



UNIVERSITAS INDONESIA

PEMBUATAN DAN PENGUJIAN FORMULA *Metarhizium majus* UICC 295 DENGAN MEDIA PEMBAWA SUBSTRAT BERAS (*Oryza sativa*) TERHADAP LARVA *Oryctes rhinoceros*

SKRIPSI

**BAMA HERDIANA GUSMARA
0706263712**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JULI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

PEMBUATAN DAN PENGUJIAN FORMULA *Metarhizium majus* UICC 295 DENGAN MEDIA PEMBAWA SUBSTRAT BERAS (*Oryza sativa*) TERHADAP LARVA *Oryctes rhinoceros*

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**BAMA HERDIANA GUSMARA
0706263712**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JULI 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Bama Herdiana Gusmara

NPM : 0706263712

Tanda tangan : 

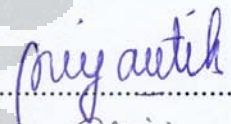
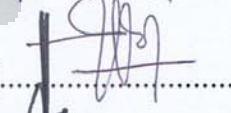
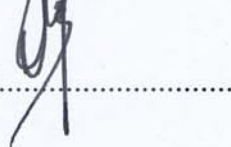
Tanggal : 14 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Bama Herdiana Gusmara
NPM : 0706263712
Program Studi : S1 Biologi
Judul Skripsi : Pembuatan dan Pengujian Formula *Metarhizium*
majus UICC 295 dengan Media Pembawa Substrat
Beras (*Oryza sativa*) terhadap Larva *Oryctes*
rhinoceros

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi S1 Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Ariyanti Oetari, Ph.D. (.....) 
Penguji I : Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D. (.....) 
Penguji II : Dr. Adi Basukriadi, M.Sc. (.....) 

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 14 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala anurrah, rahmat, dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian hingga akhir penulisan skripsi. Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ariyanti Oetari, Ph.D. selaku pembimbing atas bimbingan, motivasi, perhatian dan kesabaran, serta sumbangan pikiran selama penelitian hingga tersusunnya skripsi.
2. *University of Indonesia Culture Collection (UICC)* atas nama Ibu Ariyanti Oetari Ph. D. yang telah membiayai penelitian ini.
3. Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D. dan Dr. Adi Basukriadi atas saran dan masukan yang diberikan.
4. Bapak Dr. rer. nat. Mufti Petala Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi dan Ibu Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen Biologi FMIPA UI atas perhatian dan dukungannya.
5. Bapak Dr. Wibowo Mangunwardoyo yang telah memberikan saran-saran dan bimbingan kepada penulis.
6. Ibu Retno Lestari, M.Si. selaku Penasihat Akademik atas nasehat, perhatian dan dukungannya.
7. Seluruh staf pengajar Departemen Biologi FMIPA UI atas bekal ilmu yang penulis terima.
8. Pak Pri, Mbak Asri, dan seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA UI atas semua bantuan yang diberikan.
9. Kedua orang tuaku Herry Gusmara dan Uswatun Hasanah atas kasih sayang, doa, pengertian, pengorbanan, serta dukungan moril dan materil yang selalu diberikan hingga skripsi ini dapat diselesaikan.
10. Saudara-saudaraku tersayang, Angga Dwi Putra, Mayang Putri, Fadli Ahmad, dan Ibnu el Jabar atas doa, dukungan, dan semangat serta kebersamaan yang selalu menjadi motivasi bagi penulis.

11. Rekan kerjaku, Doni Alvian dan Galuh Purnamasari yang selalu bersama dalam suka maupun duka selama masa penelitian dan penulisan skripsi ini.
12. Kucogan (Akram, Bregas, Faiz, Hasan, Shafar, Nesti), Diana Novia, Estri, Mora, Ine, Karno, Putmal, Qiqi, Wawa, Febrial atas perhatian, pertemanan dan kenangan indah selama penulis menjalani kehidupan di Biologi.
13. Teman-teman di Laboratorium Mikrobiologi, Eja, Ken, Kirana, Ka Dafina, Ka Novia, Irvan, Mbak Dahlia, Mbak Reno, Niar, Rendi J., Rendi P., Wahab, CANON (Chir, Grand, Rere, Okta, Odit) yang telah banyak membantu dan memberi masukan dalam menyelesaikan penelitian. Teman-teman Biologi khususnya BLOSSOM (*Biological Science Community '07*) atas pertemanan yang tak akan terlupakan.
14. Teman-teman wisma Rizqullah (Eka, Naufal, Yose, Tri “Kucel” Setiawan, Hamka, Yudi, Ekos, Rindo, Ekope, Putu, Mas Lukman) atas tawa dan kebersamaan.
15. Semua pihak yang telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi.

Akhir kata, penulis berharap agar skripsi ini dapat berguna dan bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Penulis

2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Bama Herdiana
NPM : 0706263712
Program Studi : S1
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Pembuatan dan Pengujian Formula *Metarhizium majus* UICC 295 dengan Media Pembawa Substrat Beras (*Oryza sativa*) terhadap *Oryctes rhinoceros*

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 14 Juli 2011

Yang menyatakan



(Bama Herdiana Gusmara)

ABSTRAK

Nama : Bama Herdiana Gusmara
Program Studi : Biologi
Judul : Pembuatan dan Pengujian Formula *Metarhizium majus* UICC 295 dengan Media Pembawa Substrat Beras (*Oryza sativa*) terhadap Larva *Oryctes rhinoceros*

Metarhizium majus UICC 295 adalah kapang entomopatogen. Penelitian bertujuan membuat dan menguji formula *M. majus* UICC 295 dengan substrat beras (*Oryza sativa*) terhadap larva *Oryctes rhinoceros*, serta mengetahui viabilitas konidia/hifa di dalam formula selama penyimpanan 30 hari pada suhu ruang dan 4° C. Formula dibuat dengan menginokulasikan *M. majus* UICC 295 10% (berat/berat) pada beras. Aplikasi kontak langsung *M. majus* UICC 295 dengan jumlah konidia/hifa $(0,69--1,63) \times 10^6$ CFU/ml menyebabkan kematian larva 100% dalam 9--13 hari. Pengujian formula dengan jumlah konidia/hifa $(0,82--1,7) \times 10^6$ CFU/ml menyebabkan kematian larva 100% dalam 7--11 hari. Penyimpanan formula selama 30 hari pada suhu 27° C dan 4° C menyebabkan penurunan persentase viabilitas konidia berturut-turut sebesar 93,85% dan 90,95%.

Kata kunci:

beras, entomopatogen, formula, *Metarhizium majus* UICC 295, *Oryctes rhinoceros*, viabilitas.

ABSTRACT

Name : Bama Herdiana Gusmara
Study Program : Biology
Title : Formulation of *Metarhizium majus* UICC 295 using rice (*Oryza sativa*) as a Carrier and Its Application on *Oryctes rhinoceros* Larvae

Metarhizium majus UICC 295 is an entomopathogenic fungus. This research investigated the use of rice (*Oryza sativa*) for formulation of *M. majus* UICC 295, formula application on *Oryctes rhinoceros* larvae, the effect of temperature and time of storage on viability of conidia/hyphae in the formula. Formulation was carried out by inoculation of 10% (w/w) fungal biomass into rice. Application of direct contact of conidia/hyphal suspension $(0.69\text{--}1.63)\times 10^6$ cfu/ml caused 100 % larval mortality in 9--13 days. Application of the formula containing conidia/hyphal suspension $(0.82\text{--}1.7)\times 10^6$ cfu/ml caused 100% larval mortality in 7--11 days. The conidia/hyphae viability in the formula was decreased 93.85% and 90.95% after storage for 30 days at 27° C and 4° C, respectively.

Kata kunci:

rice, entomopathogenic fungus, formula, *Metarhizium majus* UICC 295, *Oryctes rhinoceros*, viability.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
1. PENDAHULUAN.....	1
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Kapang Entomopatogen.....	6
2.2 Kumbang Badak (<i>Oryctes rhinoceros</i>).....	9
2.3 Pengendalian Hama <i>Oryctes rhinoceros</i>	10
2.4 Aplikasi Kapang Terhadap Serangga.....	11
2.5 Mekanisme Infeksi Kapang Pada Serangga.....	13
2.6 Pembuatan Formula.....	14
2.7 Beras Sebagai Media Pembawa.....	16
2.8 Pengaruh Kondisi Lingkungan Terhadap Pertumbuhan Kapang... ..	17
3. METODOLOGI PENELITIAN.....	19
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	19
3.2 Alat dan Bahan.....	19
3.2.1 Alat.....	19
3.2.2 Bahan.....	20
3.2.2.1 Mikroorganisme.....	20
3.2.2.2 Larva <i>O. rhinoceros</i> dan pakan larva.....	20
3.2.2.3 Bahan pembawa.....	20
3.2.2.4 Medium.....	20
3.2.2.5 Bahan kimia.....	20
3.2.2.6 Bahan habis pakai.....	21
3.3 Cara Kerja.....	21
3.3.1 Pembuatan medium <i>Saboraud Dextrose Yeast Extract Agar</i> (SDYA) dan <i>Saboraud Dextrose Yeast Extract Broth</i> (SDYB).....	21
3.3.2 Pemurnian <i>M. majus</i> UICC 295.....	22
3.3.3 Pembuatan <i>stock culture</i> dan <i>working culture</i>	22
3.3.4 Pengamatan Morfologi <i>M. majus</i> UICC 295 secara makroskopik dan mikroskopik.....	22
3.3.5 Penghitungan jumlah konidia/hifa kapang dengan metode <i>Total Plate Count</i> (TPC).....	23

3.3.6	Pengelompokan larva <i>O. rhinoceros</i>	24
3.3.7	Pemeliharaan larva <i>O. rhinoceros</i>	24
3.3.8	Pembuatan larutan triton X-100 0,05% steril.....	24
3.3.9	Pengujian kemampuan membunuh <i>M. majus</i> UICC 295 pada larva <i>O. rhinoceros</i> dengan metode kontak langsung.....	25
3.3.10	Perbanyakkan biomassa <i>M. majus</i> UICC 295 dengan metode fermentasi diam.....	25
3.3.11	Pembuatan inkubator sederhana dan loyang untuk pengeringan produk formula.....	26
3.3.12	Penyiapan media pembawa berupa substrat beras.....	27
3.3.13	Inokulasi biomassa <i>M. majus</i> UICC pada beras.....	27
3.3.14	Pengeringan dan penghalusan formula.....	28
3.3.15	Penghitungan jumlah sel kapang pada formula dengan metode <i>Total Plate Count</i> (TPC).....	28
3.3.16	Pengujian formula <i>M. majus</i> UICC 295 terhadap larva <i>O. rhinoceros</i> dengan kontak langsung.....	29
3.3.17	Penyimpanan formula selama 30 hari dan penghitungan viabilitas setelah penyimpanan.....	29
3.3.18	Pengolahan dan analisis data.....	30
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1	Pengamatan Morfologi <i>M. majus</i> UICC 295.....	32
4.2	Pengujian Suspensi Konidia <i>M. majus</i> UICC 295 Terhadap Larva <i>O. rhinoceros</i>	35
4.3	Formula <i>M. majus</i> UICC 295 dengan Bahan Pembawa Beras.....	39
4.4	Pengujian Formula <i>M. majus</i> UICC 295 pada Larva <i>O. rhinoceros</i>	40
4.5	Pengujian Viabilitas <i>M. majus</i> UICC 295.....	44
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	50
5.1	Kesimpulan.....	50
5.2	Saran.....	50
	DAFTAR REFERENSI	51

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Hasil pengamatan morfologi secara makroskopik koloni <i>M. majus</i> UICC 295 umur 22 hari di medium SDYA suhu inkubasi 27° C.....	32
Tabel 4.2	Hasil pengukuran panjang dan lebar konidia <i>M. majus</i> UICC 295	34
Tabel 4.3.	Hasil pengukuran lebar hifa <i>M. majus</i> UICC 295.....	34
Tabel 4.4.	Hasil enumerasi <i>M. majus</i> UICC 295 berumur 15 hari suhu inkubasi 27° C di medium SDYA	35
Tabel 4.5.	Data populasi larva perlakuan yang mengalami penurunan berat setelah setelah pengujian dengan suspensi konidia/hifa selama 18 hari pengamatan.....	38
Tabel 4.9	Hasil enumerasi konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada formula setelah pengeringan selama 5 hari dengan suhu 30° C.....	40
Tabel 4.12.	Data populasi larva perlakuan yang mengalami penurunan berat setelah inokulasi formula selama 18 hari pengamatan	42
Tabel 4.15.	Hasil enumerasi konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada formula dengan bahan pembawa beras sebelum pengeringan.....	45
Tabel 4.17.	Hasil enumerasi konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada formula setelah disimpan selama 30 hari inkubasi 27° C	45
Tabel 4.18.	Hasil enumerasi konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada formula setelah disimpan selama 30 hari inkubasi 4° C	47
Tabel 4.19.	Jumlah konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada formula setelah penyimpanan selama 30 hari.....	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1.	Gejala serangan kumbang badak di kampus UI,Depok pada tanggal 2 Maret 2011.....	1
Gambar 2.2.	Larva <i>O. rhinoceros</i>	10
Gambar 2.3.	Larva yang terinfeksi <i>M. majus</i>	13
Gambar 3.1.	Inkubator sederhana yang digunakan untuk pengeringan formula.....	27
Gambar 4.1.	Morfologi <i>M. majus</i> UICC 295 berumur 22 hari suhu inkubasi 27° C pada medium SDYA	33
Gambar 4.2.	Pengamatan morfologi secara mikroskopik <i>M. majus</i> UICC 295 berumur 22 hari suhu inkubasi 27° C pada medium SDYA	33
Gambar 4.3.	Gejala melanisasi dan larva mati terinfeksi <i>M. majus</i> UICC 295.....	36
Gambar 4.4.	Grafik kematian larva perlakuan menggunakan aplikasi suspensi konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 selama 18 hari pengamatan	37
Gambar 4.5	Grafik perbandingan berat larva kontrol dan perlakuan rata-rata selama 18 hari pengamatan.....	38
Gambar 4.6.	Biomassa <i>M. majus</i> UICC 295 umur 15 hari suhu inkubasi 27° C dan hasil formula <i>M. majus</i> UICC 295 pada substrat beras.....	39
Gambar 4.7.	Grafik kematian larva perlakuan selama 18 hari pengamatan menggunakan fomula <i>M. majus</i> UICC 295.....	41
Gambar 4.8.	Grafik perbandingan berat larva kontrol dan perlakuan rata-rata selama 18 hari pengamatan	42
Gambar 4.9	Grafik perbandingan persentase kematian larva menggunakan aplikasi suspensi konidia/hifa dan menggunakan formula	43

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Skema kerja penelitian.....	57
Lampiran 2.	Pengamatan morfologi <i>M. majus</i> UICC 295	58
Lampiran 3.	Skema kerja enumerasi formula	58
Lampiran 4.	Skema kerja pembuatan formula kapang <i>M. majus</i> UICC 295 pada substrat beras	59
Lampiran 5.	Skema kerja aplikasi kontak langsung	59
Lampiran 6.	Jumlah larva yang mati, kelembaban relatif, dan suhu ruang selama 18 hari pengamatan	60
Lampiran 7.	Penimbangan berat larva yang masih hidup setelah aplikasi selama 18 hari pengamatan	61
Lampiran 8.	Jumlah larva yang mati, kelembaban relatif, dan suhu ruang selama 18 hari pengamatan.....	62
Lampiran 9.	Penimbangan berat larva yang masih hidup setelah aplikasi selama 18 hari pengamatan.....	63

BAB 1 PENDAHULUAN

Oryctes rhinoceros Linnaeus atau dikenal sebagai kumbang badak merupakan hama utama yang menyerang perkebunan kelapa (*Cocos nucifera* Linnaeus) di sebagian besar belahan dunia, terutama di kawasan Asia Selatan (Okaraonye dan Ikewuchi 2009: 35). Kerusakan yang diakibatkan hama tersebut ditandai dengan guntingan berbentuk segitiga pada daun (Gambar 1.1) (Mawikere *dkk.* 1989: 20). Apabila titik tumbuh yang terserang, maka pohon kelapa akan mati karena tidak dapat menghasilkan daun (Departemen Pertanian 1993: 4).



Gambar 1.1 Gejala serangan kumbang badak di kampus UI, Depok pada tanggal 2 Maret 2011
[Sumber: Dokumentasi pribadi]

Upaya pengendalian *Oryctes rhinoceros* dapat dilakukan secara mekanis, kimiawi dan biologis. Upaya pengendalian secara mekanis yaitu dengan membunuh kumbang, larva, dan telur pada tempat perkembangbiakannya (Rumini 1992: 38). Upaya pengendalian secara kimiawi yaitu menggunakan pestisida kimia berupa insektisida sintetis (Ruskandi dan Setiawan 2004: 70). Upaya pengendalian secara biologis dilakukan menggunakan musuh alami, baik predator maupun parasit (Baringbing 1994: 19). Insektisida sintetis termasuk salah satu faktor yang dapat membahayakan keselamatan hayati, termasuk manusia dan keseimbangan ekosistem. Residu

insektisida sintetik dapat terakumulasi pada produk pertanian dan menimbulkan dampak membahayakan bagi kesehatan (Suwahyono 2010: 22). Beberapa contoh insektisida sintetik adalah DDT, Heptaklor, BHC, Aldrien, Endrin, dan Klordane. Insektisida sintetik tersebut sangat berbahaya karena dapat menyebabkan kematian pada manusia dan hewan serta memiliki sifat yang tidak dapat diuraikan secara hayati (Sembel 2010: 20). Pengendalian hama menggunakan musuh alami adalah upaya pengendalian hama secara biologis dengan tujuan untuk mengurangi penggunaan insektisida sintetik (Desyanti *dkk.* 2007: 68).

Penggunaan musuh alami hama serangga dikenal dengan penggunaan bioinsektisida yang meliputi bakteri, virus, kapang, protozoa, tanaman, dan hewan (Suwahyono 2010: 8). Salah satu bioinsektisida yang sering diteliti dan dikembangkan adalah kapang entomopatogen. Hal tersebut disebabkan kemampuan kapang entomopatogen yang dapat menyebabkan penyakit dan kematian pada serangga (Shah 2003: 413). Beberapa spesies kapang entomopatogen berasal dari genus *Beauveria* (*B. bassiana* (Bals.) Vuill), *Metarhizium* (*M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin), *Paecilomyces* (*P. fumoserosus* Apopka), dan *Verticillium* (*V. lecanii* (Zimmerman) Viegas) (Hajek *dkk.* 2001: 309).

Salah satu kapang yang digunakan sebagai bioinsektisida adalah *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Kapang tersebut memiliki kemampuan infeksi yang sangat luas pada berbagai jenis serangga dan sangat penting dalam mengontrol populasi serangga di alam. Pemanfaatan *M. anisopliae* dilaporkan telah dilakukan secara luas di beberapa negara seperti Italia, Kanada, Tasmania, Swis, dan beberapa negara lainnya (Rodrigues *dkk.* 2005: 185). Berdasarkan Samuel (1998: 230 dan 234), *M. anisopliae* menghasilkan destruksin dalam bentuk destruksin A, B, C, dan desmetildestruksin B. Destruksin merupakan senyawa toksin neuromuskular yang dapat menyebabkan depolarisasi membran otot serangga dengan mempengaruhi transpor ion Ca^{2+} sehingga menyebabkan kelumpuhan otot serangga tersebut.

Aplikasi konidia kapang ke tubuh serangga dapat dilakukan dengan aplikasi kontak langsung (Baringbing 1991: 61). Aplikasi kontak langsung dilakukan dengan cara penyemprotan langsung cairan suspensi konidia kapang

pada bagian-bagian tubuh hama serangga target (Hosang *dkk.* 2008: 186). Penularan *M. anisopliae* dengan metode tersebut efektif dilakukan saat *O. rhinoceros* masih berada pada stadium larva (Departemen Pertanian 1993: 10—11). Hasil percobaan menunjukkan larva instar-3 yang diujikan mengalami mortalitas 100% dari seluruh 400 larva yang mendapat perlakuan hanya dalam waktu 10 hari (Baringbing 1991: 60).

Untuk mempermudah aplikasi di lapangan, biomassa kapang dapat dibuat menjadi produk formula. Pembuatan formula bertujuan untuk mendapatkan produk yang efektif, murah, mudah dibawa dan diaplikasikan di lapangan, dan dapat disimpan dalam jangka waktu lama (Suwahyono 2010: 69). Berdasarkan Direktorat Jenderal Perkebunan (2008: 5), formula dapat disimpan selama 1—2 tahun dalam suhu kamar atau 2—3 tahun di dalam lemari pendingin dengan suhu 5—10° C.

