1088/1755-1315/418/1/012054.
- Minarni, E.W., Soesanto, L., Suyanto, A. & Rostaman. 2021. "Molecular Identification of Three Entomopathogenic Fungi Infecting the Brown Plant Hopper Pest in Indonesia". dalam *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31: 62. doi: 10.1186/s41938-021-00412-7.
- Muaja, A.D., Koleangan, H.S.J., & Runtuwene, M.R.J. 2013. "Uji Toksisitas dengan Metode BSLT dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Soyogik (*Saurauia bracteosa* DC) dengan Metode Soxhletasi". dalam *Jurnal MIPA Unsrat*, 2 (2): 115-118. doi: 10.35799/jm.2.2.2013.3000.
- Murillo, R., Lasa, R., Goulson, D., Williams, T., Munoz, D. & Caballero, P. 2003. "Effect of Tinopal LPW on the Insecticidal Properties and Genetic Stability of the Nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae)". dalam *Journal of Economic Entomology*, 96 (6): 841-846. doi: 10.1093/jee/96.6.1668.
- Naidu, J.R., Ismail, R. & Sasidharan, S. 2014. "Acute Oral Toxicity and Brine Shrimp Lethality of Methanol Extract of *Mentha spicata* L. (Lamiaceae)". dalam *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13 (1): 101-107. doi: 10.4314/tjpr.v13i1.15.
- Nordengrüna, M., Michalik, S., Völker, U., Brökera, B.M. & Gómez-Gascóna, L. 2018. "The Quest for Bcterial Allergens". dalam *International Journal of Medical Microbiology*, 308 (6): 738-750. doi: 10.1016/j.ijmm.2018.04.003.

- [OECD] Organization for Economic Co-operation and Development. 2012. *OECD Guidance to the Environmental Safety Evaluation of Microbial Biocontrol Agents*. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Pesticides No. 67. ENV/JM/MONO(2012)1. www.oecd.org/ehs/
- Ortiz-Urquiza, A. & Keyhani, N.O. 2013. "Action on the Surface: Entomopathogenic Fungi Versus the Insect Cuticle". dalam *Insects*, 4: 357-374. doi: 10.3390/insects4030357.
- Parra, A.L., Yhebra, R.S., Sardiñas, I.G. & Buela, L.I. 2001. "Comparative Study of the Assay of *Artemia salina* L. and the Estimate of the Medium Lethal Dose (LD₅₀ Value) in Mice, to Determine Oral Acute Toxicity of Plant Extracts". dalam *Phytomedicine*, 8 (5): 395–400. doi: 10.1078/0944-7113-00044.
- Pawar, K., Khetmales, S., Motkar, B., Bande, R. & Wable, H. 2013. "Antimicrobial Activity of *Lantana camara* (L.) var. *Aculeata* (L.) Mold. (Verbanaceae)". dalam *Indo American Journal of Pharmaceutical Res*, 3 (4): 3284-3294.
- Poinar, G.O.Jr. 1979. *Nematodes for Biological Control of Insect*. CRS. Boca Raton, F.L. hlm. 36-39.
- Poinar, G.O.Jr. 1990. Taxonomy and Biology of *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*. Dalam: Gaugler, R. & Kaya, H.R. (eds.). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press. Boca Raton. hlm. 23-61.
- Powers, E.M. 1995. "Efficacy of the Ryu Nonstaining KOH Technique for Rapidly Determining Gram Reactions of Food-Borne and Waterborne Bacteria and Yeasts". dalam *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (10): 3756–3758.
- Prijono, D. 1999. Prospek dan strategi pemanfaatan insektisida alami dalam PHT. Di dalam: Nugroho BW, Dadang, Prijono D, editor. *Bahan Pelatihan Pengembangan dan Pemanfaatan Insektisida Alami*. Bogor (ID). Pusat Kajian Pengendalian Hama Terpadu, IPB.

- Prijono, D. 2003. Teknik Ekstraksi, Uji Hayati, dan Aplikasi Senyawa Bioaktif Tumbuhan. *Dalam: Pelatihan Peningkatan Pengetahuan dan Keterampilan Pelaksana PHT Perkebunan Rakyat*. Bogor, Kerjasama Pusat Kajian Pengendalian Hama Terpadu, IPB dengan Bagian Proyek Penelitian PHT Perkebunan Rakyat, Badan Litbang Pertanian. hlm. 1-29.
- Priyamvadadewi, A., Rao, D.M.R, Tilak, K.S. & Murty, A.S. 1981. "Relative Toxicity of the Technical Grade Material, Isomer and Formulations of Endosulfan to the Fish *Channa punctate*". dalam *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 27: 239-242.
- Priyatno, T.P., Samudra, I.M., Manzila, I., Susilowati, D.N. & Suryadi, Y. 2016. "Eksplorasi dan Karakterisasi Entomopatogen Asal Berbagai Inang dan Lokasi". dalam *Berita Biologi*, 15 (1): 69-79.
- Puripattanavong, J., Songkram, C., Lomlim, L., & Annuaikit, T. 2013. "Development of Concentrated Emulsion Containing *Nicotiana tabacum* Extract for Use as Pesticide". dalam *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3 (11): 16-21. doi: 10.7324/JAPS.2013.31104.
- Racke, K.D. 1993. "Environmental Fate of Chlorpyrifos. *Dalam: Ware, G.W. (ed). Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol. 131*. Springer, New York, NY. 131, 1– 150. doi: 10.1007/978-1-4612-4362-5_1.
- Rao, D.M.R, Devi, A.P. & Murty, A.S. 1981. "Toxicity and Metabolism of Endosulfan and Its Effects on Oxygen Consumption and Total Nitrogen Excretion of The Fish *Macronagthus aculentum*". dalam *Pesticide Biocheistry and Physiology Journal*, L5: 282-284.
- Raveau, R., Fontaine, J. & Sahraoui, A.L.-H. 2020. "Essential Oils as Potential Alternative Biocontrol Products against Plant