Proses pembuatan formula diawali dengan proses penumbuhan biakan kapang dalam medium cair, selanjutnya produksi biomassa dalam media padat yang diinginkan, dan proses terakhir adalah pengeringan (Suwahyono 2010: 73--77). Media padat dalam perbanyakannya biomassa spora kapang dapat berupa jagung pecah giling, beras, dan kedelai (Direktorat Jenderal Perkebunan 2008: 4). Ihsan dan Octriana (2009: 64) melaporkan bahwa, kapang entomopatogen *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill dengan media padat substrat beras pada media campuran pasir dapat diaplikasikan untuk mengendalikan hama lalat buah (*Bactrocera dorsalis* Hend.) di lapangan. Aplikasi *B. bassiana* terhadap hama lalat buah menghasilkan kematian lalat buah stadium pupa hingga 42,13%.

Viabilitas adalah kemampuan sel untuk dapat tumbuh dan hidup. Pengujian viabilitas perlu dilakukan untuk mengetahui efektivitas suatu teknik penyimpanan. Viabilitas dapat dipengaruhi oleh keberadaan gula pada substrat. Substrat dengan kadar gula yang tinggi dapat menjaga viabilitas kapang entomopatogen serta dapat meningkatkan pertumbuhan spora dari kapang entomopatogen (Prayogo *dkk.* 2005: 22).

Beras mengandung berbagai nutrisi seperti karbohidrat, protein, lipid, asam nukleat, vitamin dan mineral. Beras mengandung 75 persen hingga 90 persen karbohidrat. Melalui proses pemanasan dengan cara perebusan di dalam

air, karbohidrat tersebut akan dipecah menjadi senyawa sederhana berupa glukosa dan amilopektin. Proses perebusan juga menyebabkan terserapnya air sehingga struktur beras menjadi lebih lembut (Frei dan Becker 2004: 6 & 8).

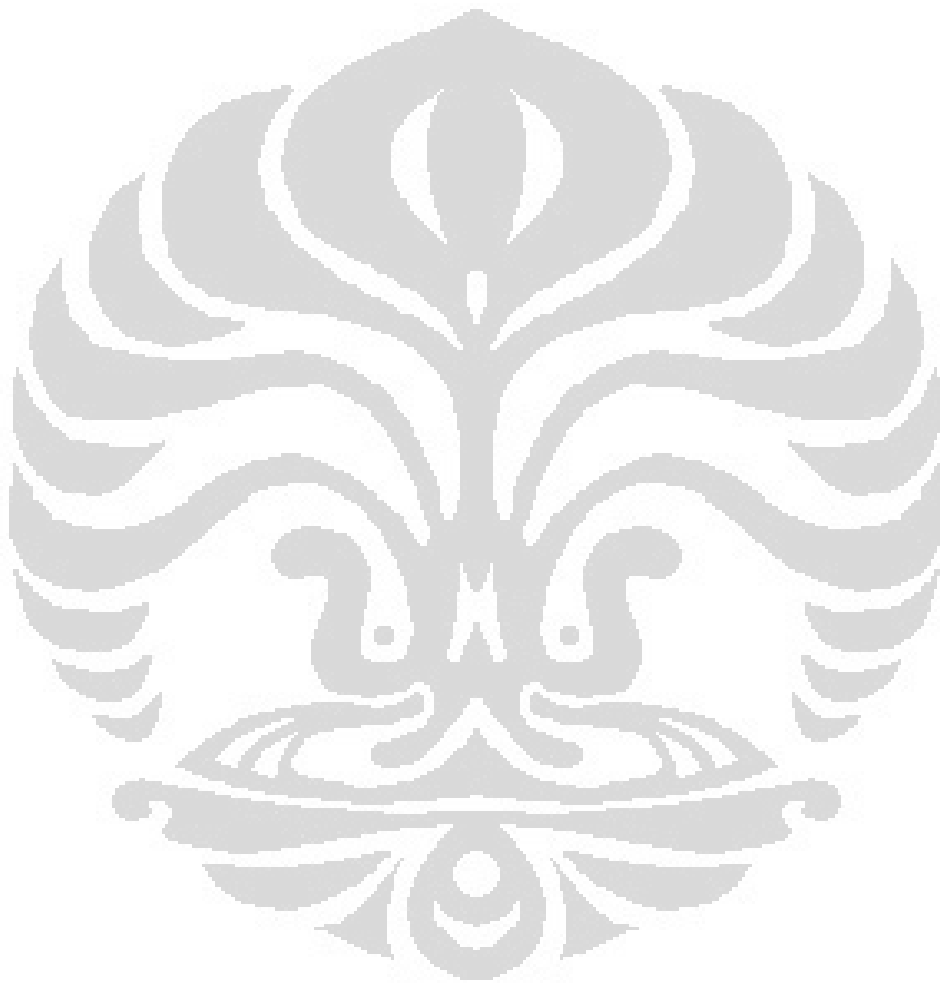
Pada pra-penelitian telah dilakukan pengujian kemampuan *Metarhizium majus* UICC 295 terhadap larva *Oryctes rhinoceros* dengan menginokulasi spora sejumlah 10^2 cfu/ml. Jumlah spora 10^2 cfu/ml belum mampu membunuh larva yang diujikan selama 30 hari pengamatan. Oleh sebab itu, pada penelitian ini digunakan jumlah spora yang lebih banyak dibandingkan pada pra-penelitian dengan tujuan meningkatkan virulensi kapang terhadap larva. Berdasarkan Putra (2009: 68), aplikasi secara kontak langsung *M. majus* UICC 295 terhadap *O. rhinoceros* dengan jumlah spora 10^6 cfu/ml mampu membunuh seluruh larva *O. rhinoceros* dalam waktu 12 hari.

University of Indonesia Culture Collection (UICC) memiliki *Metarhizium majus* UICC 295 yang diisolasi dari *Oryctes rhinoceros* mati. Abdullah (2009: 49—51) melaporkan bahwa metode aplikasi pakan *M. majus* UICC 295 terhadap *O. rhinoceros* dengan jumlah spora 10^6 cfu/ml telah mampu membunuh 100% larva *O. rhinoceros* yang diujikan dalam waktu 14 hari. Namun demikian, penelitian mengenai pembuatan formula *M. majus* UICC 295 dengan menggunakan substrat berupa beras belum dilakukan. Kemampuan kapang *M. majus* UICC 295 dengan metode kontak langsung menggunakan media padat berupa beras dalam membunuh larva *O. rhinoceros* belum diketahui. Selain itu, belum diketahui viabilitas *M. majus* UICC 295 dengan substrat berupa beras ketika disimpan selama 30 hari pada suhu 4° C dan suhu 27° C .

Hipotesis penelitian adalah beras dapat digunakan sebagai substrat yang mampu mempertahankan kemampuan *M. majus* UICC 295 dalam membunuh larva *Oryctes rhinoceros*. Penyimpanan formula selama 30 hari pada suhu 4° C dan suhu 27° C mempengaruhi viabilitas kapang *M.majus* UICC 295.

Tujuan dari penelitian adalah untuk menghasilkan teknik pembuatan formula *M. majus* UICC 295 dengan substrat berupa beras. Kemampuan formula *M. majus* UICC 295 dengan substrat berupa beras dalam membunuh larva *O. rhinoceros* ingin diketahui. Selain itu, ingin diketahui viabilitas formula *M. majus* UICC 295 yang telah disimpan selama 30 hari pada suhu 4° C dan suhu 27° C.

Melalui penelitian ini diharapkan dapat diperoleh suatu bioinsektisida alternatif untuk mengendalikan hama *O. rhinoceros* di lapangan yang bersifat ramah lingkungan. Di samping itu, hasil penelitian diharapkan dapat dijadikan landasan pemanfaatan *M. majus* UICC 295 menjadi suatu formula untuk diaplikasikan di perkebunan kelapa dan dapat diproduksi dalam skala industri.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 KAPANG ENTOMOPATOGEN

Fungi adalah mikroorganisme tidak berklorofil, berbentuk hifa atau sel tunggal, tidak aktif bergerak (*nonmotile*), eukariotik, ber dinding sel dari kitin atau selulosa, serta mampu bereproduksi secara seksual dan aseksual dengan membentuk spora. Fungi merupakan organisme kemoheterotrof yang memperoleh energi dengan jalan mensintesis karbon yang berasal dari materi organik di lingkungan (Carlile dan Watkinson 1995: 4). Untuk memperoleh materi organik fungi dilengkapi miselium yang berfungsi sebagai alat absorpsi nutrisi dan air (Ingold 1984: 16).

Fungi dikelompokkan menjadi tiga berdasarkan morfologi, yaitu khamir (*yeast*), kapang (*mold*), dan cendawan (*mushroom*) (Madigan *dkk.* 2009: 535). Fungi terbagi menjadi 5 filum berdasarkan sistem 7 kingdom yaitu, *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*, dan *Glomeromycota*. Kingdom *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, dan *Glomeromycota* tergolong dalam fungi tingkat rendah sedangkan kingdom *Ascomycota* dan *Basidiomycota* tergolong dalam fungi tingkat tinggi. Fungi tingkat tinggi memiliki hifa sejati yang bersekat atau monositik, sedangkan pada fungi tingkat rendah tidak ditemukan hifa yang bersekat atau senositik (Carlile *dkk.* 2001: 13--14).

Kapang bereproduksi secara aseksual dengan menghasilkan arthrokonidia, blastokonidia, klamidospora, konidia, sporangiospora, dan secara seksual dengan menghasilkan askospora, basidiospora, dan zigospore. Status kapang yang mempunyai fase seksual disebut teleomorf. Apabila hanya fase aseksualnya saja yang diketahui, maka kapang tersebut adalah anamorf (Gandjar *dkk.* 2006: 5--6).

Kapang entomopatogen merupakan kapang yang bersifat merugikan pada serangga karena dapat menyebabkan kematian serangga, sehingga mengurangi populasi serangga di alam (Shah 2003: 413). Kemampuan konidia kapang entomopatogen untuk melakukan penetrasi pada kutikula serangga sangat

dipengaruhi oleh komposisi kimia dari kutikula serangga. Kapang entomopatogen akan menghasilkan enzim-enzim pendegradasi kutikula seperti khitinase, lipase dan protease pada inang yang memiliki kondisi yang sesuai untuk pertumbuhan kapang entomopatogen (Federici dan Maddox 1996: 417). Kemampuan masing-masing spesies kapang untuk menembus kutikula suatu spesies serangga tertentu dan tumbuh dengan memanfaatkan nutrisi dari tubuh serangga tersebut menentukan spesifitas kapang terhadap serangga inangnya (Hajek *dkk.* 2001: 314). Suhu merupakan salah satu faktor yang menentukan spesifitas kapang entomopatogen untuk dapat tumbuh, sebab kebanyakan kapang entomopatogen tidak mampu tumbuh pada suhu di atas 30° C yang merupakan suhu tubuh pada mamalia dan aves (Ignoffo 1981: 20).

Beberapa spesies kapang entomopatogen berasal dari genus *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, dan *Verticillium* (Hajek *dkk.* 2001: 309). Umumnya kapang entomopatogen menghasilkan toksin seperti destruksin yang dihasilkan oleh *M. anisopliae*, bassinolide yang dihasilkan oleh *Beauveria bassiana*, dan efrapeptin yang dihasilkan oleh *Tolypocladium niveum* (Rostrup) Bissett (Tzean *dkk.* 1997: 8). Senyawa-senyawa toksin akan menyebabkan perubahan pada susunan komponen kimia sel sehingga menyebabkan terjadinya gangguan kerja sel yang berdampak pada gangguan sistem imun serangga (Wang dan Leger 2006: 6647). Toksin-toksin tersebut menyebabkan terjadinya gangguan fungsi pencernaan, tubulus malpighi, dan otot pada serangga. Selain itu, toksin tersebut juga mencegah respon imun dari serangga melalui mekanisme penghambatan haemosit (Tzean *dkk.* 1997: 9).

Kapang *Metarhizium anisopliae* merupakan salah satu jenis kapang entomopatogen. Kapang tersebut dapat menginfeksi larva serangga dengan melakukan penetrasi menembus kutikula larva dan menghasilkan enzim hidrolisis. Enam senyawa enzim dikeluarkan oleh *M. anisopliae*, yaitu lipase, khitinase, amilase, proteinase, pospatase, dan esterase (Prayogo *dkk.* 2005: 21). Hifa kapang akan tumbuh ke dalam sel-sel tubuh larva, kemudian menyerap air dan nutrisi sehingga mengakibatkan larva mati dalam keadaan tubuh yang mengeras (Ahmad 2008: 87).

Kapang *M. anisopliae* mampu menghasilkan destruksin (Skrobek *dkk.* 2007: 362). Destruksin merupakan metabolit sekunder utama yang dihasilkan secara *in vitro* oleh spesies-spesies yang berasal dari genus *Metarhizium*. Beberapa tipe destruksin yang sering dilaporkan adalah destruksin A, B, dan E (Skrobek *dkk.* 2008: 362). Destruksin merupakan senyawa toksin neuromuskular yang dapat menyebabkan depolarisasi membran otot serangga dengan mempengaruhi transpor ion Ca^{2+} sehingga menyebabkan kelumpuhan otot serangga (Prayogo *dkk.* 2005: 21).

Metarhizium majus (Johnst.) Bisch., Rehner dan Humber merupakan salah satu jenis kapang entomopatogen. Kapang *M. majus* sebelumnya dikenal sebagai varian dari jenis *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin, yaitu varian *majus* atau *major* (Bischoff *dkk.* 2009: 512). *Metarhizium anisopliae* var. *majus* merupakan bentuk anamorfik, sedangkan *Cordyceps brittlebanksiodes* Liu, Liang, Whalley, Yao, dan Liu, merupakan bentuk teleomorfik dari *M. anisopliae* var. *majus* (Liu *dkk.* 2001:180).

Metarhizium majus menjadi spesies yang terpisah dari *M. anisopliae* berdasarkan perbedaan karakter morfologi dan filogeni. Perbedaan morfologi antara *M. majus* dengan *M. anisopliae* terletak pada ukuran konidia yang berbeda. *Metarhizium majus* memiliki ukuran konidia yang lebih besar dibandingkan ukuran konidia *M. anisopliae* yaitu 8,5--14,5 x 2,5--5,0 μm . *Metarhizium anisopliae* memiliki ukuran konidia yaitu, 5,0--7,0 x 2,0--3,5 μm . Hasil analisis filogenetik pada sekuens gen *elongation factor 1 alpha* (EF-1 α) dari *M. majus* dan *M. anisopliae*, memperlihatkan bahwa pada pohon filogeni *M. majus* terpisah pada *clade* yang berbeda dengan *M. anisopliae* (Bischoff *dkk.* 2009: 512 & 520).

Berdasarkan sifat patogen, *M. anisopliae* var. *majus* memiliki spektrum inang yang lebih sempit dibandingkan *M. anisopliae* var. *anisopliae*. *Metarhizium anisopliae* var. *majus* diketahui hanya dapat menginfeksi serangga dari bangsa *Coleoptera* (Driver *dkk.* 2000: 136), sedangkan *M. anisopliae* var. *anisopliae* diketahui dapat menginfeksi serangga dari bangsa *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Homoptera*, *Hemiptera*, dan *Isoptera* (Prayogo 2006: 48).

Putra (2009: 62) melaporkan bahwa koloni kapang *M. majus* UICC 295 yang berumur 22 hari pada medium *Saboraud Dextrose Yeast Extract Agar*

(SDYA) menunjukkan massa spora berwarna hijau *olive* dengan miselium berwarna putih, sebalik koloni berwarna hialin, dan tetes eksudat berwarna kuning. Spora kapang *M. majus* UICC 295 berbentuk silindris. Suhu optimum untuk pertumbuhan *M. majus* berkisar 22--27° C dengan kelembapan di atas 90%.

Taksonomi *M. majus* berdasarkan Bischoff *dkk.* (2009: 512) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Eumycota</i>
Filum	: <i>Ascomycota</i>
Subfilum	: <i>Ascomycotina</i>
Kelas	: <i>Sordariomycetes</i>
Ordo	: <i>Hypocreales</i>
Suku	: <i>Clavicipitaceae</i>
Marga	: <i>Metarhizium</i>
Jenis	: <i>Metarhizium majus</i> (Jonhst.) Bisch., Rehner & Humber

2. 2 KUMBANG BADAK (*Oryctes rhinoceros* Linn.)

Oryctes rhinoceros Linn. (Coleoptera: Dynastidae) atau dikenal sebagai kumbang badak merupakan salah satu hama yang banyak menimbulkan kerugian pada perkebunan tanaman kelapa (*Cocos nucifera* Linn.) di Indonesia (Sambiran dan Hosang 2007: 2). Selain tanaman kelapa, *O. rhinoceros* juga merupakan hama bagi tanaman lainnya seperti aren, kelapa sawit, nanas, kurma, rotan, pohon gaharu, tebu, pisang, palem, pandan, dan sagu (Nayar *dkk.* 1976: 338; Baringbing 1991: 57).

Kumbang betina meletakkan telur pada tumpukan sampah organik, kotoran ternak, dan batang kelapa yang sudah lapuk (Soebandrijo dan Wikardi 1988: 43). Telur akan menetas setelah 2 minggu kemudian menjadi larva (Balai Penelitian Kelapa 1989: 7). Telur *O. rhinoceros* berbentuk lonjong dan berwarna putih dengan panjang 3--3,5 mm dan lebar 2 mm. Lama stadium telur adalah 11--13 hari (Departemen Pertanian 1993: 1).

Larva *O. rhinoceros* yang baru menetas dari telurnya berwarna putih, sedangkan bagian kepala dan tungkainya berwarna merah kecokelatan. Panjang

tubuh larva yang baru menetas adalah 7--8 mm. Bentuk tubuh larva yang telah dewasa membengkok dan bagian abdomennya berbentuk menyerupai kantong. Badan larva ditumbuhi rambut-rambut pendek. Larva yang telah dewasa memiliki panjang 60--105 mm dan lebar 25 mm (Gambar 1.1). Stadium larva membutuhkan waktu 2--4 bulan untuk berkembang, dan kemudian larva akan beralih ke fase istirahat (pupa) (Departemen Pertanian 1993: 1—2).

Taksonomi kumbang badak (*Oryctes rhinoceros*) berdasarkan Nayar *dkk.* (1976: 328--338) adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Animalia*
 Filum : *Arthropoda*
 Kelas : *Insecta*
 Bangsa : *Coleoptera*
 Subbangsa : *Polyphaga*
 Supersuku : *Scarabaeoidea*
 Suku : *Dynastidae*
 Marga : *Oryctes*
 Jenis : *Oryctes rhinoceros* Linnaeus



Gambar 2.1. Larva *O. rhinoceros*
 [Sumber: Dokumentasi pribadi]

2.3 PENGENDALIAN HAMA *Oryctes rhinoceros*

Pengendalian hama *Oryctes rhinoceros* dapat dilakukan dengan tiga cara, yaitu pengendalian secara mekanis, kimiawi dan biologis (Baringbing 1991: 59).

Pengendalian secara mekanis dilakukan dengan membunuh secara langsung telur, larva, pupa, dan kumbang yang berada di tempat perkembangbiakannya.

Kumbang yang berada di pohon kelapa dibunuh menggunakan tenaga pemanjat dan alat berupa kait yang terbuat dari kawat untuk menusuk kumbang yang berada di lubang gerakan (Rumini 1992: 38).

Pengendalian hama *Oryctes rhinoceros* secara kimia dilakukan dengan menggunakan insektisida sintetik. Penggunaan insektisida sintetik dapat merugikan karena meningkatkan biaya produksi, menyebabkan resistensi hama terhadap insektisida, dan pencemaran lingkungan (Hosang *dkk.* 2006: 124). Residu insektisida sintetik yang terdegradasi secara lambat di tanah memiliki kemungkinan besar untuk mencapai perairan dan terakumulasi pada invertebrata akuatik, terestrial, maupun tumbuhan yang merupakan sumber makanan bagi vertebrata (Nayar *dkk.* 1976: 430).

Upaya pengendalian secara biologis dilakukan menggunakan agen hayati, yaitu musuh alami *O. rhinoceros*, baik berupa predator maupun parasit (Pracaya 2007: 195--196). Keunggulan penggunaan agen hayati dalam mengendalikan populasi hama antara lain ketiadaan residu zat kimia berbahaya yang tersisa setelah pemakaian, biaya yang dikeluarkan relatif lebih kecil dibandingkan biaya penggunaan insektisida sintetik, serta memiliki spesifisitas patogen yang tinggi terhadap hama sasaran (Romoser dan Stoffolano 1998: 458). Kelemahan dari penggunaan agen hayati dalam mengendalikan populasi hama adalah diperlukan waktu yang relatif lama bagi agen hayati dalam membunuh hama target dibandingkan dengan menggunakan insektisida sintetik. Selain itu, dibutuhkan suatu penelitian mendalam mengenai sejarah filogeni dan hubungan antar hama dan musuh alaminya sehingga diperoleh suatu agen hayati yang tepat dan sesuai dalam mengatasi hama sasaran (McEvoy 1996: 402--403).