- Pathogens and Weeds: A Review". dalam *Foods*. 9, 365. doi:10.3390/foods9030365.
- Rohimatun, Dadang, Winasa, I.W. & Yuliani, S. 2020a. "Kompatibilitas Ekstrak *Piper retrofractrum* Vahl. dan *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. untuk Pengendalian *Helopeltis antonii* Sign". dalam *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat*, 31 (2): 107-122. doi: 10.21082/bullitro.v31n2.2020.107-122.
- Rohimatun, Yuliani, S., Winasa, I.W. & Dadang. 2020b. "Efficacy of Selected Piperaceae, Asteraceae, and Zingiberaceae, Plant Extracts against *Helopeltis antonii* Sign". dalam *Journal of International Society for Southeast Asian Agricultural Science*, 26 (2): 145-157.
- Rohimatun, Willis, M., Wahyono, T.E. & Ahyar. 2015. Efektivitas Kombinasi Cendawan Entomopatogen dan Insektisida Nabati terhadap *Helopeltis antonii* Sign. (Hemiptera: Miridae) pada Bibit Jambu Mete. *Prosiding Seminar Nasional Perbenihan Tanaman Rempah dan Obat*. Bogor, 29 April 2015. hlm. 211-222. ISBN: 978-602-344-076-4.
- Sahgal, G., Ramanathan, S., Sasidharan, S., Mordi, M.N., Ismail, S. & Mansor, S.M. 2010. "Brine Shrimp Lethality and Acute Oral Toxicity Studies on *Swietenia mahagoni* (Linn.) Seed Methanolic Extract". dalam *Pharmacognosy Research*, 2: 215-220. doi: 10.4103/0974-8490.69107.
- Samsudin. 2016. "Prospek Pengembangan Bioinsektisida *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) untuk Pengendalian Hama Tanaman Perkebunan di Indonesia". dalam *Perspektif*, 15 (12): 18-30.
- Samsudin & Santoso, T. 2014. "Uji Patologi *Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus (SeNPV) pada Larva *S. exigua* Huebner (Lepidoptera: Noctuidae)". dalam *Jurnal Biologi Indonesia*, 10 (2): 169-178. doi: 10.21082/psp.v15n1.2016.18-30.

- Sangi, M.S., Momuat, L.I., & Kumaunang, M. 2012. "Uji Toksisitas dan Skrining Fitokimia Tepung Gabah Pelepah Aren (*Arenga Pinnata*)". dalam *Jurnal Ilmiah Sains*, 1 (2): 127-134. doi: 10.35799/jis.12.2.2012.716.
- Santos, M.S., Zanardi, O.Z., Pauli, K.S., Forim, M.R., Yamamoto, P.T. & Vendramin, J.D. 2015. "Toxicity of an Azadirachtin-Based Biopesticide on *Diaphorina Citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) and Its Ectoparasitoid *Tamarixia radiata* (Waterson) (Hymenoptera: Eulophidae)". dalam *Crop Protection*, 74: 116-123. doi: 10.1016/j.cropro.2015.04.2015.
- Sari, W. & Rosmeita, C.N. 2019. "Identifikasi Molekuler Cendawan Entomopatogen *Beauveria bassiana* dan *Metarhizium anisopliae* Asal Isolat Cianjur". dalam *Jurnal Pro-Stek*, 1 (1): 1-9.
- Sayed, S.M., Ali, E.F., El-Arnaouty, S.A., Mahmoud, S.F., Amer, S.A. 2018. "Isolation, Identification, and Molecular Diversity of Indigenous Isolates *Beauveria bassiana* from Taif Region, Saudi Arabia". dalam *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28: 47. doi: 10.1186/s41938-018-0054-z
- Schaad, N.W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Third ed. APS Press. hlm. 1–16.
- Schreiber, S. 2020. Less Toxic, More Sustainable, Great Outlooks: Why Biopesticides Commercialisation Needs a Push. *Ketbio Newspoint*. <https://ketbio.eu>. 8 hlm.
- Schimmel, S.C., Patrick, J.M.Jr. & Wilson, A.J.Jr. 1977. "Acute Toxicity and Bioconcentration of Endosulfan by Estuarine Animals". Dalam: Mayer, F.L. & Hamelink, F.L (eds.). *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*. American Society for Testing and Materials. hlm. 241-253. doi: 10.1520/STP32403S.
- Scott, S.J., Jones, R.A. & William, W.A. 1984. "Review of Data Analysis Methods for Seed Germination". dalam *Crop Science*, 24 (6): 1192–1199. doi: 10.2135/cropsci1984.0011183X002400060043x.