2. 4 APLIKASI KAPANG TERHADAP SERANGGA

Metarhizium anisopliae memiliki kemampuan infeksi yang sangat luas pada berbagai jenis serangga dan sangat penting dalam mengontrol populasi serangga di alam. Penggunaan *M. anisopliae* dilaporkan telah diaplikasikan

secara luas di beberapa negara seperti Italia, Kanada, Tazmania, Swis, dan beberapa negara lainnya (Rodrigues *dkk.* 2005: 185).

Metarhizium anisopliae dilaporkan mampu menyebabkan kematian serangga jenis *Culicoides* 90% hingga 100% dalam waktu 72 jam dengan inokulasi jumlah konidia sebanyak $(4,3--4,5) \times 10^3$ cfu/ml (Ansari *dkk.* 2010: 1). Pengujian di Brazil menunjukkan bahwa *M. anisopliae* var *acridum* Driver dan Milner mampu membunuh serangga *Brevipalpus phoenicis* (Geijkes) 90% dalam waktu 8 hari dengan jumlah konidia sebanyak 10^8 cfu/ml (Magalhaes *dkk.* 2005:196--197). Berdasarkan Benjamin *dkk.* (2002: 723), di Amerika pengujian *M. anisopliae* Metschinkoff dengan jumlah konidia 4×10^9 cfu/ml mampu membunuh serangga dewasa *Ixodes scapularis* Say 96% dalam waktu 3 minggu.

Penggunaan kapang untuk mengendalikan serangga hama dapat dilakukan dengan aplikasi kontak langsung (Baringbing 1991: 61). Aplikasi dilakukan dengan cara memaparkan secara langsung sejumlah spora pada permukaan tubuh serangga sasaran (Hosang *dkk.* 2006: 186). Berdasarkan Departemen Pertanian (1993: 10--11), aplikasi *Metarhizium* pada *O. rhinoceros* efektif dilakukan saat *O. rhinoceros* masih berada pada stadium larva. Baringbing (1991: 60) melaporkan bahwa suspensi *M. anisopliae* yang diinfeksi ke permukaan tubuh larva mampu membunuh larva *O. rhinoceros* 100% dari seluruh 400 larva yang diujikan dalam waktu 10 hari setelah perlakuan (Gambar 2.2).

Aplikasi kontak langsung memungkinkan konidia kapang langsung mengenai tubuh serangga dalam jumlah banyak, sehingga konidia dapat cepat melekat, bergerminasi dan berpenetrasi pada bagian antar ruas tubuh serangga dengan kondisi kelembabannya sangat mendukung (Desyanti *dkk.* 2007: 74--75).



Gambar 2.2. Larva yang terinfeksi *M. majus*

[Sumber: Dokumentasi pribadi]

2.5 MEKANISME INFEKSI KAPANG DAN PERTAHANAN TUBUH SERANGGA

Infeksi kapang pada serangga berlangsung melalui spora (bentuk seksual) atau konidia (bentuk aseksual) yang dihasilkan oleh kapang tersebut (Federici dan Maddox 1996: 417). Spora atau konidia kapang dapat menginfeksi serangga melalui integumen, baik dari luka pada permukaan tubuh maupun dengan mendegradasi kitin pada kutikula serangga (Kulshrestha dan Pathak 1997: 78).

Proses infeksi kapang pada serangga diawali dengan kontak antara propagul kapang dengan kutikula serangga. Tahap kedua yaitu penempelan konidia yang disertai germinasi pada integumen serangga. Tahap ketiga yaitu, terjadi penetrasi dan invaginasi menembus integumen membentuk *appresorium*. Tahap keempat adalah terjadinya destruksi dan terbentuknya blastospora yang kemudian menyebar di dalam hemolimfa. Blastospora kemudian akan membentuk hifa sekunder yang menyerang jaringan lainnya yang berakibat pada kematian serangga (Prayogo *dkk.*2005: 21)

Mekanisme pertahanan serangga terhadap serangan dari kapang meliputi koagulasi, detoksifikasi, fagositosis, pembentukan nodul, dan enkapsulasi. Mekanisme-mekanisme tersebut melibatkan sel hemosit, yaitu sel yang berperan dalam memberikan perlindungan terhadap serangan sel-sel asing, patogen, maupun parasit pada tubuh serangga. Koagulasi merupakan proses penyumbatan melalui penggumpalan hemosit sehingga materi asing tidak dapat masuk ke dalam tubuh serangga. Detoksifikasi merupakan kemampuan hemosit untuk mengubah

senyawa toksin berbahaya menjadi senyawa yang tidak berbahaya bagi tubuh serangga. Fagositosis merupakan mekanisme penghancuran bakteri maupun sel asing oleh hemosit. Mekanisme fagositosis penting sebagai pertahanan tubuh serangga terhadap serangan sel asing selama periode molting dan metamorfosis. Hal tersebut disebabkan pada periode tersebut tubuh serangga dalam kondisi rentan akibat sedang berlangsungnya proses penghancuran jaringan atau *histolysis*. Pembentukan nodul terjadi ketika sel asing yang masuk terlalu banyak dan tidak dapat diatasi oleh mekanisme fagositosis. Pada pembentukan nodul, partikel asing akan terperangkap di dalam hemosit untuk dikeluarkan dari hemolimfa. Mekanisme enkapsulasi terjadi ketika sel asing yang masuk ke dalam tubuh serangga berukuran terlalu besar sehingga tidak dapat ditanggulangi oleh mekanisme fagositosis dan pembentukan nodul. Pada mekanisme enkapsulasi terjadi produksi hemosit dalam jumlah besar. Hemosit kemudian akan menyelubungi partikel sel asing yang masuk sehingga sel asing tersebut mengalami kehancuran (Romoser dan Stoffolano 1998: 111--112).

2.6 PEMBUATAN FORMULA

Penggunaan kapang *Metarhizium* dalam mengendalikan hama *O. rhinoceros* di lapangan dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu menyebarkan langsung larva yang telah mati terinfeksi *Metarhizium* ke dalam sarang larva, memberikan perangkap timbunan makanan berupa serbuk gergaji yang telah dicampur dengan larva terinfeksi, atau menginfeksi larva secara langsung dengan suspensi kapang dalam media pembawa berupa substrat padat (Departemen Pertanian 1993: 11--12).

Pengendalian dengan cara menggunakan larva mati untuk diinfeksi secara langsung memiliki keunggulan dalam hal kemudahannya di lapangan oleh petani. Namun demikian, cara tersebut memiliki kelemahan karena hanya dapat memenuhi kebutuhan dalam skala kecil (Direktorat Jenderal Perkebunan 2008: 5). Pembuatan formula merupakan cara yang dapat digunakan untuk kemudahan aplikasi pemanfaatan mikroorganisme di lapangan (Suwahyono 2010: 65).

Pembuatan formula bertujuan untuk mendapatkan produk yang efektif, murah, mudah dibawa dan diaplikasikan di lapangan dan dapat disimpan dalam jangka waktu tertentu (Suwahyono 2010: 69). Tahapan-tahapan pembuatan formula *M. anisopliae* secara masal meliputi pencarian inokulum, pembuatan media agar, pembuatan biakan murni, dan inokulasi kapang pada substrat padat sebagai media pembawa (Direktorat Jenderal Perkebunan 2008: 4).

Substrat padat yang digunakan untuk media tumbuh dapat berupa jagung pecah giling, beras, dan kedelai (Direktorat Jenderal Perkebunan 2008: 4). Bahan-bahan substrat padat tersebut merupakan produk alam dengan komposisi nutrisi yang umumnya belum diketahui secara pasti. Proses pembiakan dilakukan dengan cara menginokulasikan biomassa kapang ke dalam substrat padat yang sebelumnya telah disterilkan. Biomassa kapang yang telah diinokulasikan ke dalam substrat padat selanjutnya diinkubasi selama ± 10 hari pada suhu 25--30° C (Suwahyono 2010: 72 & 75). Formula yang telah diinkubasi dan dikeringkan dapat disimpan dalam kantong plastik atau botol-botol tertutup. Formula kemudian dapat disimpan 1--2 tahun dalam suhu kamar 27° C atau 3--4 tahun di dalam lemari pendingin pada suhu 5--10° C (Direktorat Jenderal Perkebunan 2008: 5).

Beberapa penelitian melaporkan bahwa produk formula kapang entomopatogen yang disimpan dalam waktu tertentu akan mengalami penurunan viabilitas dan kemampuan kapang dalam membunuh larva serangga. Wahyudi (2008: 54) melaporkan bahwa pembuatan produk biomassa aktif *Beauveria bassiana* dalam matriks alginat menunjukkan adanya penurunan jumlah konidia selama masa penyimpanan. Produk biomassa aktif *B. bassiana* yang disimpan pada hari ke-0 menunjukkan jumlah konidia $1,85 \times 10^8$ cfu/ml, penyimpanan hari ke-7 sejumlah $6,33 \times 10^7$ cfu/ml, hari ke-14 sejumlah $5,26 \times 10^7$ cfu/ml, dan hari ke-21 sejumlah $8,75 \times 10^6$ cfu/ml. Berdasarkan Feng *dkk.* (1994: 8), produk formula *B. bassiana* yang disimpan pada suhu 4° C dapat mengalami penurunan viabilitas setelah disimpan dalam waktu tertentu. Viabilitas *B. bassiana* pada bulan ke-8 setelah penyimpanan adalah 93,3 %, pada bulan ke-12 adalah 87,3 %, dan pada bulan ke-19 menjadi 35,3%. Tingkat mortalitas *pine caterpillar* mengalami penurunan setelah diinokulasikan dengan produk formula *B. bassiana*

yang disimpan dalam waktu tertentu. Tingkat mortalitas *pine caterpillar* pada saat produk formula masih dalam keadaan segar adalah 69,7%, setelah produk disimpan selama 2 minggu mengalami penurunan menjadi 46,6%, dan setelah 8 bulan penyimpanan menjadi 40,6%.

2. 7 BERAS SEBAGAI MEDIA PEMBAWA

Media sebagai bahan pembawa spora harus memiliki nutrisi yang cukup untuk memenuhi kebutuhan kapang dalam proses pembentukan konidia kapang entomopatogen (Prayogo *dkk.* 2005: 22). Berdasarkan Suwahyono (2010: 72) substrat padat yang digunakan harus mengandung nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan kapang. Struktur substrat padat juga harus dapat mendukung tercukupinya ruang udara dan ruang untuk menempel spora. Melalui media pembawa yang mengandung berbagai nutrisi diharapkan aktivitas metabolisme dapat tetap berlangsung meskipun kapang tidak berada pada substrat aslinya. Berdasarkan Ihsan dan Octriana (2009: 63) beras merupakan media pembawa yang lebih efektif digunakan sebagai media pembawa *B. bassiana* dibandingkan jagung. Penggunaan beras sebagai media pembawa *B. bassiana* dalam menginfeksi pupa lalat buah menghasilkan mortalitas sebesar 42,13%, sedangkan penggunaan media pembawa berupa jagung hanya menyebabkan mortalitas pupa lalat buah sebesar 17,09 %.

Beras mengandung berbagai nutrisi seperti karbohidrat, protein, lipid, dan asam nukleat. Selain itu beras mengandung berbagai vitamin meliputi, vitamin E (*α -tocopherol*) dan vitamin B (thiamin, riboflavin, dan niacin). Mineral yang terkandung di dalam beras meliputi, fosfor, kalium, dan magnesium. Beras mengandung karbohidrat 75 persen hingga 90 persen. Melalui proses pemanasan dengan cara perebusan di dalam air, karbohidrat tersebut akan dipecah menjadi senyawa sederhana berupa glukosa dan amilopektin. Proses perebusan juga menyebabkan terserapnya air sehingga struktur beras menjadi lebih lembut (Frei dan Becker 2004: 5--8).

Sebelum digunakan sebagai media pertumbuhan bagi mikroorganisme bahan pangan yang ingin digunakan perlu disterilkan terlebih dahulu. Bahan

pangan disterilkan pada suhu 60° C sampai dengan 121° C, dalam waktu 20 menit sampai dengan 115 menit tergantung pada jenis makanan yang akan disterilkan. Mikroorganisme akan hancur pada bahan pangan yang disterilkan, tetapi proses tersebut tidak akan merusak nilai nutrien yang ada pada bahan pangan jika dilakukan sesuai dengan *thermal death time* bahan pangan yang ingin disterilkan (Talaro 2008: 820). Berdasarkan Gandjar *dkk.* (2006: 117) beberapa mikroorganisme yang dapat tumbuh pada beras meliputi, *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn, *A. flavus* Link, *A. tamari* Kita, *A. niger* van Tieghem, *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerl dan sebagainya.

2.8 PENGARUH KONDISI LINGKUNGAN TERHADAP PERTUMBUHAN KAPANG

Lingkungan merupakan faktor yang dapat mempengaruhi kehidupan fungi. Beberapa faktor lingkungan meliputi kelembapan, suhu, pH, udara, cahaya, dan keberadaan nutrien pada substrat (Gandjar *dkk.* 2006: 103). Suhu minimum pada kebanyakan fungi adalah 2--5° C, suhu optimum 22--27° C, dan suhu maksimum 35--40° C, sedangkan pH untuk pertumbuhan fungi berkisar 3 hingga 9 (Ingold 1984: 18--19).

Pada kapang entomopatogen, penyebaran spora terutama dipicu oleh beberapa faktor khusus meliputi kelembapan, suhu, dan kepadatan populasi. Penyebaran akan berlangsung ketika kondisi lingkungan yang sesuai tercapai (Federici dan Maddox 1996: 411). Kapang entomopatogen umumnya tidak dapat tumbuh dan berkembang pada suhu diatas 30° C sehingga sulit bagi kapang entomopatogen untuk dapat menginfeksi dan berkembang pada mamalia dan aves (Ignofu 1981: 20). Berdasarkan (Dimbi *dkk.* 2004: 83) suhu optimum kapang *M. anisopliae* untuk dapat bergerminasi dan tumbuh dengan cepat adalah 25° C , sedangkan pada suhu 15° C dan suhu 35° C pertumbuhan kapang berlangsung lambat.

Air merupakan komponen utama yang dibutuhkan fungi untuk dapat tumbuh. Namun demikian, umumnya fungi tetap dapat memproduksi badan buah dan spora pada kondisi sangat kering. Meskipun fungi dapat memproduksi spora

pada kondisi sangat kering, pertumbuhan umumnya tidak berlangsung (Ingold 1984: 19). Kelembapan merupakan indikator keberadaan air di lingkungan. Pada kapang entomopatogen, kelembapan yang tinggi diperlukan untuk pertumbuhan kapang. Kelembapan yang tinggi memungkinkan keberhasilan terjadinya infeksi kapang entomopatogen pada serangga (Lisansky dan Hall 1983: 327). Kelembapan 93--96 % dibutuhkan kapang *M. anisopliae* untuk dapat tumbuh (Gopal *dkk.* 2002: 418).



BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan *Center of Excellence for Indigenous Biological Resources-Genome Studies (CoE IBR-GS)*, FMIPA-UI, Depok. Penelitian dilakukan selama 5 bulan mulai Januari 2011-- Mei 2011.

3.2 ALAT DAN BAHAN

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah autoklaf [Hirayama], lemari pendingin [GASSIO], kompor listrik [Sanyo], oven [Heraeus], pemanas air [SHARP], timbangan digital [ACS balance- MN 200, ACS balance- BC 500, AND EW-300 G], timbangan analitik [Sartorius], jangka sorong digital [Digital Caliper], vorteks [Bio-Rad dan Maxi Mix II Type 37600], mikropipet P1000 dan P200 [Gilson], mikropipet [V.A.Howe], mikropipet [Biohit Proline], *tips*, mikroskop [Euromex], mikroskop trinokular [Carl ZEISS], inkubator statis [Imperial III], lemari pendingin [AMB-HI-LO], mangkuk plastik berdiameter alas 9 cm dan tinggi 6,3 cm dengan tutup, erlenmeyer, *beaker glass*, gelas ukur, cawan petri, tabung reaksi, batang pengaduk, jarum tanam tajam, jarum tanam bulat (*ose*), botol alkohol, *object glass*, *cover glass*, pinset, pipet, spatel *Drygalski*, pembakar spirtus, *transfer box*, blender [Miyako BL 15], oven sederhana, termohigrometer [Londisun LS-206], lampu bohlam 40 Watt [Philips], kabel 10 meter, dan oven kompor [Bima Sakti].

3.2.2 Bahan

3.2.2.1 Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan adalah kapang *Metarhizium majus* UICC 295 koleksi *University of Indonesia Culture Collection* (UICC).

3.2.2.2 Larva *Oryctes rhinoceros* dan pakan larva

Larva yang digunakan adalah larva kumbang badak (*Oryctes rhinoceros*) asal desa Rajagaluh, kabupaten Majalengka, Jawa Barat. Pakan yang digunakan adalah campuran serasah dan kotoran hewan ternak dari desa Rajagaluh, Kabupaten Majalengka, Jawa Barat.

3.2.2.3 Bahan pembawa

Bahan pembawa yang digunakan adalah beras [kepala super cap Petruk], yang diperoleh dari supermarket.

3.2.2.4 Medium

Saboraud Dextrose Yeast Extract Agar (SDYA) digunakan untuk pertumbuhan dan enumerasi kapang. *Saboraud Dextrose Yeast Extract Broth* (SDYB) digunakan untuk perbanyakan biomassa konidia/hifa kapang.

3.2.2.5 Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah akuades steril, *yeast extract* [BD], pepton [Merck], agar [Britania], dekstrosa [Conda], tetrasiklin [Kimia Farma], etanol 90%, alkohol 70% teknis, aseton teknis, kloramfenikol [Wako], Triton X [BDH] dan *lactophenol cotton blue*.

3.2.2.6 Bahan habis pakai

Bahan habis pakai yang digunakan adalah, aluminium *foil*, plastik tahan panas, masker, sarung tangan plastik, tissue gulung, kertas *Yellow Pages*, dan karet gelang.

3.3 CARA KERJA

Skema kerja dapat dilihat pada lampiran 1.

3.3.1 Pembuatan medium *Saboraud Dextrose Yeast Extract Agar* (SDYA) dan *Saboraud Dextrose Yeast Extract Broth* (SDYB).

Medium SDYA dibuat berdasarkan Desyanti (2007: 69) dengan melarutkan dekstrosa 10 g, pepton 2,5 g, *yeast extract* 2,5 g, dan agar 20 g, hingga akuades mencapai 1 liter. Medium dipanaskan hingga mendidih kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada 121° C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium didinginkan selanjutnya ditambahkan tetrasiklin 500 mg. Medium kemudian dituang ke dalam cawan petri steril masing-masing sebanyak 20 ml.

Pembuatan medium SDYA miring untuk pemeliharaan *M. majus* UICC 295 dilakukan dengan melarutkan dekstrosa sebanyak 10 g, pepton 2,5 g, *yeast extract* 2,5 g, dan agar 20 g ditambahkan akuades hingga volume total mencapai satu liter. Medium didinginkan lalu ditambahkan 0,2 g kloramfenikol yang telah dilarutkan dalam satu ml etanol 96% ke dalam medium yang telah dididihkan. Medium dipindahkan ke dalam tabung reaksi, masing-masing sebanyak 6 ml untuk *stock culture* dan 4 ml untuk *working culture*. Medium kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium steril dalam tabung reaksi kemudian diletakkan pada papan yang dimiringkan, kemudian dibiarkan mengeras.

Pembuatan medium SDYB dilakukan seperti pada pembuatan medium SDYA miring tanpa penambahan agar. Medium dibuat di dalam erlenmeyer tanpa dipindahkan ke tabung reaksi. Medium disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

3.3.2 Pemurnian *M. majus* UCC 295

Pemurnian *M. majus* UICC 295 dilakukan dengan metode *quadrant streak* berdasarkan Hogg (2005: 85). Proses pemurnian kapang dilakukan dengan mengambil biakan kapang dengan jarum tanam bulat. Biakan kemudian digoreskan pada medium SDYA secara zigzag pada tiga bagian yang berbeda. Biakan kemudian diinkubasi selama 12 hari pada ruangan gelap dengan suhu ruang 22--25° C hingga biakan tumbuh. Koloni tunggal yang terpisah dari koloni lainnya kemudian dipindahkan sebagai *stock culture* dan *working culture*.