- Sembiring, B., Supriadi, & Ediningsih. 2019. "Reducing Aflatoxin Contamination of Nutmeg Using Drying Methods". dalam *IOP Conference Series: Earth Environmental Science*, 418, 012030. doi: 10.1088/1755-1315/418/1/012030.
- Sharma, M.P., Sharma, A.N. & Hussaini, S.S. 2011. "Entomopathogenic Nematodes, a Potential Microbial Biopesticide: Mass Production and Commercialisation Status – A Mini Review". dalam *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44 (9): 855-870. doi: 10.1080/03235400903345315.
- Sharma, N., Gupta, P.C., Singh, A. & Rao, C.V. 2013. "Brine Shrimp Bioassay of *Pentapetes phoenicea* Linn. and *Ipomoea carnea* Jacq. Leaves". dalam *Der Pharmacia Lettre*, 5: 162-167.
- Short, D.E. 1981. "Phytotoxicity of Pesticides to Plants". dalam *Ornamentals Northwest Archives*, 5(3): 4-5.
- Singh, B.D. & Narain, A.S. 1982. "Acute Toxicity of Thiodan to Catfish (*Heteropneustes fossilis*)". dalam *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 28: 122-127.
- Siswanto, I.N., Sulabda & Soma, I.G. 2016. "Uji Alergi Ekstrak Akar Tuba terhadap Kulit Anak Kucing Lokal". dalam *Buletin Veteriner Udayana*, 8(2): 180-186.
- Sohail, F., Hamid, S., Waheed, A., Ahmed, N., Aslam, N., Zaman, Q., Ahmed, F. & Islam, S. 2012. "Efficacy of Different Botanical Materials against Aphid *Toxoptera aurantii* on Tea (*Camellia sinensis* L.) Cuttings under High Shade Nursery". dalam *Journal of Environmental Science*, 3 (6): 1065-1070.
- Sorgeloos P. 1973. "First Report on the Triggering Effect of Light on The Hatching Mechanism of *Artemia salina* Dry Cysts". dalam *Journal of Marine Biology*, 22: 75-76.
- Sorgeloos, P., van der Wielen, C.R. & Persoone, G. 1978. "The Use of *Artemia* Nauplii for Toxicity Tests - A Critical Analysis". dalam *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2: 249-255.

- Speight, M.R., Hunter, M.D. & Watt, A.D. 2008. *Ecology of Insects: Concepts and Applications*. A John Wiley & Sons, Ltd. Publication.
- Supriadi. 2015. "Inovasi Hasil Penelitian untuk Mendukung Komersialisasi Pestisida Biologi di Indonesia". dalam *Perspektif*, 14 (1): 15 -25. doi: 10.21082/p.v14n1.2015.15-25.
- Sterk, G, Heuts, F., Merks, N. & Bock, J. 2002. "Sensitivity of Non-Target Arthropods and Beneficial Fungal Species to Chemical and Biological Plant Protection Products: Results of Laboratory and Semi-Fields Trials". dalam *1st International Symposium on Biological Control of Arthropods*. hlm. 306-313.
- Tampubolon, K., Sihombing, F.N., Purba, Z., Samosir, S.T.S. & Karim, S. 2018. "Potensi Metabolit Sekunder Gulma sebagai Pestisida Nabati di Indonesia". dalam *Jurnal Kultivasi*, 17 (3): 683-693. doi: 10.24198/kultivasi.v17i3.18049.
- Thakkar, P., Modi H.A. & Prajapati, J.B. 2015. "Isolation, characterization and safety assessment of lactic acid bacterial isolates from fermented food products". dalam *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 4(4):713-725.
- Toprak, U. 2004. "First record of a NPV isolated from *Spodoptera littoralis* (Boisd). (Lepidoptera: Noctuidae) in Turkey and its molecular identification according to the partial lef-8 gene". dalam *Turk. J. Biol.* 28: 71-77.
- Turner, R.G. & Marshal, C. 1972. "Accumulation of Zinc by Subcellular Root of *Agrostis Tannis* Sibth. in Relation of Zinc Tolerance". dalam *New Phytologist Journal*, 71: 671-676. doi: 10.1111/j.1469-8137.1972.tb01277.x.
- Ujjan, Z.A., Bukero, A., Magsi F.H., Bhutto, Z.A., Kashmiri, A.M.-U-D., Soomro, A.A., Qureshi, U., Chandio, M.A. & Channa, N.A. 2017. "Comparative Toxicity of Insecticides and Biopesticides against Predatory Beetle, *Menochilus sexmaculatus*

- Fab. in Laboratory". dalam *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(3): 662-666.
- Vanhaecke, P., Persoone, G., Claus, C. & Sorgeloos, P. 1981. "Proposal for a Short-Term Toxicity Test with *Artemia nauplii*". dalam *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 5: 382-387.
- Vega, F.E. & Kaya, H.R. 2012. *Insect Pathology*. Second Edition. London: Academic Press. 978 hlm.
- Verma, D.K., Guzmán, K. N. R., Mohapatra, B., Talukdar, D., Chávez-González, M. L., Kumar, V., Srivastava, S., Singh, V., Yulianto, R., Malar, S.E., Ahmad, A., Utama, G.L. & Aguilar, C. N. 2021. Recent Trends in Plant- and Microbe-Based Biopesticide for Sustainable Crop Production and Environmental Security. *Dalam R. Prasad et al. (eds.), Recent Developments in Microbial Technologies, Environmental and Microbial Biotechnology*. Springer Nature Singapore Pte Ltd. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4439-2_1.
- Vidyasagar, G.M. & Tabassum, N. 2013. "Antifungal Investigations on Plant Essential Oils; A Review". dalam *International Journal Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 2: 19–28 .
- Wang, Q., Xu, P., Andrezza, F., Liu, Y., Nomura, Y., Duran, P., Jiang, L., Chen, M., Takamatsu, G., Ihara, M., Matsuda, K., Isaacs, R., Oliveira, E.E., Du, Y. & Dong, K. 2021. "Identification of Multiple Odorant Receptors Essential for Pyrethrum Repellency in *Drosophila melanogaster*". dalam *PloS Genetics*, 17 (7): e1009677. doi: 10.1371/journal.pgen.100967.
- Wati, S.S, Aisyah & Risnawati. 2021. "Uji Fitotoksisitas Sediaan Sederhana Buah Cabe Jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) terhadap Tanaman hidroponik". dalam *Jurnal Pertanian Presisi*, 5 (1): 71-84. doi: 10.35760/jpp.2021.v5i1.3831.
- Weber, J.B. 1972. Interaction of Organic Pesticides with Particulate Matter in Aquatic and Soil System. *Dalam: Faust, S.D. (ed.). Fate*

of *Organic Pesticides in the Aquatic Environment. Advances in Chemistry Series 111*. Washington DC. American Chemistry Society. hlm. 55-64.