3.3.3 Pembuatan *stock culture* dan *working culture*

Koloni *M. majus* UICC 295 yang telah murni dipindahkan ke dalam dua tabung berisi medium SDYA miring sebagai *stock culture* dan *working culture*. Pembuatan *stock culture* dilakukan dengan metode *stab* menggunakan jarum tanam tajam. Pembuatan *working culture* dilakukan dengan metode *streak* menggunakan jarum tanam bulat. Jarum tanam bulat yang berisi konidia/hifa kapang digoreskan secara zigzag sebanyak 15 gores dari bagian bawah hingga atas medium. Biakan kapang *stock culture* yang telah tumbuh disimpan di *refrigerator* pada suhu 4° C. Biakan *working culture* disimpan pada suhu ruang agar dapat digunakan untuk pengujian.

3.3.4 Pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 secara makroskopik dan mikroskopik

Metarhizium majus UICC 295 yang akan diamati, ditumbuhkan terlebih dahulu ke dalam medium SDYA di dalam cawan petri dengan teknik tusuk

sebanyak tiga kali pengulangan kemudian diinkubasi selama 3 minggu. Pengukuran diameter satu koloni dilakukan dengan cara mengambil rata-rata dari tiga kali pengukuran. Berdasarkan Gandjar *dkk.* (1999: 4) hal-hal yang perlu diamati saat pengamatan makroskopik kapang adalah warna koloni, warna sebalik koloni, tekstur koloni, diameter koloni, ada atau tidaknya *exudate drop*, zonasi, *radial furrow*, dan *growing zone*. Hal-hal yang perlu dicatat pula adalah umur biakan, medium untuk pertumbuhan, dan suhu inkubasi.

Berdasarkan Tzean *dkk.* (1997: 150) pengamatan mikroskopik *Metarhizium* meliputi bentuk konidia, diameter konidia, panjang dan lebar konidia. Panjang dan lebar konidia diukur menggunakan mikroskop trinokular dengan bantuan program aplikasi *axio visio rel 4.7* atau menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 40 X 10 dengan bantuan mikrometer okuler.

3.3.5 Penghitungan jumlah konidia/hifa kapang dengan metode *Total Plate Count* (TPC)

Penghitungan jumlah konidia/hifa kapang dilakukan dengan metode *Total Plate Count* (TPC) berdasarkan Cappuccino dan Sherman (1996: 119). Biakan kapang dari *working culture* disuspensikan dengan 5 ml larutan akuades steril. Biakan kemudian dikerik menggunakan jarum tanam bulat (*ose*). Suspensi dihomogenkan menggunakan vorteks. Suspensi konidia/hifa kapang diencerkan menggunakan akuades steril hingga faktor pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5} . Sebanyak 0,1 ml suspensi konidia/hifa kapang dari masing-masing pengenceran disebar secara merata menggunakan spatel *drygalsky* di atas medium SDYA. Masing-masing faktor pengenceran dilakukan tiga kali pengulangan. Biakan kemudian diinkubasi selama 3 hari pada suhu ruang dengan kondisi gelap. Hasil TPC dihitung berdasarkan Gandjar *dkk.* (1992: 40) menggunakan rumus:

$$\text{Jumlah cfu/ml} = \frac{\text{Jumlah rata - rata koloni yang tumbuh}}{\text{Volume inokulum} \times \text{Faktor pengenceran}}$$

3.3.6 Pengelompokan larva *O. rhinoceros*

Sebanyak 40 ekor larva dibagi menjadi beberapa kelompok yaitu kelompok perlakuan I, II, III, dan kelompok kontrol. Larva yang digunakan dalam setiap kelompok masing-masing sebanyak 10 ekor. Pengelompokan larva dilakukan berdasarkan keseragaman berat.

3.3.7 Pemeliharaan larva *O. rhinoceros*

Larva *O. rhinoceros* dipelihara di dalam ruangan dengan kondisi gelap, suhu berkisar antara 25--27° C, dan kelembaban lebih dari 90%. Larva *O. rhinoceros* beserta pakan ditempatkan dalam mangkuk plastik dengan diameter alas 9 cm dan tinggi 6,3 cm. Mangkuk plastik diberi lubang dengan jumlah lubang sebanyak lima lubang sebagai tempat sirkulasi udara. Pemberian pakan pada larva dilakukan setiap tiga hari, yaitu sebanyak 10 g pakan larva. Larva ditimbang setiap 3 hari sekali kemudian data berat yang dicatat.

3.3.8 Pembuatan larutan triton X-100 0,05% steril

Pengujian konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada tubuh larva dilakukan menggunakan triton X. Triton X digunakan untuk memperkecil tegangan permukaan antara konidia dan tubuh larva. Hal tersebut disebabkan permukaan konidia kapang bersifat hidrofilik, sedangkan permukaan kutikula larva yang tersusun atas khitin bersifat hidrofobik. Tegangan permukaan yang kecil akan memudahkan penempelan konidia kapang pada kutikula larva. Berdasarkan Roche (2005: 1—2), Triton X-100 merupakan detergen non-ionik yang bersifat hidrofobik, sehingga mempermudah penempelan konidia kapang pada permukaan kutikula.

Sebanyak 0,05 ml triton X-100 ditambahkan ke dalam akuades hingga mencapai volume 100 ml. Campuran dihomogenkan dengan menggunakan vorteks kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5

ml. Campuran kemudian disterilkan dengan menggunakan autoklaf dengan suhu 121° C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

3.3.9 Pengujian kemampuan membunuh konidia/hifa kapang terhadap larva *O. rhinoceros* dengan metode kontak langsung

Pengujian konidia/hifa kapang dalam membunuh larva *O. rhinoceros* dilakukan dengan metode kontak langsung. Sebanyak 1 ml suspensi kapang yang berisi konidia/hifa kapang dan triton X 0,05 % disiramkan secara langsung ke tubuh larva. Larva yang telah mendapat perlakuan kemudian diamati selama 21 hari. Berdasarkan Ihsan dan Octriana (2009: 64) larva yang mati dicatat kemudian dihitung persentase kematiannya dengan rumus:

$$\text{Persentase kematian larva} = \frac{\text{Jumlah larva yang mati}}{\text{Jumlah larva hidup}} \times 100\%$$

Berdasarkan Hasyim *dkk.* (2005: 119) mortalitas yang diperoleh kemudian dikoreksi menggunakan rumus Abbott's:

$$\% \text{Kematian terkoreksi} = \frac{\% \text{ kematian serangga uji} - \% \text{ kematian kontrol}}{100 - \% \text{ kematian kontrol}} \times 100\%$$

3.3.10 Perbanyakkan biomassa kapang *M. majus* UICC 295 dengan metode fermentasi diam

Pembuatan biomassa dilakukan dengan cara menginokulasikan suspensi konidia/hifa sebanyak 10% (volume/volume). Alasan pemilihan konsentrasi 10% adalah untuk mempercepat pertumbuhan pada medium SDYB, karena pada konsentrasi tersebut akan didapatkan jumlah konidia/hifa yang tinggi sehingga pemanfaatan nutrisi pada medium cair menjadi lebih cepat. Berdasarkan Crueger dan Crueger (1982: 92) konsentrasi inokulum yang terlalu rendah pada proses fermentasi akan memperlambat pemanfaatan nutrisi di dalam medium, sehingga

memperlambat pertumbuhan mikroorganismenya tersebut. Konsentrasi fungi sebagai inokulum pada proses fermentasi yang baik berkisar 5--10%.

Perbanyakan biomassa *M. majus* UICC 295 dilakukan dengan metode fermentasi diam. Fermentasi kapang *M. majus* UICC 295 diawali dengan pembuatan suspensi konidia/hifa kapang. Suspensi konidia/hifa dibuat dengan menambahkan 5 ml larutan akuades steril pada biakan kapang berumur 16 hari, kemudian biakan dikerik menggunakan jarum tanam bulat (ose). Suspensi kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks. Suspensi konidia yang diinokulasikan ke dalam medium SDYB sebanyak 10% (volume/volume). Sebanyak 10 ml suspensi diinokulasi ke dalam 90 ml medium SDYB, selanjutnya diinkubasi pada suhu 27° C di dalam inkubator dengan kondisi gelap hingga kapang bersporulasi tanpa pengocokan.

3.3.11 Pembuatan inkubator sederhana dan loyang untuk pengeringan produk formula

Inkubator sederhana terbuat dari bahan seng dengan ukuran 35 x 35 x 42 cm. Inkubator dibuat dilengkapi satu buah lampu bohlam 5 Watt sebagai sumber panas. Suhu yang dapat dihasilkan dari lampu bohlam dengan daya 5 watt berkisar antara 30--35° C. Untuk mendapatkan suhu 30° C dengan konstan dibuat penutup lampu menggunakan bahan seng. Penutup lampu juga berfungsi untuk mengurangi paparan cahaya yang berasal dari lampu sehingga didapat kondisi gelap di dalam inkubator. Inkubator dilengkapi dengan termometer ruang yang digantung menggunakan tali di dalam oven. Termometer digunakan untuk mengetahui suhu di dalam inkubator. Inkubator terdiri atas 3 rak yang berfungsi untuk meletakkan loyang.

Loyang yang digunakan untuk meletakkan produk formula terbuat dari bahan seng. Loyang memiliki ukuran panjang alas 32 cm, lebar 22 cm, dan tinggi loyang 3 cm. Loyang dibuat tanpa tutup dengan kapasitas penampungan sebanyak 500 g.



Gambar 3.1. Inkubator sederhana yang digunakan untuk pengeringan formula.

Sumber: [Dokumentasi pribadi]

3.3.12 Penyiapan media pembawa berupa substrat beras

Media pembawa yang digunakan adalah beras. Beras yang digunakan terlebih dahulu dicuci dan dibersihkan menggunakan akuades. Beras ditimbang sebanyak 900 g kemudian dibagi ke dalam dua kantong plastik tahan panas masing-masing sebanyak 450 g. Beras kemudian disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit. Proses steril dilakukan pada beras sebelum pembuatan formula kapang dengan tujuan untuk membunuh mikroorganisme yang tidak diinginkan yang dapat menjadi saingan *M. majus* UICC 295 dalam memperoleh nutrisi pada beras. Melalui kematian mikroorganisme yang dapat tumbuh pada beras, diharapkan *M. majus* UICC 295 dapat memanfaatkan nutrisi yang terdapat pada beras, meskipun beras bukan substrat alami *M. majus* UICC 295.

3.3.13 Inokulasi biomassa *M. majus* UICC 295 pada beras

Biomassa kapang yang telah bersporulasi diambil dengan menggunakan spatula kemudian disaring menggunakan kertas saring. Biomassa kapang yang telah disaring kemudian diletakkan ke dalam cawan petri kemudian ditimbang. Biomassa yang telah ditimbang kemudian diinokulasikan pada media padat pembawa berupa beras yang telah disterilkan. Biomassa kapang yang

diinokulasikan ke dalam media padat pembawa berupa beras adalah sebanyak 10% (berat/berat). Sebanyak 50 g biomassa kapang *M. majus* UICC 295 yang hasil fermentasi dimasukkan ke dalam plastik berisi 450 g media pembawa sehingga berat basah total adalah 500 g. Biomassa kapang dan bahan pembawa yang telah dicampurkan kemudian dikeluarkan dari kantung plastik dan dimasukkan ke dalam blender untuk dihomogenkan. Campuran yang telah homogen kemudian diletakan dalam loyang seng untuk dikeringkan di dalam inkubator sederhana dengan suhu 30° C.

3.3.14 Pengeringan dan penghalusan formula

Loyang yang telah berisi campuran biomassa kapang dan beras dikeringkan menggunakan inkubator sederhana dengan suhu 30°C. Pengeringan dilakukan selama \pm 5 hari. Campuran biomassa kapang dan beras yang telah kering, kemudian dihaluskan menggunakan *blender*. Campuran yang telah dihaluskan kemudian dimasukkan ke dalam beberapa kantong plastik sebanyak 40 g. Produk formula kemudian dapat digunakan dan disimpan untuk aplikasi selanjutnya.

3.3.15 Penghitungan jumlah konidia/hifa kapang pada formula dengan metode *Total Plate Count (TPC)*

Produk formula yang telah diperoleh terlebih dahulu dihitung jumlah konidia/hifa yang masih hidup menggunakan metode TPC. Sebanyak 1 g produk tersebut ditambahkan ke dalam 9 ml akuades steril. Suspensi tersebut dihomogenkan menggunakan *vorteks* kemudian diencerkan menggunakan akuades steril hingga faktor pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5} . Sebanyak 0,1 ml suspensi konidia/hifa kapang dari masing-masing pengenceran disebar secara merata menggunakan spatel *drygalsky* di atas medium SDYA. Masing-masing faktor pengenceran dilakukan tiga kali pengulangan. Biakan kemudian diinkubasi selama tiga hari pada suhu ruang dengan kondisi gelap.

3.3.16 Pengujian formula *M. majus* UICC 295 terhadap larva *O. rhinoceros* dengan metode kontak langsung

Pengujian produk formula terhadap larva *O. rhinoceros* diawali dengan pembuatan suspensi produk tersebut. Perbandingan antara produk formula dengan larutan triton X steril adalah 1:1 (berat/volume). Sebanyak 30 g produk formula ditambahkan dengan 30 ml larutan triton X-100 0,05% steril, kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks. Aplikasi produk formula dilakukan menggunakan metode kontak langsung dengan menyiramkan 1 ml suspensi pada permukaan tubuh larva menggunakan mikropipet. Aplikasi dilakukan pada 30 ekor larva kelompok perlakuan. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 18 hari. Hal-hal yang perlu diamati meliputi banyaknya larva yang mati setelah perlakuan, berat larva yang masih hidup setelah perlakuan, serta keadaan suhu dan kelembapan relatif ruangan yang digunakan. Pengamatan jumlah larva yang mati dilakukan setiap hari. Pengukuran berat dan pemberian pakan pada larva yang masih hidup dilakukan setiap 3 hari. Berdasarkan Ihsan dan Oetria (2009: 64) larva yang mati dicatat kemudian dihitung persentase kematiannya dengan rumus:

$$\text{Persentase kematian larva} = \frac{\text{Jumlah larva yang mati}}{\text{Jumlah larva hidup}} \times 100\%$$

Berdasarkan Hasyim *dkk.* (2005: 119) mortalitas yang diperoleh kemudian dikoreksi dengan menggunakan rumus Abbott's:

$$\% \text{Kematian terkoreksi} = \frac{\% \text{ kematian serangga uji} - \% \text{ kematian kontrol}}{100 - \% \text{ kematian kontrol}} \times 100\%$$

3.3.17 Penyimpanan formula selama 30 hari dan penghitungan viabilitas setelah masa penyimpanan

Sebagian produk formula yang telah diperoleh disimpan selama 30 hari untuk diketahui viabilitasnya setelah masa penyimpanan. Produk formula yang telah diperoleh dimasukkan ke dalam plastik kemudian sebagian disimpan di

refrigerator dengan suhu 4° C dan di kardus dalam kondisi gelap dengan suhu 25-27° C. Penyimpanan dilakukan selama 30 hari. Setelah 30 hari, jumlah konidia/hifa kapang pada produk formula yang telah disimpan dihitung dengan metode TPC.

Untuk mengetahui pengaruh penyimpanan formula terhadap viabilitas *M. majus* UICC 295 dilakukan perbandingan hasil enumerasi dengan metode TPC antara jumlah *M. majus* UICC 295 sebelum penyimpanan dengan *M. majus* UICC 295 yang disimpan di *refrigerator* pada suhu 4° C dan di kardus pada suhu 27° C. Persentase viabilitas dihitung berdasarkan Puspitasari *dkk.* (2006: 33)

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{\text{Jumlah sel viable setelah penyimpanan}}{\text{Jumlah sel viabel sebelum penyimpanan}} \times 100\%$$

3.3.18 Pengolahan dan analisis data

Data yang diperoleh disusun dalam bentuk tabel. Data yang diperoleh meliputi data kualitatif dan kuantitatif. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif. Data kualitatif meliputi data pengamatan makroskopik kapang (Tabel 1), pengamatan makroskopik *M. majus* UICC 295, dan gejala kematian larva. Data kuantitatif meliputi pengamatan mikroskopik kapang (Tabel 2), pengamatan makroskopik *M. majus* UICC 295, dan gejala kematian larva penghitungan jumlah sel *M. majus* UICC 295 hasil perhitungan dengan metode TPC (Tabel 3), jumlah larva yang mati (Tabel 4), berat larva setelah perlakuan (Tabel 5). Data kuantitatif berupa hasil penghitungan jumlah sel *M. majus* UICC 295, dan berat larva setelah perlakuan, dihitung nilai rata-rata dan nilai standar deviasi dari tiap data yang teramati. Penghitungan rata-rata dan standar deviasi bertujuan untuk mengetahui tingkat kesalahan data yang diperoleh.

Nilai rata-rata dihitung berdasarkan Hogg dan Craig (1995: 58) dengan rumus sebagai berikut:

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{N}$$

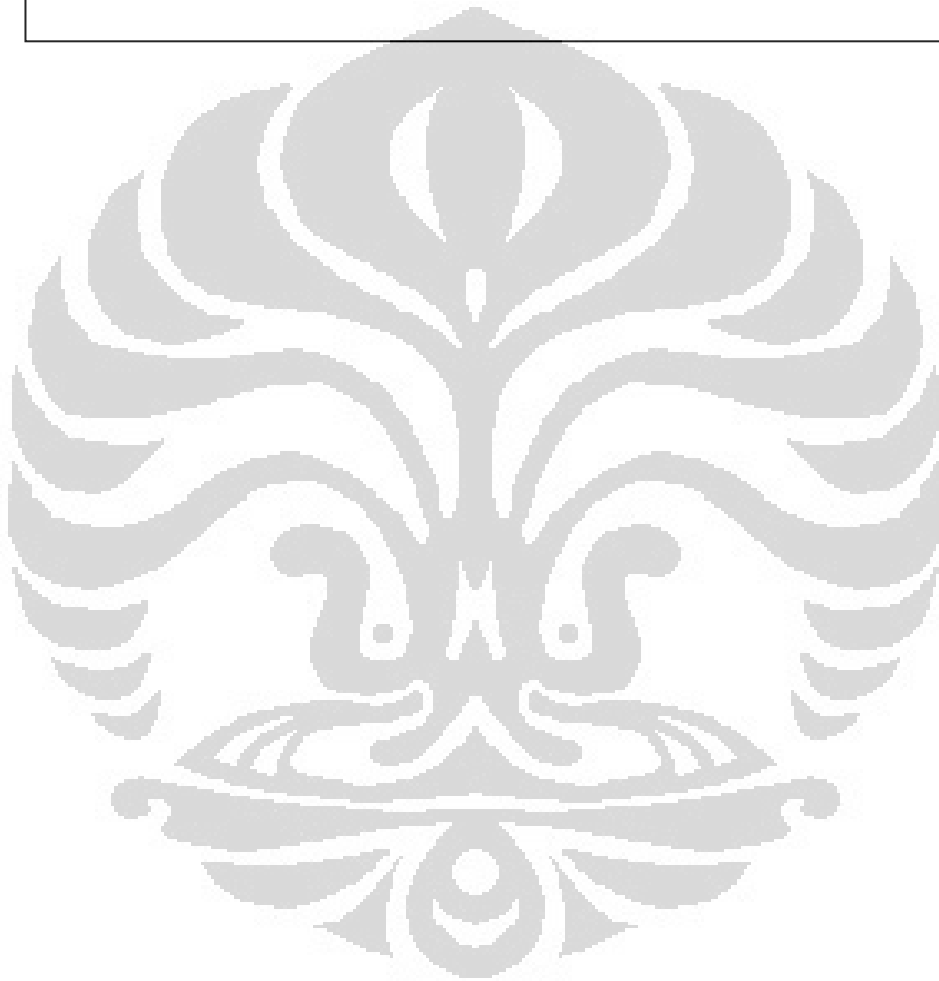
Ket:
 $\sum X_i$ = Jumlah semua nilai data
 N = Jumlah data

Nilai standar deviasi dihitung berdasarkan Hogg dan Craig (1995: 58) dengan rumus sebagai berikut:

$$S = \sqrt{\frac{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{N}}{N-1}}$$

Ket:

- $\sum X_i$ = Jumlah semua nilai data
- $\sum X_i^2$ = Jumlah kuadrat semua nilai data
- N = Jumlah data
- S = Standar deviasi



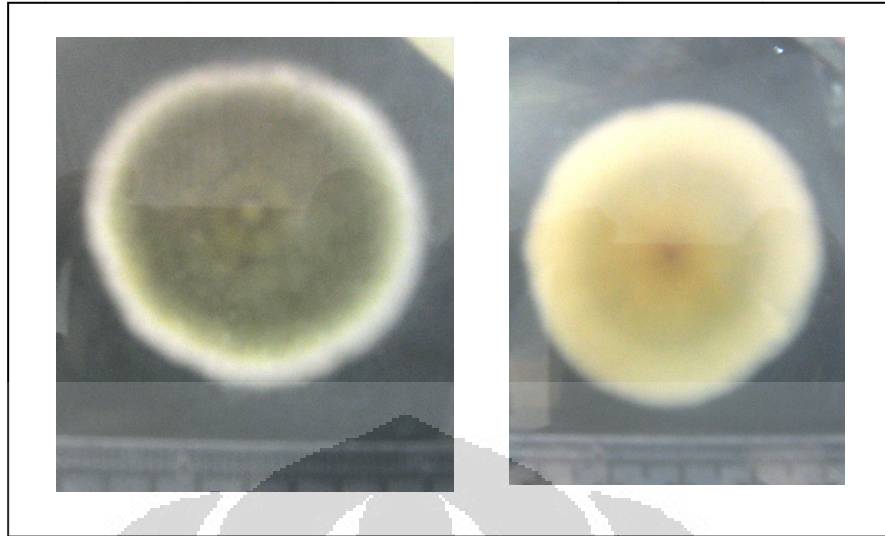
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 PENGAMATAN MORFOLOGI *Metarhizium majus* UICC 295

Deskripsi koloni *Metarhizium majus* UICC 295 berumur 22 hari pada medium *Saboraud Dextrose Yeast Extract Agar* (SDYA) dengan suhu inkubasi 27° C adalah sebagai berikut, koloni memiliki diameter rata-rata 4,2 cm, warna koloni hijau *olive* serta *reverse colony* tidak berwarna atau hialin. Koloni kapang tersebut bertekstur *granular*, menghasilkan *exudate drop* berwarna kuning kecokelatan, memiliki *radial furrow* dan *growing zone*, tetapi tidak memiliki zonasi (Gambar 4.1, Tabel 4.1). Berdasarkan Putra (2009: 62) *M. majus* UICC 295 berumur 22 hari pada SDYA dengan suhu inkubasi 22--27° C, memiliki diameter koloni mencapai 3,6 cm. Massa koloni kapang berwarna hijau *olive* dengan miselium berwarna putih dan sebalik koloni hialin. Koloni kapang memiliki zona pertumbuhan dan tetes eksudat yang berwarna kuning, namun tidak memiliki zonasi dan jari-jari koloni.

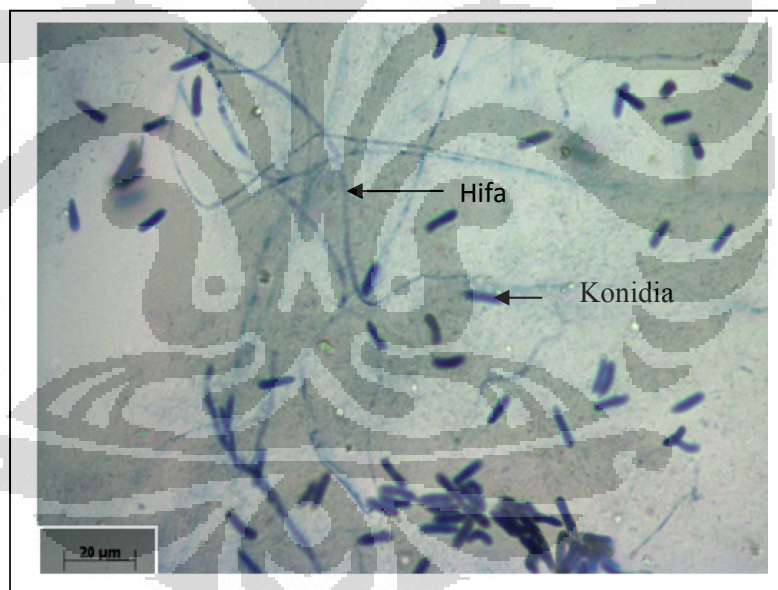
Tabel 4.1. Hasil pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 secara makroskopik koloni umur 22 hari di medium SDYA suhu inkubasi 27° C

Warna	Diameter koloni	Sebalik koloni	Tekstur	<i>Exudate drops</i>	Zonasi	<i>Radial furrow</i>	<i>Growing zone</i>
Hijau <i>olive</i>	4,2 cm	Hialin	Granular	Ada	Tidak ada	Ada	Ada



Gambar 4.1. Morfologi *M. majus* UICC 295 berumur 22 hari suhu inkubasi 27° C pada medium SDYA

Sumber: [Dokumentasi pribadi]



Gambar 4.2. Pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 berumur 22 hari secara mikroskopik suhu inkubasi 27° C pada medium SDYA

Sumber: [Dokumentasi pribadi]

Tabel 4.2. Hasil pengukuran panjang dan lebar konidia *M. majus* UICC 295

Ulangan	Panjang (μm)	Lebar (μm)	Ulangan	Panjang (μm) ²	Lebar (μm)
1	9,170	2,450	11	9,510	3,090
2	9,790	2,360	12	9,390	2,960
3	10,880	2,370	13	8,580	3,100
4	9,790	2,530	14	8,250	3,000
5	9,220	2,360	15	9,200	2,450
6	9,210	2,940	16	9,830	2,680
7	9,430	2,730	17	10,760	2,600
8	8,860	2,680	18	9,230	2,620
9	10,920	2,180	19	9,430	2,580
10	9,770	2,390	20	10,210	2,190
Kisaran (n=20)				8,250—10,920	2,180—3,100

Tabel 4.3. Hasil pengukuran lebar hifa *M. majus* UICC 295

Ulangan	Lebar (μm)	Ulangan	Lebar (μm)
1	2,070	11	1,550
2	1,220	12	1,790
3	1,680	13	2,470
4	1,720	14	1,630
5	1,550	15	2,120
6	1,630	16	3,010
7	1,820	17	1,820
8	2,060	18	1,790
9	1,630	19	2,030
10	2,330	20	1,720
Kisaran (n= 20)		1,220—3,010	

Konidia kapang berbentuk silindris. Pengukuran konidia kapang menghasilkan nilai panjang konidia 8,250--10,920 μm dan lebar konidia 2,180--3,090 μm . Hifa kapang memiliki lebar 1,220--3,010 μm . Berdasarkan Abdullah 2009 (62--63) hasil pengamatan makroskopik *M. majus* UICC 295 berumur 22 hari pada SDYA dengan suhu inkubasi 22--27° C, menunjukkan bahwa kapang tersebut memiliki hifa serta konidia berbentuk silindris dan memanjang. Berdasarkan Biscoff *dkk.* (2009: 219) ukuran konidia *M. majus* yaitu 8,5--14,5 x 2,5--5,0 μm

4.2 PENGUJIAN SUSPENSI KONIDIA *M. majus* UICC 295 TERHADAP LARVA *O. rhinoceros*

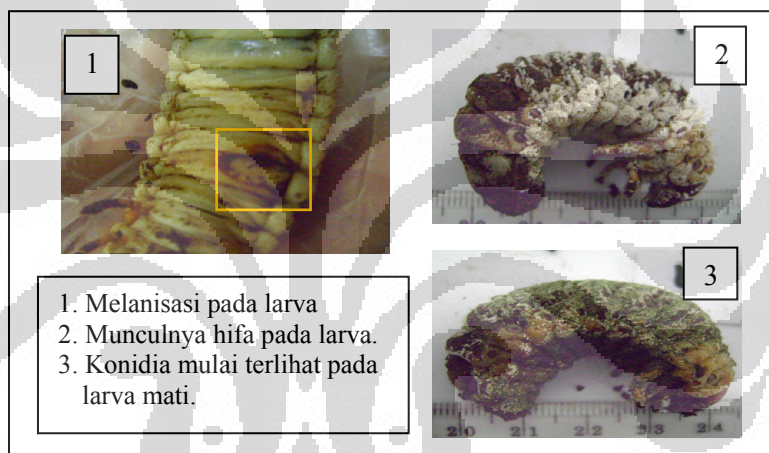
Jumlah konidia/hifa yang digunakan dalam aplikasi dapat menentukan keberhasilan dari aplikasi kapang terhadap serangga. Jumlah konidia/hifa (Tabel 4.4) yang diinokulasikan berkisar $(0,69--1,63) \times 10^6$ CFU/ml. Jumlah tersebut diduga sudah dapat menyebabkan kematian pada larva *O. rhinoceros* yang akan diujikan. Berdasarkan Abdullah (2009: 49--51) konidia/hifa *M. majus* UICC 295 sejumlah 10^6 cfu/ml telah mampu membunuh larva *O. rhinoceros* 100% dalam waktu 14 hari.

Tabel 4.4. Hasil enumerasi *M. majus* UICC 295 berumur 15 hari suhu inkubasi 27° C di medium SDYA

Kapang	Pengenceran	Pengulangan	Σ koloni 4 hari	Σ CFU (CFU/ml)	Standar deviasi	
<i>M. majus</i> UICC 295	10^{-3}	1	71	$0,69 \times 10^6$	$0,54 \pm 0,99 \times 10^6$	
		2	68			
		3	68			
	10^{-4}	1	20	$1,63 \times 10^6$		
		2	16			
		3	13			
	10^{-5}	1	1	$0,66 \times 10^6$		
		2	1			
		3	0			
	Rata-rata			$0,99 \times 10^6$		

Pada pengamatan, melanisasi pertama kali terlihat pada larva kelompok perlakuan pada hari ke-7 setelah inokulasi suspensi konidia, berupa bercak-bercak hitam kecokelatan pada larva kelompok perlakuan (Gambar 4.3). Bercak-bercak dapat terlihat pada bagian abdomen bawah tubuh, di dekat kepala, dan ekor. Bercak-bercak hitam kecokelatan merupakan tanda-tanda melanisasi pada larva yang menunjukkan bahwa terjadi proses infeksi kapang terhadap larva. Pada hari ke-9, mulai terjadi kematian pada beberapa larva kelompok perlakuan diikuti dengan tubuh larva yang mengeras. Sehari setelah kematian larva, hifa kapang berwarna putih mulai terlihat. Tiga hari setelah kematian larva, kapang telah

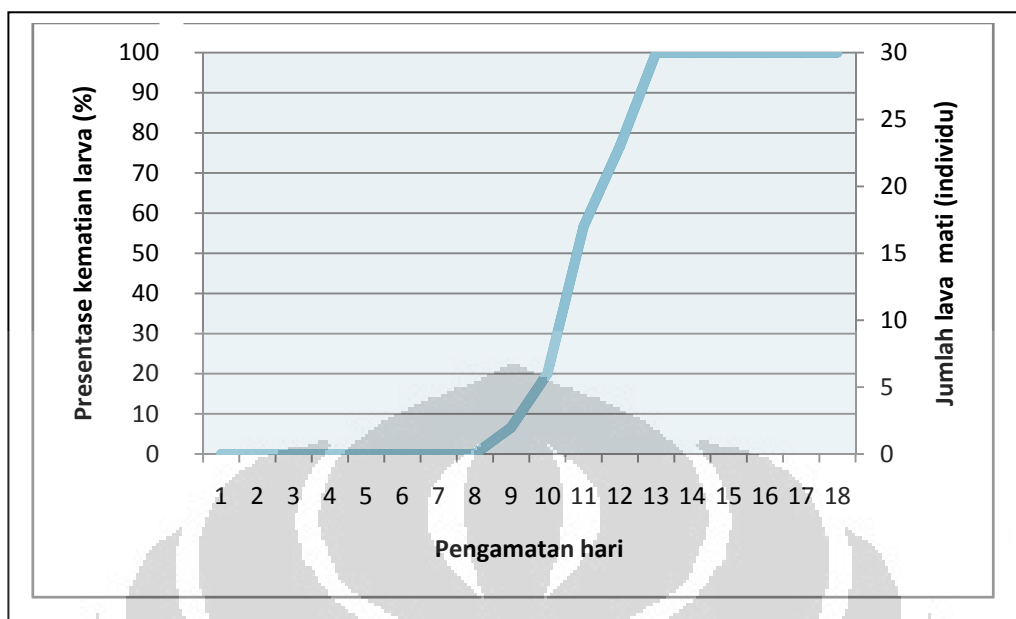
bersporulasi ditandai dengan tubuh larva yang terlihat berwarna hijau. Enam hari setelah kematian larva, kapang yang bersporulasi terlihat telah memenuhi tubuh larva mati. Berdasarkan Samson *dkk.* (1988: 135--138) melanisasi adalah suatu bentuk pertahanan diri yang dilakukan oleh larva terhadap infeksi kapang. Pada saat kapang menginfeksi larva akan terlihat suatu bercak berwarna kehitaman. Bercak hitam tersebut adalah melanin. Melanin dihasilkan dari senyawa fenol yang dikatalisis oleh enzim fenol oksidase pada mekanisme enkapsulasi. Melanin tersebut berfungsi untuk menghambat pertumbuhan kapang yang menginfeksi larva. Berdasarkan Romoser dan Stoffolano (1998: 111--112) melanin akan menyelubungi sel asing yang masuk hingga akhirnya sel asing tersebut mengalami kehancuran.



Gambar 4.3. Gejala melanisasi dan larva mati terinfeksi *M. majus* UICC 295

Sumber: [Dokumentasi pribadi]

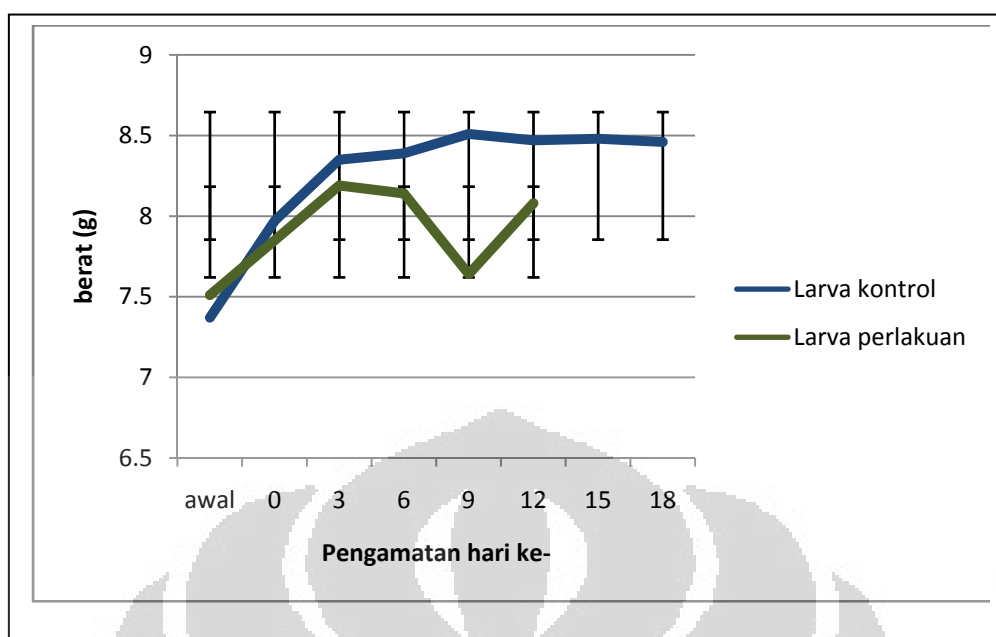
Hasil pengamatan menunjukkan terjadi kematian larva sebanyak 100% selama 13 hari setelah pemberian perlakuan. Persentase kematian larva yaitu, 2 ekor (6,6%) terjadi pada hari ke-9, 4 ekor (13,3%) pada hari ke-10, 11 ekor (43,3%) pada hari ke-11, 6 ekor (20%) pada hari ke-12, 7 ekor (16,6%) pada hari ke-13. Pada kelompok kontrol tidak terjadi kematian setelah pengamatan selama 18 hari.



Gambar 4.4. Grafik kematian larva perlakuan menggunakan aplikasi suspensi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 selama 18 hari pengamatan.

Sumber: [Dokumentasi pribadi]

Hasil pengamatan (Gambar 4.5) dapat terlihat perbandingan berat antara larva kontrol dan larva perlakuan. Penurunan berat rata-rata dapat dilihat pada kelompok larva perlakuan. Penurunan berat diduga akibat sedang terjadi infeksi oleh kapang pada larva. Infeksi kapang menyebabkan penurunan nafsu makan larva yang berakibat pada larva menjadi lemas karena tidak memperoleh nutrisi, sampai larva akhirnya mati. Hasil pengamatan (Tabel 4.7) menunjukkan presentase penurunan berat larva yang diinokulasikan dengan suspensi kapang sebelum terjadi kematian pada larva yang diujikan. Berdasarkan Gupta dan Gopal (2002: 327), gejala serangga yang terserang entomopatogen dapat terlihat dari tubuhnya yang lemas dan penurunan aktivitas makan sehingga terjadi penurunan berat yang berdampak pada kematian larva.



Gambar 4.5. Grafik perbandingan berat larva kontrol dan perlakuan rata-rata selama 18 hari pengamatan.

Sumber: [Dokumentasi pribadi]

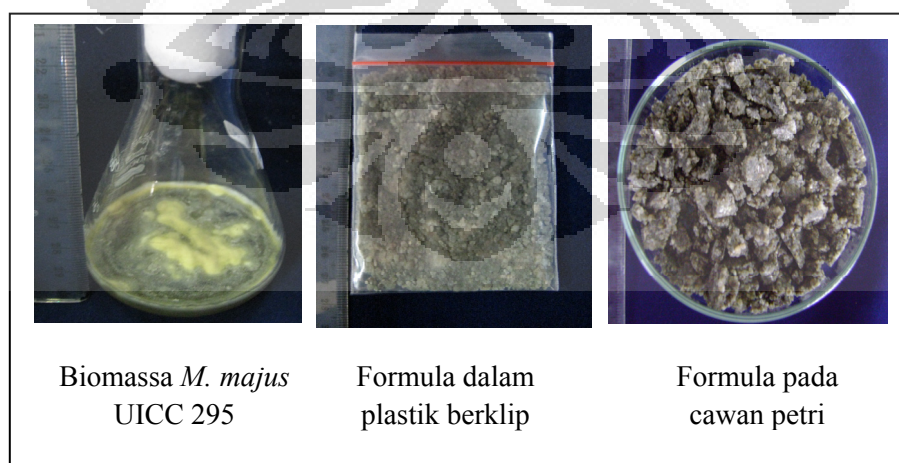
Tabel 4.7. Data populasi larva perlakuan yang mengalami penurunan berat setelah setelah pengujian dengan suspensi konidia/hifa selama 18 hari pengamatan

	Jumlah Larva			
	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12
$\sum X_{\text{turun}}$	6	18	17	2
$\sum X_{\text{mati}}$	0	0	2	21
$\sum X_{\text{total}}$	30	30	28	7
Persentase	20%	60%	60,71%	28,57%

Ket $\sum X_{\text{turun}}$: jumlah populasi larva yang mengalami penurunan berat
 $\sum X_{\text{mati}}$: jumlah larva yang mati pada hari pengamatan
 $\sum X_{\text{total}}$: jumlah larva total yang masih hidup pada saat pengamatan
 Persentase : diperoleh dari $\frac{\sum X_{\text{turun}}}{\sum X_{\text{total}}}$ dikali 100%

4.3 FORMULA *M. majus* UICC 295 DENGAN BAHAN PEMBAWA BERAS

Pada pengamatan hari ke-3 saat proses pengeringan formula *M. majus* UICC 295 terlihat terjadi perubahan warna pada beras dari yang awalnya berwarna putih menjadi kecokelatan. Pada formula *M. majus* UICC 295 yang dikeringkan pada inkubator sederhana, dapat terlihat beras menjadi berwarna kehijauan pada hari ke-5 pengeringan. Warna hijau tersebut merupakan *M. majus* UICC 295 yang telah bersporulasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa *M. majus* UICC 295 tetap melakukan aktivitas metabolisme pada substrat beras. Formula yang telah dihaluskan terlihat berwarna hijau tua dengan tekstur agak kasar. Berdasarkan Ingold (1984: 19) ciri-ciri terjadinya aktivitas metabolisme dan pertumbuhan pada fungi adalah dihasilkannya spora atau konidia, terbentuknya badan buah, terbentuknya hifa, melakukan sporulasi, dan sebagainya. Berdasarkan Madigan *dkk.* (2000: 106) mikroorganisme akan memanfaatkan komponen organik yang ada pada suatu substrat untuk tumbuh dengan cara mensintesis nutrien-nutrien yang ada pada substrat organik. Berdasarkan WHO (1980: 2) *Metarhizium anisopliae* membutuhkan suhu 12--35° C untuk bergerminasi. Pertumbuhan kapang akan berhenti pada suhu 6° C dan mati pada suhu 50° C.



Gambar 4.6. Biomassa *M. majus* UICC 295 umur 15 hari suhu inkubasi 27° C dan hasil formula *M. majus* UICC 295 pada substrat beras.