Wick, R. 2010. "Tobacco hypersensitivity; the first test to screen bacteria for pathogenicity". dalam *National Plant Diagnostic Network*, 5 (7): 3-4.

Wiratno, Siswanto & Trisawa, I.M. 2013. Perkembangan Penelitian, Formulasi, dan Pemanfaatan Pestisida Nabati". dalam *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian*, 32 (4): 150-155. doi: 10.21082/jp3.v32n4.2013.p150-155.

Wiryadiputra, S. 2003. "Keefektifan Limbah Tembakau sebagai Insektisida Nabati untuk Mengendalikan Hama *Helopeltis* sp. pada Kakao". dalam *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 9(1): 35-45. doi: 10.22146/jpti.12289.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Jenis pestisida, golongan, nama bahan aktif, dan nama dagang biopestisida yang terdaftar di Indonesia

Jenis pestisida	Nama bahan aktif	Deskripsi singkat	Merk dagang
	Eugenol 20 g/l	Insektisida biologi berbentuk pekatan yang dapat diemulsikan	PESTOR 20,02 EC
	Matrin 6 g/l	Insektisida biologi berbentuk larutan dalam air	ORGANTRIN 6 SL
	<i>Beauveria bassiana</i> 5,7 x 10 ⁹ cfu/g	Insektisida biologi berbentuk tepung	MOSA BN P
Insektisida biologi	<i>B. bassiana</i> 1 x 10 ⁶ cfu/g	Insektisida biologi berbentuk tepung yang dapat disuspensikan	METARIZEP WP
	<i>Metarhizium anisopliae</i> 1 x 10 ⁶ cfu/g	Insektisida biologi berbentuk tepung yang dapat disuspensikan.	ENTOMOBAC WP
	<i>Beauveria bassiana</i> 1 x 10 ⁶ cfu/g <i>M. anisopliae</i> 1 x 10 ⁶ cfu/g	Insektisida biologi berbentuk tepung yang dapat disuspensikan.	ENTOMOBAC WP
	<i>Bacillus thuringiensis</i> 1 x 10 ⁸ cfu/g <i>Serratia</i> 1 x 10 ⁸ cfu/g	Insektisida biologi berbentuk tepung yang dapat disuspensikan	BTPLUS
	<i>B. thuringiensis</i> 1 x 10 ⁶ cfu/g; <i>Serratia</i> sp. 1 x 10 ⁶ cfu/g	Insektisida biologi berbentuk tablet	BT MAX TB

lanjutan

Jenis pestisida	Nama bahan aktif	Deskripsi singkat	Merk dagang
	<i>Bacillus</i> sp. $5,53 \times 10^7$ cfu/ml	Fungisida biologi berbentuk larutan dalam air	PROMASIDA SL
	<i>Geobacillus</i> sp. 1×10^6 cfu/g	Fungisida biologi berbentuk tepung yang dapat disuspensikan	PRIMADECO WP
	<i>Streptomyces</i> sp. 1×10^6 cfu/g	Fungisida biologi berbentuk pekatan yang dapat diemulsikan	PESNAB 4 EC
Fungisida biologi	<i>Trichoderma</i> sp. 1×10^6 cfu/g	Fungisida biologi berbentuk tepung yang dapat disuspensikan	STREPTOMY WP
	<i>T. harzianum</i> 1×10^6 cfu/g	Fungisida biologi berbentuk tepung	FUTRICHOP
	<i>T. koningii</i> 2×10^5 cfu/g	Fungisida biologi berbentuk tepung	SACO-P
	<i>T. koningii</i> 10 g/l	Fungisida biologi berbentuk tepung	

Sumber: pestisida.id (2020).

Lampiran 2. Minyak asiri dari beberapa jenis tanaman yang mempunyai aktivitas sebagai fungisida, bakterisida, herbisida, dan insektisida