Sumber: [Dokumentasi pribadi]

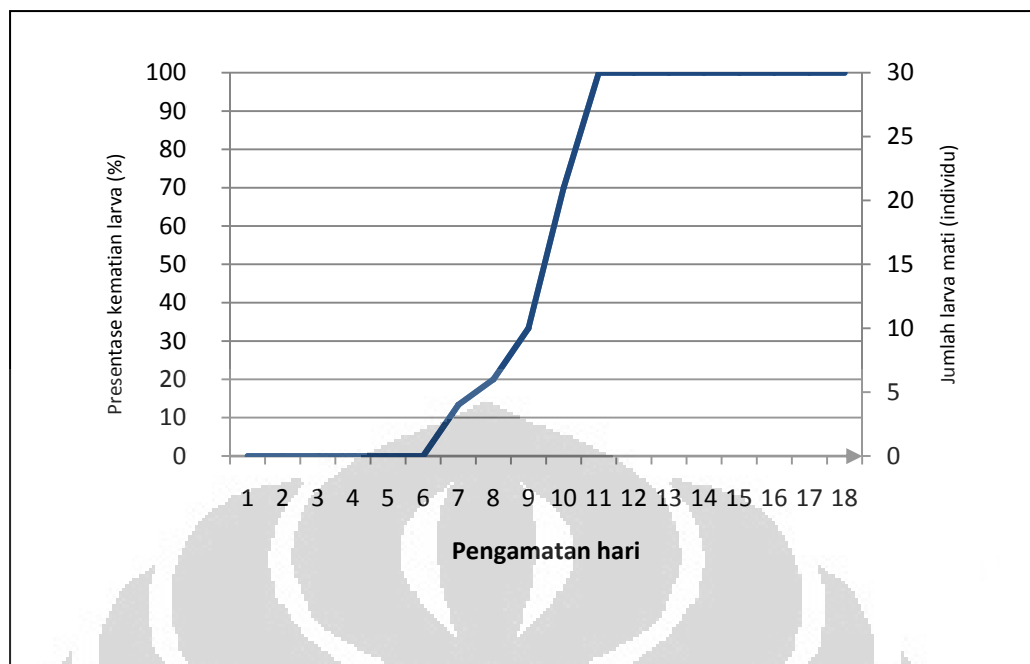
4.4 PENGUJIAN FORMULA *M. majus* UICC 295 PADA LARVA *O. rhinoceros*

Jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 (Tabel 4.9) yang digunakan pada aplikasi kontak langsung menggunakan formula *M. majus* UICC 295 adalah $(0,82-1,7) \times 10^6$ CFU/g.

Hasil pengamatan pada beberapa ekor larva menunjukkan melanisasi pada larva mulai terjadi pada hari ke-5 setelah perlakuan. Kematian pada larva perlakuan (Gambar 4.7) pertama kali terjadi pada hari ke-7 setelah perlakuan yaitu, sebanyak 4 ekor (13,3 %) larva, 2 ekor (6,6%) pada hari ke-8, 4 ekor (13,3%) pada hari ke-9, 11 ekor (36,3%) pada hari ke-10, dan 9 ekor (10%) pada hari ke-11. Pada kelompok kontrol tidak terjadi kematian.

Tabel 4.9. Hasil enumerasi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada formula setelah pengeringan selama 5 hari dengan suhu 30° C

Kapang	Pengenceran	Pengulangan	Σ koloni 4 hari	Σ CFU (CFU/g)	Standar deviasi		
<i>M. majus</i> UICC 295	10 ⁻³	1	82	0,82 x 10 ⁶	0,46±1,17 x 10 ⁶		
		2	78				
		3	87				
	10 ⁻⁴	1	14	1,7 x 10 ⁶			
		2	17				
		3	20				
	10 ⁻⁵	1	2	1 x 10 ⁶			
		2	1				
		3	0				
	Rata-rata					1,17 x 10 ⁶	

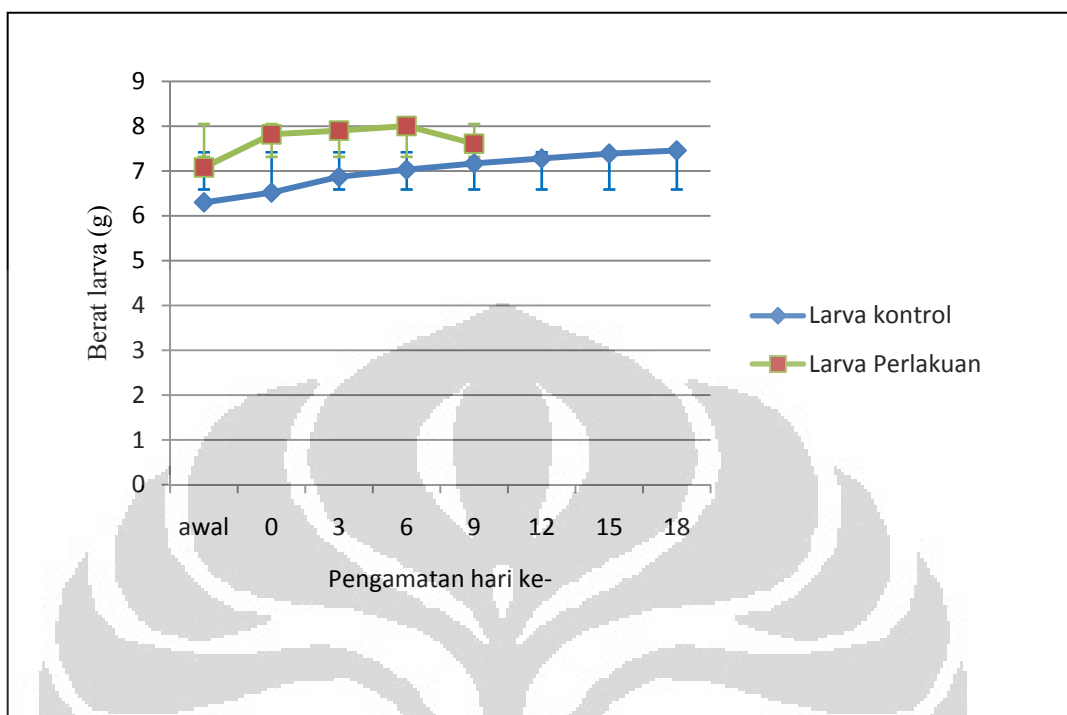


Gambar 4.7. Grafik kematian larva perlakuan selama 18 hari pengamatan menggunakan formula *M. majus* UICC 295

Sumber: [Dokumentasi pribadi]

Perbandingan berat larva kontrol dan perlakuan (Gambar 4.8) kelompok kontrol terlihat terjadi kenaikan berat rata-rata selama 18 hari pengamatan, sedangkan pada kelompok perlakuan terlihat terjadi penurunan berat rata-rata. Hasil pengamatan (tabel 4.12) menunjukkan bahwa penurunan berat rata-rata pada larva kelompok perlakuan dimulai pada penimbangan hari ke-3 dan semakin banyak populasi larva yang mengalami penurunan berat hingga 75% pada penimbangan hari ke-9, dan akhirnya kematian larva 100% terjadi pada hari ke-11. Kematian yang terjadi antara hari ke-7 dan hari ke-11 diduga memiliki korelasi dengan penurunan berat yang terjadi. Persentase penurunan berat diduga merupakan tanda-tanda bahwa infeksi kapang pada larva sedang berlangsung. Infeksi pada larva menyebabkan aktivitas makan larva menjadi berkurang sehingga menyebabkan terjadinya penurunan berat hingga akhirnya larva mengalami kematian. Berdasarkan Sambiran dan Hosang (2007: 5 & 7) gejala infeksi *Metarhizium* pada larva *O. rhinoceros* terlihat dengan gerakan larva menjadi lambat, penurunan aktivitas makan, dan perubahan warna tubuh dari

putih bersih menjadi kusam sampai akhirnya larva mengalami kematian dengan tubuh mengeras.



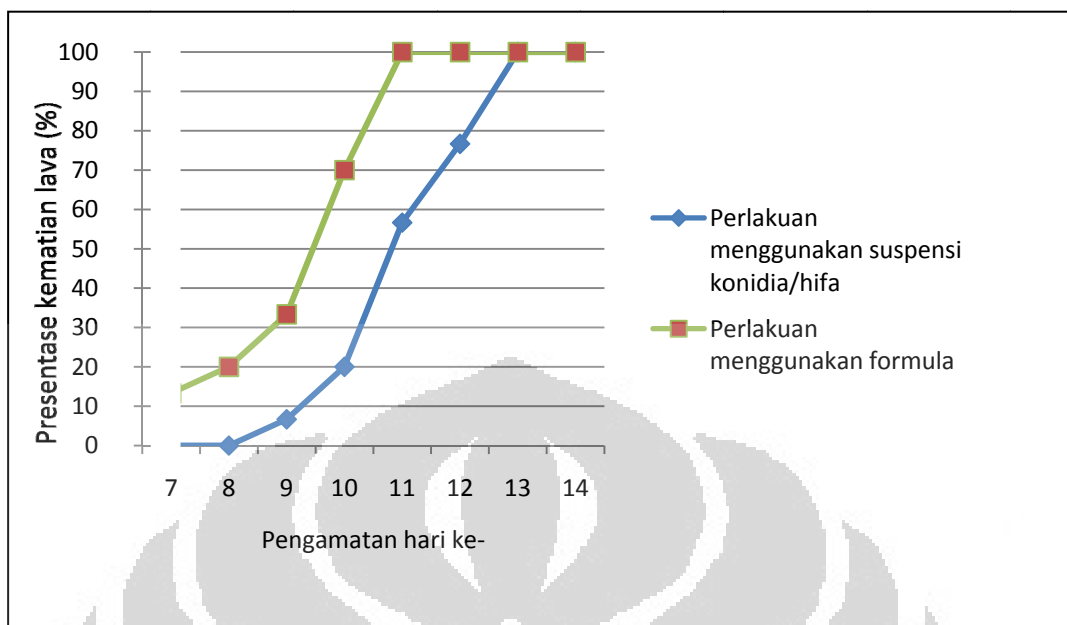
Gambar 4.8. Grafik perbandingan berat larva kontrol dan perlakuan rata-rata selama 18 hari pengamatan.

Sumber: [Dokumentasi pribadi]

Tabel 4.12. Data populasi larva perlakuan yang mengalami penurunan berat setelah inokulasi formula selama 18 hari pengamatan

	Jumlah larva			
	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12
$\sum X_{\text{turun}}$	12	11	15	0
$\sum X_{\text{mati}}$	0	0	10	20
$\sum X_{\text{total}}$	30	30	20	0
Persentase	40%	36,66%	75%	0

Ket $\sum X_{\text{turun}}$: jumlah populasi larva yang mengalami penurunan berat
 $\sum X_{\text{mati}}$: jumlah larva yang mati pada hari pengamatan
 $\sum X_{\text{total}}$: jumlah larva total yang masih hidup pada saat pengamatan
 Persentase : diperoleh dari $\frac{\sum X_{\text{turun}}}{\sum X_{\text{total}}}$ dikali 100%



Gambar 4.9. Grafik perbandingan persentase kematian larva menggunakan aplikasi suspensi konidia/hifa dan menggunakan formula

Sumber: [Dokumentasi pribadi]

Persentase penurunan berat rata-rata larva kelompok perlakuan (Tabel 4.13) dan persentase kematian larva (Gambar 4.9) mengindikasikan virulensi *M. majus* UICC 295 dalam formula dengan virulensi *M. majus* UICC 295 dalam suspensi konidia. Hasil pengamatan menunjukkan proses kematian larva yang diujikan dengan formula *M. majus* UICC 295 lebih cepat yaitu 7--11 hari dibandingkan proses kematian menggunakan suspensi konidia/hifa yaitu 9--13 hari. Proses kematian yang lebih cepat pada pengujian dengan menggunakan formula mengindikasikan bahwa *M. majus* UICC 295 di dalam formula memiliki kemampuan infeksi lebih tinggi dibandingkan dengan *M. majus* UICC 295 di dalam suspensi. Selain itu, jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 di dalam formula lebih banyak dibandingkan jumlah konidia/hifa menggunakan suspensi konidia/hifa, sehingga kesempatan konidia/hifa menginfeksi larva menjadi lebih besar. *Metarhizium majus* UICC 295 pada formula yang digunakan merupakan *M. majus* yang berasal dari larva mati, sedangkan *M. majus* UICC 295 yang digunakan pada suspensi konidia/hifa berasal dari SDYA miring yang telah

dilakukan subkultur beberapa kali pada medium tersebut. Proses subkultur yang dilakukan beberapa kali pada suspensi konidia diduga akan menurunkan kemampuan infeksi dan virulensi kapang. Hal tersebut akan menyebabkan waktu kematian larva menjadi lebih lambat. Penurunan virulensi juga dapat disebabkan perbedaan komposisi antara medium SDYA dengan substrat alami kapang yaitu larva. Pada SDYA tidak ditemukan khitin, sehingga kapang pada SDYA tidak menghasilkan enzim khitinase. Khitinase berperan dalam degradasi khitin pada kutikula sebelum kapang dapat melakukan penetrasi ke tubuh larva. Hal tersebut diduga menyebabkan *M. majus* UICC 295 pada suspensi konidia/hifa perlu melakukan adaptasi yang lebih lama dibandingkan *M. majus* UICC 295 pada formula untuk dapat memproduksi khitin ketika diinokulasikan pada tubuh larva, sehingga akhirnya menyebabkan menurunnya kemampuan kapang dalam mendegradasi kutikula larva yang tersusun atas khitin ketika diaplikasikan. Berdasarkan Prayogo *dkk.* (2005: 22) semakin tinggi kerapatan konidia, semakin tinggi mortalitas pada serangga target. Namun demikian, besarnya kerapatan konidia yang optimal dalam mengendalikan hama tergantung pada jenis serangga yang ingin dikendalikan. Berdasarkan (Herlinda 2006: 75--77) perlakuan subkultur secara terus menerus pada kapang entomopatogen akan menyebabkan penurunan kemampuan virulensi kapang. Untuk mempertahankan kemampuan virulensi kapang entomopatogen kapang perlu ditumbuhkan pada media yang memiliki komposisi yang hampir sama dengan inangnya atau ditumbuhkan pada tubuh serangga inangnya.

4.5 PENGUJIAN VIABILITAS *M. majus* UICC 295

Pengujian viabilitas dilakukan untuk mengetahui kemampuan kapang untuk dapat bertahan hidup pada suatu substrat. Viabilitas konidia/hifa *M. majus* UICC 295 diketahui melalui perbandingan jumlah sel *viable* yang telah diinokulasikan pada substrat beras sebelum penyimpanan dengan jumlah sel *viable* setelah masa penyimpanan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC). Berdasarkan Tortora *dkk.* (2001: 175), metode TPC merupakan metode yang dapat digunakan untuk menghitung jumlah sel *viable* mikroorganisme pada suatu

substrat. Hasil enumerasi jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada formula sebelum pengeringan dapat dilihat pada Tabel 4.15. Jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 di dalam formula bahan pembawa beras sebelum dilakukan proses pengeringan berkisar $(0,76--1) \times 10^6$ CFU/g dengan rata-rata $0,89 \times 10^6$ CFU/g).

Tabel 4.15. Hasil enumerasi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada formula dengan bahan pembawa beras sebelum pengeringan

Kapang	Pengenceran	Pengulangan	Σ koloni 4 hari	Σ CFU (CFU/g)	Standar deviasi	
<i>M. majus</i> UICC 295	10^{-3}	1	97	$0,76 \times 10^6$	$0,1 \pm 0,89 \times 10^6$	
		2	64			
		3	67			
	10^{-4}	1	10	$0,93 \times 10^6$		
		2	11			
		3	7			
	10^{-5}	1	1	1×10^6		
		2	1			
		3	1			
	Rata-rata			$0,89 \times 10^6$		

Hasil enumerasi *M. majus* UICC 295 pada formula yang telah mengalami proses pengeringan dapat dilihat pada Tabel 4.16. Jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 di dalam formula setelah dilakukan proses pengeringan selama 5 hari dengan suhu 30°C berkisar $(0,82--1,7) \times 10^6$ CFU/g atau rata-rata $1,17 \times 10^6$ CFU/g.

Hasil enumerasi menunjukkan adanya perbedaan jumlah konidia/hifa pada formula sebelum pengeringan dan setelah pengeringan. Perbedaan yang dapat teramati yaitu, terjadinya penambahan jumlah konidia/hifa pada formula yang mengalami pengeringan. Hal tersebut diduga terjadi karena kapang bergerminasi pada proses pengeringan dengan suhu 30°C . Germinasi dipicu oleh ketersediaan nutrisi pada substrat beras serta kondisi lingkungan yang mendukung kapang untuk melakukan pertumbuhan. Pertumbuhan menyebabkan terjadinya penambahan jumlah konidia/hifa yang dapat terlihat pada hasil enumerasi (Tabel 4.16). Berdasarkan Dimbi *dkk* (2004: 84), kapang dapat melakukan germinasi pada suhu 30°C , tetapi pertumbuhan kapang entomopatogen berlangsung dengan

lambat karena pada suhu tersebut bukan suhu optimal pertumbuhan kapang entomopatogen.

Tabel 4.16. Hasil enumerasi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada formula setelah pengeringan selama 5 hari dengan suhu 30° C

Kapang	Pengenceran	Pengulangan	Σ koloni 4 hari	Σ CFU (CFU/g)	Standar deviasi		
<i>M. majus</i> UICC 295	10 ⁻³	1	82	0,82 x 10 ⁶	0,46±1,17 x 10 ⁶		
		2	78				
		3	87				
	10 ⁻⁴	1	14	1,7 x 10 ⁶			
		2	17				
		3	20				
	10 ⁻⁵	1	2	1 x 10 ⁶			
		2	1				
		3	0				
	Rata-rata					1,17 x 10 ⁶	

Hasil enumerasi konidia/hifa pada formula yang disimpan selama 30 hari dengan suhu 27° C dapat dilihat pada Tabel 4.17. Jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 hasil formula setelah disimpan selama 30 hari pada suhu inkubasi 27° C adalah berkisar (0,46--1,06) x 10⁵ CFU/g dengan rata-rata 0,72 x 10⁵ CFU/g.

Tabel 4.17. Hasil enumerasi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada formula setelah disimpan selama 30 hari inkubasi 27° C

Kapang	Pengenceran	Pengulangan	Σ koloni 4 hari	Σ CFU (CFU/g)	Standar deviasi		
<i>M. majus</i> UICC 295	10 ⁻²	1	41	0,46 x 10 ⁵	0,92±0,72 x 10 ⁵		
		2	50				
		3	47				
	10 ⁻³	1	11	1,06 x 10 ⁵			
		2	9				
		3	12				
	10 ⁻⁴	1	1	0,66 x 10 ⁵			
		2	0				
		3	1				
	Rata-rata					0,72 x 10 ⁵	

Hasil enumerasi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 yang disimpan selama 30 hari pada suhu 4° C dapat dilihat pada Tabel 4.18. Jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 dalam formula setelah disimpan selama 30 hari pada suhu inkubasi 4° C berkisar (0,7--1,3) x 10⁵ CFU/g atau rata-rata 1,06 x 10⁵ CFU/g.

Tabel 4.18 Hasil enumerasi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada formula setelah disimpan selama 30 hari inkubasi 4° C

Kapang	Pengenceran	Pengulangan	Σ koloni 4 hari	Σ CFU (CFU/g)	Standar deviasi	
<i>M. majus</i> UICC 295	10 ⁻²	1	65	0,7 x 10 ⁵	0,56±1,06 x 10 ⁵	
		2	78			
		3	69			
	10 ⁻³	1	13	1,2 x 10 ⁵		
		2	11			
		3	13			
	10 ⁻⁴	1	2	1,3 x 10 ⁵		
		2	1			
		3	1			
	Rata-rata			1,06 x 10 ⁵		

Viabilitas *M. majus* UICC 295 pada formula setelah penyimpanan dapat dilihat pada Tabel 4.19. Terjadi penurunan viabilitas *M. majus* UICC 295 dalam formula yang disimpan pada suhu 27° C sebesar 93,85% dan dalam formula yang disimpan pada suhu 4° C sebesar 90,95%. Terlihat bahwa terjadi penurunan viabilitas setelah penyimpanan pada dua suhu yang berbeda. Penurunan viabilitas diduga akibat pengemasan yang kurang baik. Hal tersebut disebabkan masih adanya sedikit oksigen yang terdapat pada kemasan. Keberadaan oksigen yang sedikit masih dapat memicu germinasi pada kapang sehingga menyebabkan terjadi pertumbuhan kapang. Namun demikian, pertumbuhan kapang yang terjadi tidak diikuti dengan ketersediaan oksigen yang cukup sehingga berakibat terjadinya kematian pada kapang. Kapang *M. majus* UICC 295 diduga bersifat aerobik obligat yaitu membutuhkan oksigen yang cukup untuk respirasi sehingga kapang dapat melakukan aktivitas hidupnya. Berdasarkan Ingold (1984: 19) oksigen merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi pertumbuhan fungi. Umumnya fungi merupakan mikroorganisme aerobik obligat yang membutuhkan oksigen

untuk melakukan aktivitas metabolismenya. Keberadaan oksigen yang sedikit menyebabkan pertumbuhan fungi menjadi terhambat.

Tabel 4.19. Jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada formula setelah penyimpanan selama 30 hari

Kapang	Jumlah konidia/hifa CFU/g			Viabilitas (%)		Penurunan Viabilitas (%)	
	H ⁰	H ³⁰ 27°	H ³⁰ 4°	H ³⁰ 27°	H ³⁰ 4°	H ³⁰ 27°	H ³⁰ 4°
<i>M. majus</i>	1,17 x	0,72 x	,06 x	6,15	9,05	93,85	90,95
UICC 295	10 ⁶	10 ⁵ 1	10 ⁵				

Ket: H⁰ : sebelum penyimpanan
H³⁰ 4° : setelah 30 hari penyimpanan pada suhu 4° C
H³⁰ 27° : setelah 30 hari penyimpanan pada suhu 27° C

Penyimpanan pada suhu 27° C dan suhu 4° C diduga masih memungkinkan bagi kapang untuk melakukan aktivitas metabolisme. Suhu 27° C diduga merupakan suhu optimal pertumbuhan kapang, sehingga didapat penurunan viabilitas sebesar 93,85%. Suhu 4° C diduga merupakan suhu yang dapat menurunkan aktivitas metabolisme kapang, sehingga didapat penurunan persentase viabilitas sebesar 90,95% atau lebih rendah dibandingkan pada penyimpanan di suhu 27° C. Preservasi perlu dilakukan untuk mencegah penurunan persentase viabilitas *M. majus* UICC 295 pada formula, sebab diduga penyimpanan pada suhu 27° dan 4° C masih belum cukup baik dalam menjaga viabilitas *M. majus* UICC 295. Teknik preservasi yang tepat diduga merupakan cara yang dapat digunakan untuk menjaga viabilitas pada formula *M. majus* UICC 295. Beberapa teknik preservasi yang dapat digunakan meliputi liofilisasi dengan metode *freeze drying* dan *freezing*. Berdasarkan Sly (1984: 34--35) preservasi bertujuan menjaga viabilitas, kestabilan fisiologi, dan genetik mikroorganisme dengan cara menurunkan kecepatan metabolisme atau menyebabkan metabolisme mikroorganisme menjadi tidak aktif. Berdasarkan Ingroff *dkk.* (2004: 1257) *freeze drying* dan *freezing* merupakan metode yang dapat digunakan untuk preservasi mikroorganisme jangka panjang dengan tetap menjaga viabilitas dan kestabilan genetik. Berdasarkan Rey (1975:11) prinsip metode *freezing* adalah menurunkan suhu sampai cairan dalam sel membeku sehingga metabolisme sel terhenti.

Berdasarkan Mikata (1999:72) prinsip metode liquid drying adalah pengeringan sampel fase cair tanpa pembekuan yang dilakukan dalam kondisi vakum hingga suspensi sel menjadi kering.

Pada penelitian ini, pembuatan formula *M. majus* UICC 295 telah berhasil dilakukan. Formula *M. majus* UICC 295 dapat membunuh larva *O. rhinoceros* 100% dan formula dapat disimpan selama 30 hari, walaupun terjadi penurunan viabilitas konidia/hifa lebih besar dari 90%. Hasil penelitian menunjukkan formula *M. majus* UICC 295 dapat dimanfaatkan sebagai bioinsektisida alternatif dalam mengatasi hama *O. rhinoceros*. Melalui penelitian ini, diharapkan pada masa yang akan datang formula *M. majus* UICC 295 dapat diaplikasikan di lapangan dan diproduksi dalam skala industri.



BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

1. Pembuatan formula *Metarhizium majus* UICC 295 dengan media pembawa substrat beras berhasil dilakukan.
2. Formula *Metarhizium majus* UICC 295 dengan jumlah konidia/hifa berkisar $(0,82—1,7) \times 10^6$ CFU/g menghasilkan kematian larva *Oryctes rhinoceros* 100% dalam waktu 11 hari setelah perlakuan, sedangkan perlakuan menggunakan suspensi konidia/hifa dengan jumlah berkisar $(0,69—1,63) \times 10^6$ CFU/g menghasilkan kematian larva 100% dalam waktu 13 hari.
3. Jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada formula sebelum penyimpanan selama 30 hari berkisar $(0,82—1,7) \times 10^6$ CFU/g. Penurunan persentase viabilitas *M. majus* UICC 295 setelah disimpan 30 hari pada penyimpanan suhu 27° C adalah 90,95%, sedangkan penurunan persentase viabilitas pada penyimpanan suhu 4° C adalah 93,85%.

5.2 SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui viabilitas *M. majus* UICC 295 setelah satu hari penyimpanan.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui teknik pengemasan yang lebih baik, sehingga viabilitas *M. majus* UICC 295 dalam formula dapat terjaga dan dapat dimanfaatkan dalam jangka waktu yang lebih lama.

DAFTAR REFERENSI

- Abdullah, W. 2009. Isolasi dan pengujian kemampuan *Metarhizium majus* (Johnst.) Bisch., Rehner & Humber sebagai kapang entomopatogen dengan metode pakan pada larva *Oryctes rhinoceros* Linn. Skripsi Sarjana Departemen Biologi FMIPA UI Universitas Indonesia: xi + 103 hlm.
- Ahmad, R. Z. 2008. Pemanfaatan cendawan untuk meningkatkan produktivitas dan kesehatan ternak. *Jurnal Litbang Pertanian* 27(3),84--92.
- Ansari, M. A., S. Carpenter, & T. M. Butt. 2010. Susceptibility of *Culicoides* biting midge larvae to the insect-pathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*: Prospects for bluetongue vector control. *Acta Tropica*. (113): 1--6.
- Baringbing, W. A. 1991. Hama kumbang kelapa *Oryctes rhinoceros* Linnaeus dan cara pengendaliannya. *Dalam*: Sriwulan, I., W. Rumini & W. A. Barimbing (eds.). 1991. *Kumpulan makalah seminar tahun 1990/1991*. Departemen Pertanian, (?): 55--62.
- Baringbing, W. A. 1994. Pengendalian *Oryctes rhinoceros* Linnaeus di kecamatan Terbanggi Besar Lampung Tengah. *Forum Komunikasi Penelitian Kelapa dan Palma* 425(10): 18--23.
- Balai Penelitian Kelapa. 1989. *Pengendalian kumbang kelapa secara terpadu*. Direktorat Perlindungan Tanaman Perkebunan, (?): ii + 29 hlm.
- Benjamin, Michael A., E. Zhioua, & R. S. Ostfeld. 2002. Laboratory and field evaluation of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol*, 39(5): 723--728.
- Bischoff, J. F., S.A. Rehner, & R. A. Humber 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* 101: 512--530.
- Cappuccino, J. G. & Sherman, N. 1996. *Microbiology: A Laboratory manual*. Benjamin Cummings, San Francisco: xvi + 491 hlm.
- Carlile, M. & S. C. Watkinson. 1995. *The fungi*. Academic Press, London: xiv + 482 hlm

- Carlile, Michael J., Sarah C. Watkinson, & G. W. Gooday. 2001. *The fungi second edition*. Academic Press, California: xix + 588 hlm.
- Crueger, W. & A. Crueger. 1982. *Biotechnology: A textbook of industrial microbiology*. Science Tech, Inc., Madison: x + 308 hlm.
- Direktorat Jenderal Perkebunan. 2008. Standar operasional penanganan terhadap hama kumbang kelapa. Direktorat Jenderal Perkebunan: 1--7 hlm.
- Dimbi, S., N. K. Maniania, S. A. Lux & J. M. Mueke. 2004. Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. *Bio. Control* **49**: 83--94.
- Departemen Pertanian. 1993. *Baku operasional pengendalian terpadu hama kumbang kelapa (Oryctes rhinoceros L.)*. Direktorat Bina Perlindungan Tanaman Perkebunan, Jakarta: iv + 17 hlm.
- Desyanti, Y.S. Hadi, S. Yusuf & T. Santoso. 2007. Keefektifan beberapa spesies cendawan entomopatogen untuk mengendalikan rayap tanah *Coptotermes gestroi* WASMANN (Isoptera: Rhinotermitidae) dengan metode kontak dan umpan. *Jurnal Ilmu & Teknologi Kayu Tropis* **5(2)**:68—77.
- Driver, F., R. J. Milner & W. H. Trueman. 2000. A taxonomic revision of *Metahizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycology* **104(2)**: 134--150.
- Federici, B. A. & J. V. Maddox. 1996. Host specificity in microbe-insect interactions: Insect control by bacterial, fungal, and viral pathogens. *Bio Sci.* **46(6)**: 410—421.
- Feng, M. G., T. J. Poprawski, & G. G. Khachatourians. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol science and Technology*. **?(4)**: 3—34.
- Frei, Michael., & Klaus Becker. 2004. *On rice, biodiversity & nutrients*. Institute of Animal Production in the Tropics and Subtropics, Jerman: 20 hlm.
- Gandjar, I., I. R. Koentjoro, W. Manguwardoyo & L. Soebagya. 1992. *Pedoman praktikum mikrobiologi dasar*. Jurusan Biologi Universitas Indonesia, Depok: vii + 87 hlm.

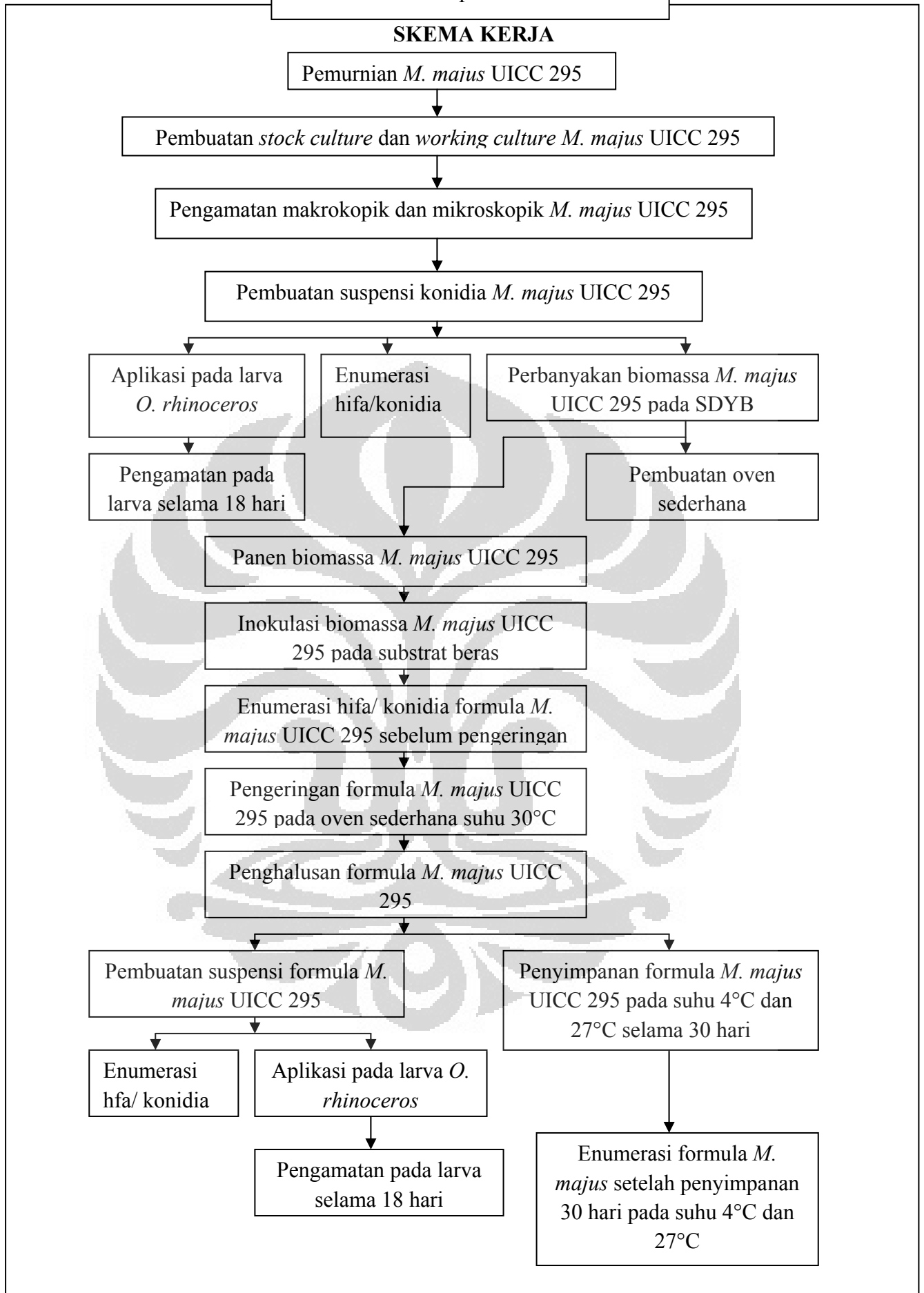
- Gandjar, I., R. A. Samson, K. van den Tweel-Vermeulen, A. Oetari & I. Santoso. 1999. *Pengenalan kapang tropik umum*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta: xiii + 136 hlm.
- Gandjar, I. & W. Sjamsuridzal. 2006. Mikologi: dasar dan terapan. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta: 10--22.
- Gupta, A. & M. Gopal. 2002. Aflatoxin production by *Aspergillus flavu* isolates pathogenic to coconut insect pests. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **18**: 325—331.
- Hajek, A. E., S. P. Wraight & J. D. Vandenberg. 2001. Control of arthropod using pathogenic fungi. *Dalam*: Pointing, S. B. & K. D. Hyde (eds.). 2001. *Bio-exploitation of filamentous fungi*. Fungal Diversity Press, Hong Kong: 309—347.
- Herlinda, S., M.D. Utama, Y. Pujiastuti, & Suwandi. 2006. Kerapatan dan viabilitas spora *Beauveria bassiana* (Bals.) akibat subkultur dan pengayaan media, serta virulensinya terhadap larva *Plutella xylostella* (Linn.). *J. HPT Tropika* **6**(2): 70--78.
- Hog, R. V., & A. T. Craig. 1995. Introduction to mathematical statistics fifth edition. Prentice Hall, Inc. New Jersey: xi + 564 hlm.
- Hosang, M. L. A., J. C. Alouw, & S. Sabbatoelah. 2008. Penerapan teknologi PHT untuk hama *Oryctes*, *Sexava* dan *Brontispa*. *Dalam*: Karmawati, E., H.T. Luntungan, I.N. Maya, I.K. Ardana & Susilowati. 2006. *Prosiding Konperensi Nasional Kelapa VI: Revitalisasi Perkelapaan Melalui Pengembangan Produk Kesehatan dan Energi Alternatif. Buku-1*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan, (?): 123--143.
- Hosang, M.L.A., S. Sabatoellah & F. Tumewan. 2006. Penerapan teknologi PHT untuk hama *Oryctes*, *Sexava* dan *Brontispa*. *Dalam*: Karmawati, E., H.T. Luntungan, I.N. Maya, I.K. Ardana & Susilowati. 2006. *Prosiding Konperensi Nasional Kelapa VI: Revitalisasi Perkelapaan Melalui Pengembangan Produk Kesehatan dan Energi Alternatif. Buku-1*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan, (?): 123--143.

- Ignoffo, C. M. 1981. Living microbial insecticides. *Dalam*: Norris, J. R. & M. H. Richmond. 1981. *Essays in applied microbiology*. John Wiley & Sons,Chicester: xvi + 576 hlm.
- Ihsan, Farihul & Liza Octriana. 2009. Teknik pengujian efektivitas jamur entomopatogen *Beauveria bassiana* pada media pembawa substrat beras dan jagung untuk mengendalikan lalat buah semilapang. *Buletin Teknik Pertanian* **14**(2): 62-64.
- Ingold, C. T. 1984. *The biology of fungi*. Hutchinson & Co. Ltd. London: 150 hlm.
- Ingroff, A. E., D. Montero, E. M. Mazuelos. 2004. Long term preservation of fungal isolate in commercially prepared cryogenic micribank vials. *Journal of Clinical Microbiology* **42**(3): 1257--1259.
- Liu,Z. Y., Z. Q. Liang, A. J. S. Whalley, Y. J. Yao, & A. Y. Liu. 2001.*Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*.*Journal of invertebrate pathology* **78**(?): 178—182.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, P. V. Dunlap & D. P. Clark. 2000. *Brock biology of microorganisms*. Pearson Benjamin Cummings, San Fransisco: xxviii + 1061 hlm.
- Magalhaes, B. P., J. C. V. Rodrigues, D. G. Boucias, & C. C. Childers. 2005. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* var. *Acridum* to the false spider mite *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). *Florida Entomologist*, **88**(2): 195—198.
- Mawikere, J., F. Tumewan, M. L. A. Hosang, & A. A. Lolong. 1989. Pemeliharaan kumbang kelapa *Oryctes rhinoceros* di laboratorium. *Buletin Pertanian*, **?**(9): 21—29.
- McEvoy, P. B. 1996. Host specifity and biological pest control. *Bioscience* **4**(6): 401—405.
- Mikata, K. 1999. Preservation of yeast cultures by 1-drying: Viability after 15 years storage at 5° C. *The Institute for Fermentation, Osaka Research Communication* **19**(?): 71--82.
- Nayar, K.K., T.N. Ananthkrishnan & B.V. David. 1976. *General and applied*

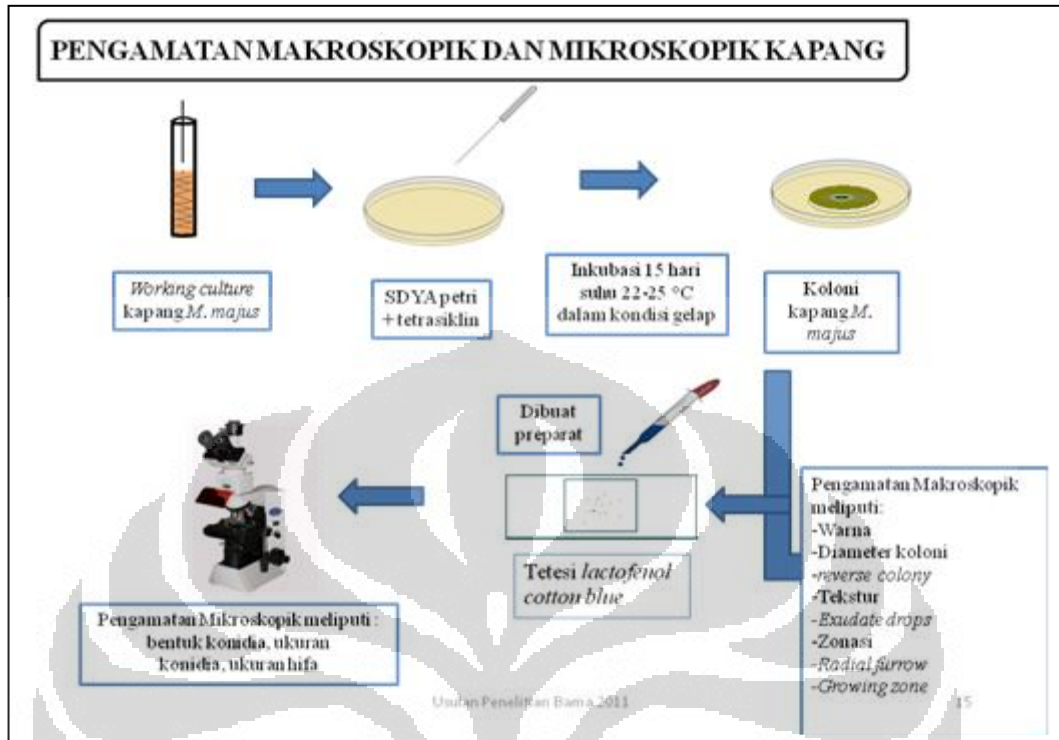
- entomology*. Tata McGraw-Hill, New Delhi: xii + 589 hlm.
- Nishi, O., K. Iiyama, C. Yasunaga-Aoki, & S. Shimizu. 2010. Incongruence between EF-1 α phylogeny and morphology of *Metarhizium majus* and *Metarhizium guizhouense* in Japan. *Entomtech* **34**: 19--23.
- Okaraonye, C.C. & J. C. Ikewuchi. 2009. Nutritional potential of *Oryctes rhinoceros* larva. *Pakistan Journal of Nutrition*, **8**(1): 35—38.
- Pracaya. 2007. *Hama dan penyakit tanaman. Edisi revisi*. Penebar Swadaya, Depok: 427 hlm
- Prayogo, Y., W. Tengkanoo & Marwoto. 2005. Prospek cendawan entomopatogen *Metarhizium anisopliae* untuk mengendalikan ulat grayak *Spodoptera litura* pada kedelai. *Jurnal Litbang Pertanian* **24**(1): 19--26.
- Putra, R. P. 2009. Isolasi dan pengujian kemampuan *Metarhizium majus* (Johnst.) Bisch., Rehner & Humber sebagai kapang entomopatogen dengan metode kontak langsung pada larva *Oryctes rhinoceros* Linn. Skripsi Sarjana Departemen Biologi FMIPA UI Universitas Indonesia: xii + 125 hlm.
- Rey, L. 1975. Freezing and freeze drying. *Great Britain* **191**: 9--19.
- Romoser, W.S. & J.G. Stoffolano. 1998. *The science of entomology*. McGraw-Hill, Boston: xiv + 605 hlm.
- Rodrigues, S., R. Peveling, P. Nagel, & S. Keller. 2005. The natural distribution of the entomopathogenic soil fungus *Metarhizium anisopliae* in different regions and habitat types in Switzerland. *Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes: Melolontha*, **28**(2): 185—188.
- Rumini, W. 1992. Pengendalian hama tanaman kelapa. *Dalam*: Rumini, W. & H. T. Luntungan (eds.). 1992. *Kumpulan makalah temu lapang di Sub Balitka Pakuwon*. Departemen Pertanian. (?): 36--43.
- Ruskandi & O. Setiawan. 2004. Teknik pengendalian hama pemakan daun kelapa. *Buletin Teknik Pertanian* **9**(2): 70--72.
- Samuels, R. I., 1998. Systematics, morphology and physiology: A sensitive bioassay for dextruxins, cyclodepsipeptides from the culture filtrates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *An. Soc. Entomol.* **27**(2): 229--235.
- Sembel, D. T. 2010. *Pengendalian hayati*. Penerbit Andi Yogyakarta.