Fungisida	Bakterisida	Herbisida	Insektisida
<i>Allium sativum</i> L.	<i>Achillea biebersteinii</i>	<i>Achillea biebersteinii</i>	<i>Abies grandis</i>
<i>Angelica archangelica</i>	<i>Achillea millefolium</i>	<i>Achillea gypsicola</i>	(Douglas ex D.Don)
<i>Angelica glauca</i>	<i>Citrus aurantium</i> L.	<i>Angelica glauca</i>	Lindl.
<i>Artemisia nilagirica</i>	<i>Citrus reticulata</i>	<i>Citrus aurantifolia</i>	<i>Achillea millefolium</i>
<i>Asarum heterotropoides</i>	<i>Cleistocalyx</i>	<i>Citrus x limon</i> L.	L.
<i>Bunium persicum</i> ,	<i>operculatus</i>	<i>Coriandrum sativum</i>	<i>Achillea santolina</i> L.
<i>Cadenera</i> sp.	<i>Cynara scolymus</i>	L.	<i>Acorus calamus</i> L.
<i>Carum carvi</i> L.	(batang)	<i>Eucalyptus</i> sp.	<i>Allium sativum</i> L.
<i>Carum opticum</i> L.	<i>Eriocephalus</i>	<i>Lavandula</i> sp.	<i>Artemisia absinthium</i>
<i>Castagnaro</i> sp.	<i>africanus</i> L.	<i>Origanum acutidens</i>	L.
<i>Cestrum nocturnum</i>	<i>Juglans regia</i> L. (kulit	<i>Origanum vulgare</i> L.	<i>Artemisia sieberi</i>
<i>Cinnamomum</i>	biji)	<i>Peumus boldus</i>	Besser
<i>camphora</i>	<i>Metasequoia</i>	<i>Pinus nigra</i>	<i>Aster indamellus</i>
<i>Cinnamomum cassia</i>	<i>glyptostroboides</i>	<i>Pinus pinea</i>	Grierson
<i>Cinnamomum</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Plectus rugosus</i>	<i>Aster indamellus</i>
<i>zeylanicum</i>	<i>Ocimum ciliatum</i>	<i>Rosmarinus</i>	Grierson
<i>Citrus bergamia</i>	<i>Ocimum ciliatum</i>	<i>officinalis</i>	<i>Azadirachta indica</i> A.
<i>Citrus limon</i>	<i>Origanum</i>	<i>Syzygium</i>	Juss.
<i>Citrus sinensis</i>	<i>heracleoticum</i>	<i>aromaticum</i>	<i>Bifora radians</i> M.
<i>Citrus x limon</i> L.	<i>Origanum</i>	<i>Tagetes erecta</i>	Bieb.
<i>Curcuma longa</i>	<i>heracleoticum</i>	<i>Tanacetum</i>	<i>Bursera graveolens</i>
<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Origanum majorana</i>	<i>aucheranum</i>	(Kunth) Triana &
<i>Cymbopogon</i> sp.	<i>Origanum majorana</i>	<i>Tanacetum</i>	Planch.
<i>Echinophora platyloba</i>	<i>Origanum onites</i>	<i>chiliophyllum</i>	<i>Calamintha umbrosa</i>
<i>Eucalyptus erythrocorys</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Tetraclinis articulata</i>	(M. Bieb.) Fisch. &
<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Piper sarmentosum</i>	<i>Valeriana wallichii</i>	Meyer
<i>Eucalyptus</i> sp.	<i>Salmea scandens</i>		<i>Calamintha umbrosa</i>
<i>Eugenia caryophyllata</i> L.	<i>Satureja hortensis</i>		(M. Bieb.) Fisch. &
<i>Ferula galbaniflua</i>	<i>Satureja spicigera</i>		Meyer
<i>Foeniculum vulgare</i> L.	<i>Solidago canadensis</i>		<i>Cannabis sativa</i> L.
<i>Genista quadriflora</i>	L.		<i>Carum carvi</i> L.
<i>Juniperus polycarpus</i>	<i>Syzygium</i>		<i>Cinnamomum</i>
<i>Lallemantia royleana</i>	<i>aromaticum</i>		<i>camphora</i> (L.) J.
<i>Laurus nobilis</i>	<i>Tanacetum</i>		Presl.
<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>aucheranum</i>		<i>Cinnamomum cassia</i>
<i>Marrubium vulgare</i>	<i>Tanacetum</i>		(Nees & T. Nees) J.
<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>chiliophyllum</i>		Presl.
<i>Melissa officinalis</i>	<i>Thymus fallax</i>		<i>Cinnamomum verum</i>
<i>Mentha pulegium</i>			<i>Cinnamomum</i>

Fungisida	Bakterisida	Herbisida	Insektisida
<i>Mentha spicata</i>	<i>Thymus vulgaris</i>		<i>zeylanicum</i> J. Presl
<i>Mentha</i> spp.	<i>Vetiveria zizanioides</i>		<i>Citrus aurantium</i> L.
<i>Mentha x piperita</i>	<i>Zataria multiflora</i>		<i>Citrus limon</i> (L.)
<i>Metasequoia</i>			Burm.f.
<i>glyptostroboides</i>			<i>Citrus sinensis</i> (L.)
<i>Michelia alba</i>			Osbeck
<i>Mikania scandens</i>			<i>Coriandrum sativum</i>
<i>Myrcia lundiana</i>			L.
<i>Ocimum basilicum</i>			<i>Cuminum cyminum</i>
<i>Origanum</i>			L.
<i>heracleoticum</i>			<i>Cymbopogon citratus</i>
<i>Origanum majorana</i>			(DC. ex Nees) Stapf.
<i>Origanum onites</i> L.			<i>Cymbopogon nardus</i>
<i>Origanum</i> sp.			(L.) Rendle
<i>Origanum vulgare</i> L.			<i>Cymbopogon</i>
<i>Pinus pinea</i>			<i>winterianus</i> Jowitt
<i>Piper chaba</i>			ex Bor
<i>Piper sarmentosum</i>			<i>Cynanchum</i>
<i>Plectranthus rugosus</i>			<i>mongolicum</i>
<i>Pulicaria mauritanica</i>			(Maxim.) Hemsl.
<i>Rosmarinus officinalis</i>			<i>Dracocephalum</i>
<i>Salmea scandens</i>			<i>kotschy</i> Boiss.
<i>Salvia officinalis</i> L.			<i>Drimys winteri</i>
<i>Salvia sclarea</i>			Forster & Forster f.
<i>Santolina</i>			<i>Elettaria</i>
<i>chamaecyparissus</i>			<i>cardamomum</i> (L.)
<i>Satureja hortensis</i> L.			Maton
<i>Schinus mole</i> L.			<i>Erigeron annuus</i> (L.)
<i>Solidago canadensis</i> L.			Pers.
<i>Syzygium aromaticum</i>			<i>Eucalyptus</i>
(L.) Merr. &			<i>camaldulensis</i> Dehn.
L.M.Perry			<i>Eucalyptus citriodora</i>
<i>Syzygium cumini</i>			(Hook.) K.D. Hill &
<i>Tagetes minuta</i> L.			L.A. Johnson
<i>Tetraclinis articulata</i>			<i>Eucalyptus globulus</i>
<i>Thuja plicata</i>			Labill
<i>Thymus capitatus</i>			<i>Eugenia uniflora</i> L.
<i>Thymus</i> sp.			<i>Eupatorium</i>
<i>Thymus vulgaris</i>			<i>adenophorum</i>
<i>Thymus zygii</i>			Spreng.
<i>Valeriana wallichii</i>			<i>Foeniculum vulgare</i>
<i>Vetiveria zizanioides</i>			Mill.
<i>Warionia saharae</i>			<i>Gaultheria</i>
<i>Zanthoxylum</i>			<i>procumbens</i> L.
<i>bungeanum</i>			<i>Hyptis suaveolens</i>

Fungisida	Bakterisida	Herbisida	Insektisida
<i>Zanthoxylum</i>			(L.) Poit.
<i>xanthoxyloides</i>			<i>Hyssopus officinalis</i>
<i>Zingiber officinale</i>			L.
<i>Zingiber officinale</i>			<i>Juniperus communis</i>
Rosc.			L.
<i>Ziziphora clinopodioides</i>			<i>Laurelia sempervirens</i>
			Tul.
			<i>Laurus nobilis</i> L.
			<i>Lavandula</i>
			<i>angustifolia</i> Mill.
			<i>Licaria puchurymajor</i>
			(Mart.) Kosterm.
			<i>Lippia origanoides</i>
			Kunth.
			<i>Majorana hortensis</i>
			L.
			<i>Melaleuca alternifolia</i>
			<i>Melaleuca</i>
			<i>styhelioides</i> Sm.
			<i>Melissa officinalis</i> L.
			<i>Mentha citrata</i> L.
			<i>Mentha piperita</i> L.
			<i>Mentha pulegium</i>
			Mill.
			<i>Mentha</i> spp.
			<i>Micromeria fruticosa</i>
			(L.) Druce
			<i>Nepeta cataria</i> L.
			<i>Ocimum basilicum</i> L.
			<i>Ocimum gratissimum</i>
			L.
			<i>Origanum</i>
			<i>compactum</i> Benth.
			<i>Origanum majorana</i>
			L.
			<i>Origanum</i>
			<i>minutiflorum</i> O.
			Schwarz & P. H.
			Davis
			<i>Origanum syriacum</i>
			var <i>bevanii</i> L.
			<i>Origanum vulgare</i> L.
			<i>Pimpinella anisum</i> L.
			<i>Pimpinella isaurica</i>
			V. A. Matthews

Fungisida	Bakterisida	Herbisida	Insektisida
			<i>Pistacia lentiscus</i> L.
			<i>Pogostemon cablin</i> (Blanco) Benth.
			<i>Pogostemon patchouli</i> (Blanco) Benth.
			<i>Pseudotsuga</i> <i>menziesii</i> (Mirbel) Franco
			<i>Rosmarinus</i> <i>officinalis</i> L.
			<i>Salvia aramiensis</i> Rech.f.
			<i>Salvia officinalis</i> L.
			<i>Salvia sclarea</i> L.
			<i>Salvia tomentosa</i> L.
			<i>Santolina</i> <i>chamaecyparissus</i> L.
			<i>Satureja aintabensis</i> P. H. Davis
			<i>Satureja hortensis</i> L.
			<i>Satureja thymbra</i> L.
			<i>Satureja</i> <i>wiedemanniana</i> (Avé-Lall.) Velen.
			<i>Schinus areira</i> (L.) DC.
			<i>Senecio vernalis</i> Waldst. & Kit.
			<i>Syzygium</i> <i>aromaticum</i>
			<i>Tagetes minuta</i> L.
			<i>Tagetes patula</i> L.
			<i>Tagetes terniflora</i> Kunth
			<i>Tanacetum vulgare</i> L.
			<i>Thuja plicata</i> D. Don
			<i>Thymbra sintenisii</i> Bornm. & Azn.
			<i>Thymbra spicata</i> L.
			<i>Thymus capitatus</i> (L.) Hoffsgg. & Link
			<i>Thymus carmanicus</i> Jalas
			<i>Thymus satureoides</i> Coss.

Fungisida	Bakterisida	Herbisida	Insektisida
			<i>Thymus vulgaris</i> L. <i>Trachyspermum ammi</i> (L.) Sprague ex Turrill <i>Valeriana jatamansi</i> Jones <i>Verbena officinalis</i> L. <i>Zataria multiflora</i> Boiss.

Sumber: Raveau et al. (2020); Isman (2020); Ikkal dan Pavela (2019).

TENTANG PENULIS



Supriadi adalah Professor Riset dan Peneliti Ahli Utama di Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, kemudian pada bulan Agustus 2022 dialihkan ke Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN). Alumni S1 Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, IPB tahun 1982; S2 Fitopatologi, Imperial College, University London tahun 1987; dan S3 Bakteriologi, Wye College, University of London tahun 1994.

Penulis menjadi anggota Komisi Agens Hayati Kementerian Pertanian sejak tahun 2006 sampai sekarang. Selain itu, penulis aktif dalam penelitian biopestisida untuk pengendalian patogen tanaman rempah dan obat serta menjadi editor pada beberapa jurnal ilmiah nasional dan penerbit IAARD Press.



Rohimatun adalah Doktor dan Peneliti di bidang Entomologi Tanaman. Gelar Sarjana Pertanian (S.P) diperoleh penulis pada tahun 2002 dari Universitas Sebelas Maret (UNS). Tahun 2004 penulis kembali melanjutkan S2 di Program Pascasarjana UNS dan memperoleh gelar Magister Pertanian (M.P) pada tahun 2006.

Penulis menyelesaikan program doktor pada Program Studi Entomologi Institut Pertanian Bogor (IPB) pada tahun 2021 melalui beasiswa Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Penulis bekerja di Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro), yang pada saat itu bernama Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik, sejak tahun 2007. Pada bulan Juni 2022, penulis dialihkan ke Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN). Penulis bekerja sebagai peneliti bidang hama dan penyakit tanaman sejak tahun 2011. Penulis tergabung dalam organisasi profesi Perhimpunan Entomologi Indonesia (PEI) dan Perhimpunan Peneliti Indonesia (PPI). Tugas yang pernah diemban penulis, antara lain anggota Redaksi Pelaksana Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (2009 dan 2013) dan Jurnal Penelitian Tanaman Industri (2013-2016).



Miftakhurohmah adalah Doktor dan Peneliti di bidang Fitopatologi Tanaman. Gelar Sarjana Pertanian (S.P) diperoleh penulis pada tahun 2001 dari Universitas Gadjah Mada (UGM). Pada tahun 2013 dan 2021, penulis memperoleh gelar Magister of Science (M.Si) dan doktor dari program studi Fitopatologi, Institut Pertanian Bogor (IPB).

Penulis bekerja di Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro), sejak tahun 2002, kemudian pada Juni 2022 dialihkan ke Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN). Beberapa artikel penulis telah terbit di jurnal ilmiah terindeks global bereputasi, yaitu di Australasian Plant Pathology dan Current Science. Selain melakukan penelitian dan publikasi, penulis menjadi mitra bestari di Jurnal Fitopatologi Indonesia dan Journal of Tropical Plant Pests and Disease. Penulis tergabung dalam organisasi profesi Perhimpunan Fitopatologi Indonesia (PFI) dan Perhimpunan Peneliti Indonesia (PPI).

TENTANG PENYUNTING



Antarjo Dikin adalah Doktor Plant Pathology lulusan tahun 2007 dari University Putra Malaysia. Fokus risetnya adalah pengembangan biopestisida untuk pengendalian patogen terbawa benih kelapa sawit. Sebagai seorang ahli fitopatologi; bidang yang lebih disenangi adalah deteksi patogen tular benih.

Sudah bekerja selama 39 tahun di Badan Karantina Pertanian dan posisi terkini sebagai Analis Perkarantina Tumbuhan Ahli Utama. Sebagai anggota Komisi Agens Hayati Kementerian Pertanian sejak tahun 2006 sampai sekarang. Pernah mengikuti kursus khusus *seed pathology* selama dua tahun di Copenhagen. Kepakarannya sebagai ahli patogen tular benih dikembangkan dalam implementasi untuk tindakan pemeriksaan karantina tumbuhan pada berbagai laboratorium karantina tumbuhan di Indonesia. Aktif sebagai anggota Perhimpunan Fitopatologi Indonesia sejak tahun 1989 dan kegiatan ilmiah bidang fitopatologi dan mikrobiologi di Malaysia tahun 2001-2007. Sebagai akademisi, aktif memberikan kuliah umum, dosen tamu, pembimbing mahasiswa, penguji eksternal S1 dan S3 pada perguruan tinggi negeri di Indonesia. Pada saat ini menjadi Promotor Mahasiswa Program Doktor di Ghent University, Belgia. Sebagai anggota dalam penyusunan protokol *International Standard for Phytosanitary Measures, International Plant Protection Convention (IPPC)*, FAO pada tahun 2010-2019. Menjabat sebagai

Kepala Balai Uji Terap Teknik dan Metode Karantina Pertanian tahun 2010-2012, Kepala Pusat Karantina Tumbuhan dan Keamanan Hayati Nabati tahun 2013-2019, serta Sekretaris Direktorat Jenderal Perkebunan tahun 2019-2021. Aktif pada kegiatan internasional pada pertemuan WTO *Sanitary and Phytosanitary* (SPS), perundingan bilateral dan regional, serta pertemuan *Comprehensive Economic Partnership Agreement* sejak tahun 2009 sampai dengan sekarang.

INDEKS

- A. salina*, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46
- Administrator, 124
- Amplifikasi DNA, 70, 71, 72
- analisis regresi probit, 44
- Analisis Sikuen, 74
- Artemia salina*, 36, 38, 90, 97, 101
- B. thuringiensis*, 4, 5, 11
- Bacillus*, 4, 11, 18, 55, 61, 63, 64, 89, 94, 105, 106
- Bacillus thuringiensis*, 11
- Baculovirus, 12
- Beauveria*, 9, 18, 105
- Beauveria bassiana*, 9
- Bentuk Sel, 61
- Bentuk Spora, 64
- bioinsektisida, 33
- biopestisida, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 25, 26, 29, 31, 33, 38, 49, 51, 52, 55, 60, 61, 64, 105, 113
- Biopestisida dari bakteri, 9, 11
- Biopestisida dari virus, 12
- Brine Shrimp Lethality Assay, 38
- BSLA, 38, 39, 42, 45, 46
- Canadian Environmental Protection Act, 17
- Data keamanan, 18
- delay of emergence, 24
- delay or acceleration in reaching growth stages, 24
- efikasi dan keamanan, 6
- EFSA, 17, 18, 49, 50, 51, 88
- eksotoksin, 11
- ELISA, 52
- entomo pathogenic nematodes, 10
- Environmental Protection Agency, 17
- Enzim polymerase, 72
- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 52
- EPA, 3, 17, 37, 47, 88, 89
- European Food Safety Authority, 17
- filogeni, 75
- filosfir, 55

fitotoksik, 9, 23
 fitotoksisitas, 6, 23, 24, 25, 26, 27
 Fitotoksisitas, 23, 103
 Food and Agriculture Organization, 16, 89
 fungisida biologi, 4
 Fungisida biologi, 106
 GenBank, 74
 Grading, 79
 hemolisis, 19, 20
 Heterorhabditis, 10
 HR, 21
 IARC, 16
 Identifikasi sifat-sifat morfologi dan fisiologis, 61
 Identitas agens hayati mikrob, 55
 Indeks toksisitas Meyer dan Clarkson, 44
 inhibitions or stimulations, 24
 insektisida biologi, 4
 Insektisida biologi, 105
 International Agency for Research on Cancer, 16
 Isaria fumosorosea, 9
 isolasi DNA, 67, 68, 69, 70
 Isolasi Mikrob dari Rizosfir, 57
 Isolasi Mikrob dari Serangga, 58
 Isolasi Mikrob Endofit, 57
 Isolasi Mikrob Potensial, 55
 ITS primer, 71
 jurnal ilmiah, 122, 123, 124
 karakterisasi secara molekuler, 67
 karakteristik biologi, 6
 karakteristik formulasi, 5
 Kategori penilaian keamanan pestisida, 31, 35, 36
 keamanan biopestisida, 6, 15, 16, 17
 kejelasan identitas agens hayati, 5
 Kelarutan dalam Larutan KOH, 63
 Klasifikasi toksisitas pestisida terhadap udang galah, 38
 medium agar darah, 19, 20
 Mendeley, 19
 Metarhizium anisopliae, 9
 Metode CTAB, 70
 metode pengujian perendaman benih, 25
 Mikoinsektisida, 9
 Minimum Inhibitory Concentration, 49
 minyak asiri, 24, 78, 80
 Minyak asiri, 107
 minyak atsiri, 7
 modifications in colour, necrosis, deformation, 25

nematoda entomopatogen,
 10
 Nematoda patogen
 serangga, 9, 10
 NPV, 12, 13, 14, 89, 99
 Nucleo polyhedra virus, 12
 OECD, 5
 OJS, 124
 OPT, 7
 Organization for Economis
 Co-operatioan and
 Development, 5
 PCR, 67, 70, 71, 72, 73, 74, 95
 Pelabelan, 80
 Pemasukan Agens Hayati,
 15, 16, 95
 Pembuangan lipid dan
 protein, 69
 Pencucian DNA, 70
 Pengeluaran DNA dari sel
 jaringan, 69
 pengemasan, 77, 79
 pengeringan, 77, 78, 79, 80,
 82
 Pengeringan pelet DNA, 70
 Pengkelasan, 79
 Pengujian aktivitas enzim
 katalase, 27
 Pengujian aktivitas enzim
 peroksidase, 27
 pengujian pengolesan, 25
 Pengujian superoksidase
 dismutase, 28
 Penilaian risiko, 19
 penjualan biopestisida, 4
 penyiapan simplisia, 77
 Penyimpanan, 60, 80
 Penyimpanan Kultur
 Bakteri, 60
 Penyucian dan Penirisan, 77
 Perajangan, 78
 persyaratan mutu dan
 keamanan, 15
 pestisida nabati, 7, 8, 9
 Pestisida nabati, 7
 plant-incorporated
 protectants, 3
 Polymerase chain reaction,
 70
 Presipitasi DNA, 69
 primer forward, 71, 72
 primer reverse, 71, 72
 primer universal, 71
 Primer universal cendawan,
 71
 produk biopestisida, 4, 5
 Produksi Pigmen Fluoresen,
 66
 Resistensi bakteri terhadap
 antibiotik, 50
 Resistensi terhadap
 Antibiotik, 49
 respons fisiologi, 7
 respons tingkah laku, 7
 Review, 124
 rizosfir, 55
 rodentisida biologis, 4
 Sifat Gram, 61

Sikuensing, 74
Skin Prick/Puncture Testing, 51
Sortasi, 77, 79
Steinernema, 10
sumber pestisida nabati, 7
Tes Reaksi Alergi metode Penetapan Imunosorben Tertaut Enzim, 52
Tes Reaksi Alergi Metode Tusuk Kulit, 52
Tes Tusuk Kulit, 51
The PlantList, 8
The World Flora Online, 8
thinning, 24
Toksistas ekstrak bahan pestisida nabati, 43
Toksistas pada larva udang dan tikus, 45
Uji hipersensitivitas, 21
Uji keamanan hayati organisme nontarget, 29
Uji Oksidasi dan Fermentasi, 64
Uji toksistas ikan, 37
Uji Toksistas Ikan dan Udang, 36
Uji Toksistas terhadap Musuh Alami, 29
Uji toksistas udang air asin, 38
Xenorhabdus, 10