- Yogyakarta: xvi+282 hlm.
- Shah, P. A & J. K. Pell. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**(?): 413--423.
- Shimazu, M. 2004. A novel technique to inoculate conidia of entomopathogenic fungi and its application for investigation of susceptibility of the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*, to *Beauveria bassiana*. *Applied Entomology and Zoology* **39**(3): 485--490.
- Skrobek, A., Farroq A. S. & Tariq M. B. 2007. Destruzin production by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* in insects and factors influencing their degradation. *BioContol.* **53**(?): 361--373.
- Sly, L.I.1984. The role of culture collectin in microbiology and biotechnology. *Dalam: Atthasampunna.* 1984. *Yeast: Their identification preservation and use in Biotechnology.* Bangkok Mircen, Bangkok: 14--57.
- Soebandrijo & E.A. Wikardi. 1988. Pengelolaan serangga hama *Oryctes rhinoceros* L. *Dalam: Soehardjan, M., D. Sitepu & Darwis.* 1988. *Prosiding Seminar Proteksi Tanaman Kelapa.* Seminar Proteksi Tanaman Kelapa, Bogor, Mei 8--10, 1985. Departemen Pertanian, (?): 43--55.
- Suwahyono, U. 2010. *Biopestisida, cara membuat dan petunjuk penggunaan.* Penebar Swadaya, Jakarta: iv+164 hlm.
- Talaro, K. P. 2008. *Foundation in microbiology seventh edition.* McGraw Hill. New York: xxxi + 830.
- Tzean, S. S., L. S. Hsieh & W. J. Wu. 1997. *Atlas of entomopathogenic fungi from Taiwan.* Council of Agriculture, Taipei: vii + 214 hlm.
- Wahyudi, P. 2008. Enkapsulasi propagul jamur entomopatogen *Beauveria bassiana* menggunakan alginat dan pati jagung sebagai produk mikoinsektisida. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia.* **6**(2): 51—56.
- Wang, C. & R. J. St. Leger. 2006. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *PNAS* **103**(17): 6647—6652.
- World Health Organization (WHO). 1980. *Data sheet on the biological control agent Metarhizium anisopliae (Metchnikoff), 1883.* WHO, Geneva: 9 hlm.

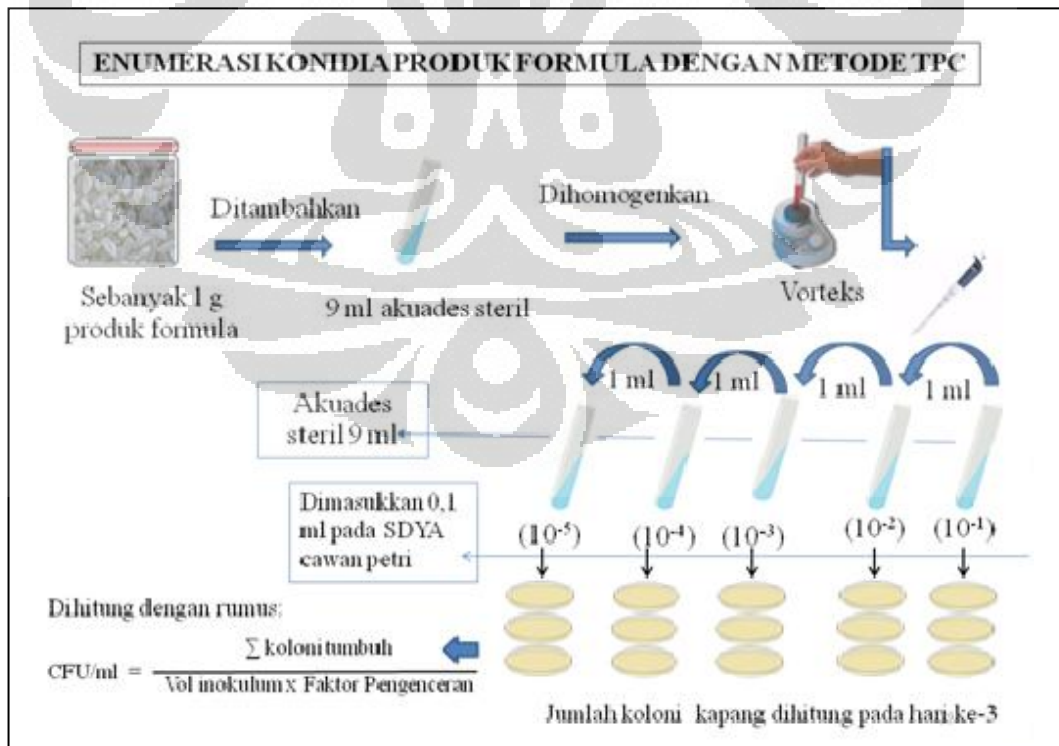
SKEMA KERJA



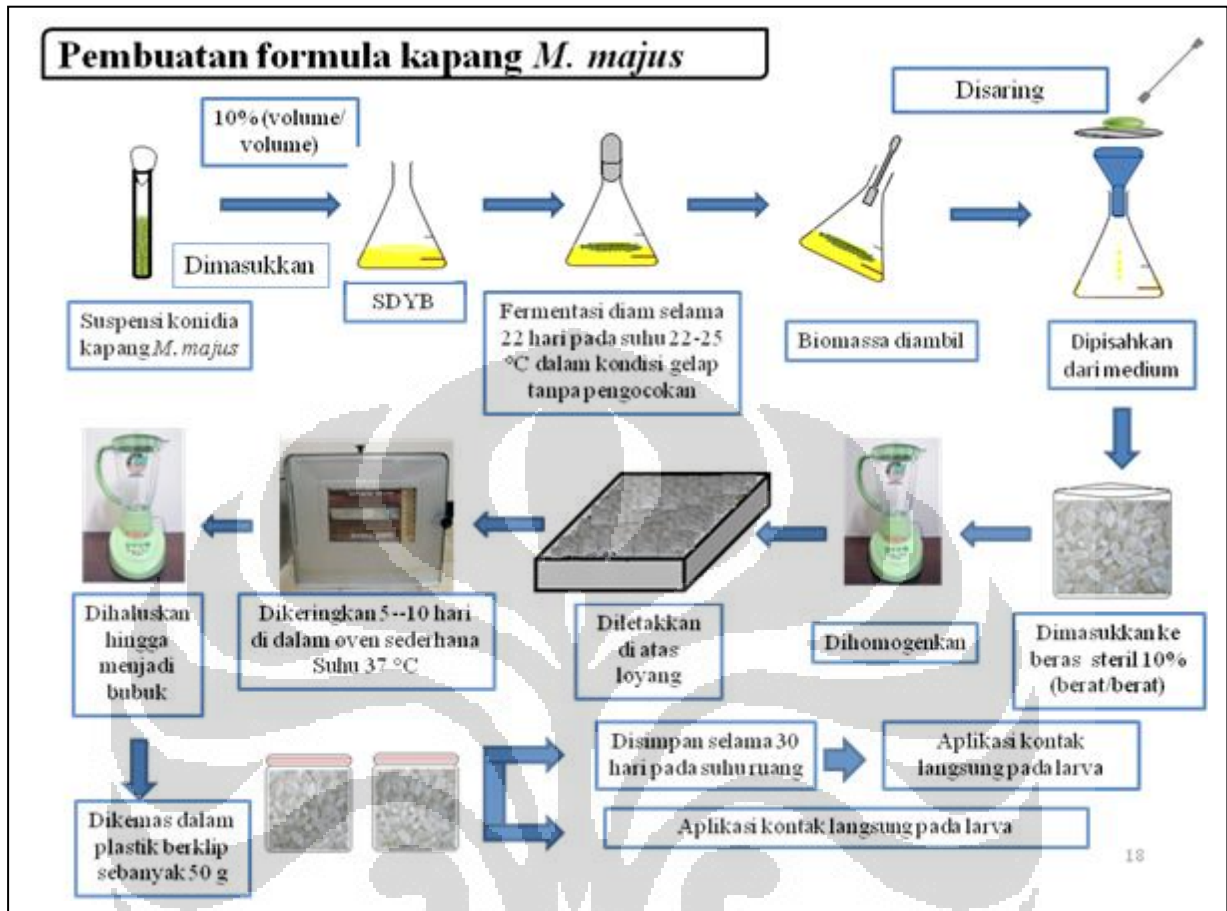
Lampiran 2
Pengamatan Makroskopik dan Mikroskopik



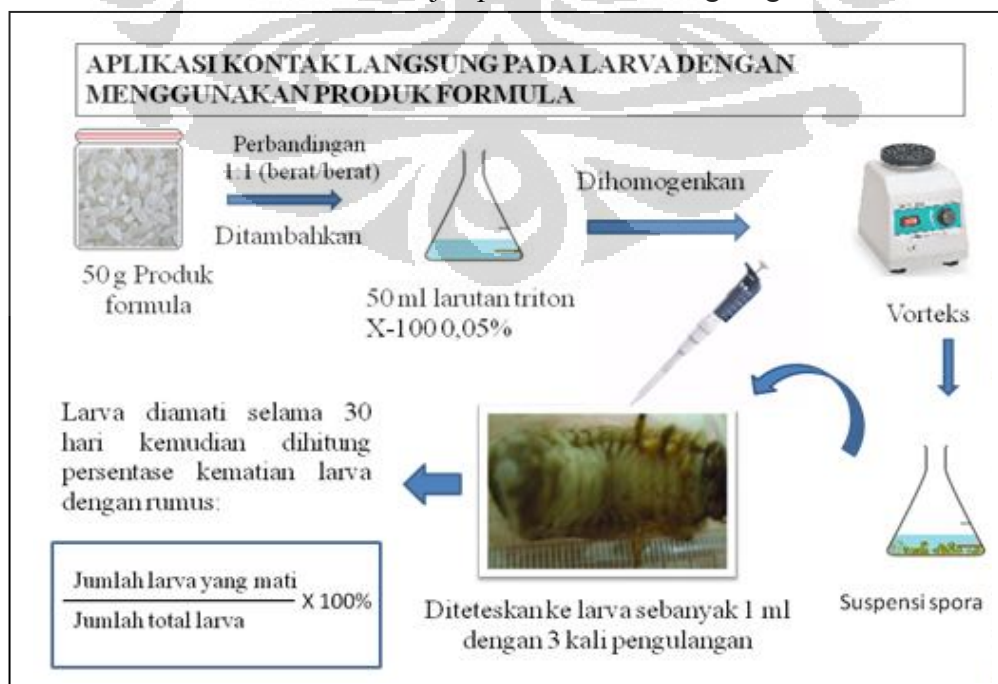
Lampiran 3
Skema kerja enumerasi formula



Lampiran 4
Skema kerja pembuatan formula kapang *M. majus* UICC 295 pada substrat beras.



Lampiran 5
Skema kerja aplikasi kontak langsung



Lampiran 6. Jumlah larva yang mati, kelembaban relatif, dan suhu ruang selama 18 hari pengamatan.

Hari ke-	Jumlah larva yang mati				Total larva mati per hari	Kelembaban relatif (%)	Suhu Ruang (°C)
	Kelompok Perlakuan I	Kelompok Perlakuan II	Kelompok Perlakuan III	Kelompok Kontrol			
0	Aplikasi dilakukan	Aplikasi dilakukan	Aplikasi dilakukan	Aplikasi dilakukan	-	84	26,3
1	-	-	-	-	-	84	25,9
2	-	-	-	-	-	94	26,3
3	-	-	-	-	-	94	25,9
4	-	-	-	-	-	95	26,3
5	-	-	-	-	-	96	26,2
6	-	-	-	-	-	92	25,8
7	-	-	-	-	-	93	26,1
8	-	-	-	-	-	96	25,6
9	1	1	-	-	2	97	25,8
10	1	1	2	-	4	96	25,6
11	2	2	7	-	11	92	26,1
12	2	3	1	-	6	89	26,3
13	4	3	-	-	7	97	26,1
14	-	-	-	-	-	88	26,4
15	-	-	-	-	-	85	26,5
16	-	-	-	-	-	89	26,8
17	-	-	-	-	-	91	26,2
18	-	-	-	-	-	96	25,9
Total	10	10	10	-	30	-	-

Lampiran 7. Penimbangan berat larva yang masih hidup setelah aplikasi selama 18 hari pengamatan.

Kode Larva	Berat awal	Aplikasi dilakukan						
		Penimbangan ke-						6
		Hari ke-0	1	2	3	4	5	
		Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15	Hari ke-18	
KK 1	6,8	7,3	7,9	8,1	7,9	8,3	8,0	8,0
KK 2	7,0	7,5	7,9	8,2	8,2	8,0	8,1	8,1
KK 3	7,1	7,9	7,8	7,8	8,1	7,7	7,9	7,7
KK 4	7,3	7,8	8,7	8,1	8,9	8,9	8,5	8,5
KK 5	7,4	7,9	8,0	8,1	8,5	8,2	8,2	8,0
KK 6	7,4	8,1	8,8	8,1	8,6	8,6	8,6	8,7
KK 7	7,6	8,8	8,1	8,2	7,9	8,1	8,3	8,3
KK 8	7,6	7,8	9,1	9,5	9,2	9,0	9,0	9,2
KK 9	7,7	8,1	8,7	8,8	9,0	9,3	9,3	9,3
KK 10	7,8	8,5	8,5	9,0	8,8	8,6	8,9	8,8
Rata-rata	7,37	7,97	8,35	8,39	8,51	8,47	8,48	8,46
Sd	0,32±	0,43±	0,46±	0,53±	0,46±	0,49±	0,46±	0,53±
KP 1.1	6,8	7,4	7,4	7,2	-	-	-	-
KP 1.2	6,9	7,5	7,5	7,3	6,1	-	-	-
KP 1.3	6,9	7,2	7,9	8,6	7,3	-	-	-
KP 1.4	7,0	7,3	8,2	8,0	8,2	-	-	-
KP 1.5	7,0	7,3	7,4	7,9	8,4	-	-	-
KP 1.6	7,1	7,8	7,7	7,5	7,0	-	-	-
KP 1.7	7,2	7,5	8,1	7,4	7,7	8,2	-	-
KP 1.8	7,3	7,5	8,6	8,4	7,7	8,0	-	-
KP 1.9	7,4	7,5	7,7	8,2	8,4	8,4	-	-
KP 1.10	7,4	7,3	8,4	8,6	8,5	8,1	-	-
KP 2.1	7,4	7,6	8,0	8,6	8,0	-	-	-
KP 2.2	7,4	7,7	8,5	8,3	7,0	-	-	-
KP 2.3	7,4	7,8	8,3	9,0	8,7	-	-	-
KP 2.4	7,4	8,1	9,3	8,9	7,8	-	-	-
KP 2.5	7,4	7,6	8,0	7,7	8,6	8,2	-	-
KP 2.6	7,5	8,1	8,3	8,3	8,4	8,4	-	-
KP 2.7	7,6	7,8	6,9	7,8	7,1	7,3	-	-
KP 2.8	7,6	8,2	7,8	7,8	-	-	-	-
KP 2.9	7,6	7,9	8,0	7,7	6,9	-	-	-
KP 2.10	7,6	7,7	7,3	7,7	7,0	-	-	-
KP 3.1	7,8	8,7	8,3	8,5	8,5	-	-	-
KP 3.2	7,8	7,7	8,6	8,3	8,3	-	-	-
KP 3.3	7,8	8,3	9,2	8,2	7,9	-	-	-
KP 3.4	7,9	7,9	8,3	7,7	7,7	-	-	-
KP 3.5	7,9	8,3	8,7	8,6	8,1	-	-	-
KP 3.6	8,0	8,0	8,5	8,0	7,9	-	-	-
KP 3.7	8,0	8,5	8,1	8,9	9,0	-	-	-
KP 3.8	8,0	8,2	8,7	8,4	7,8	-	-	-
KP 3.9	8,1	8,3	8,7	8,3	8,8	-	-	-
KP 3.10	8,1	9,0	9,5	8,4	7,8	-	-	-
Rata-rata	7,51	7,85	8,19	8,14	7,64	8,08	-	-
Sd	0,37±	0,44±	0,59±	0,48±	0,63±	0,37±	-	-

Lampiran 8. Jumlah larva yang mati, kelembaban relatif, dan suhu ruang selama 18 hari pengamatan.

Hari ke-	Jumlah larva yang mati				Total larva mati per hari	Kelembaban relatif (%)	Suhu Ruang (°C)
	Kelompok Perlakuan I	Kelompok Perlakuan II	Kelompok Perlakuan III	Kelompok kontrol			
0	Aplikasi dilakukan	Aplikasi dilakukan	Aplikasi dilakukan	Aplikasi dilakukan		90	26,3
1	-	-	-	-	-	88	25,9
2	-	-	-	-	-	85	25,8
3	-	-	-	-	-	92	26,1
4	-	-	-	-	-	94	25,8
5	-	-	-	-	-	92	25,9
6	-	-	-	-	-	87	26,3
7	2	2	-	-	4	89	26,0
8	1	-	1	-	2	90	26,1
9	1	1	2	-	4	91	25,8
10	3	4	4	-	11	93	26,1
11	3	3	3	-	9	89	25,6
12	-	-	-	-	-	88	25,6
13	-	-	-	-	-	90	25,7
14	-	-	-	-	-	91	26,2
15	-	-	-	-	-	90	25,9
16	-	-	-	-	-	87	26,1
17	-	-	-	-	-	88	26,1
18	-	-	-	-	-	91	25,7
Total	10	10	10	-	30	-	-

Lampiran 9. Penimbangan berat larva yang masih hidup setelah aplikasi selama 18 hari pengamatan.

Kode Larva	Berat awal	Aplikasi Dilakuka		Penimbangan ke-											
		n		1		2		3		4		5		6	
		Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-12	Hari ke-15	Hari ke-15	Hari ke-18	Hari ke-18		
KK 1	6,1	6,3	6,5	6,7	6,8	7,0	7,0	7,3							
KK 2	6,1	6,5	7,0	6,9	6,9	7,2	7,0	7,1							
KK 3	6,1	6,2	6,4	6,7	6,8	6,7	7,1	6,9							
KK 4	6,2	6,4	6,7	6,8	6,9	6,9	7,2	7,4							
KK 5	6,3	6,6	6,3	6,7	7,1	7,3	7,4	7,2							
KK 6	6,4	6,7	7,4	7,4	7,6	7,7	7,6	8,0							
KK 7	6,4	6,3	6,7	6,9	7,0	6,8	7,3	7,3							
KK 8	6,4	6,4	7,0	6,7	6,7	7,1	7,1	6,9							
KK 9	6,5	6,8	7,3	7,2	7,6	8,1	8,0	8,0							
KK 10	6,5	7,0	7,4	8,3	8,3	8,0	8,2	8,5							
Sd	0.16±	0.25±	0.41±	0.50±	0.50±	0.49±	0.42±	0.53±							
Rata-rata	6.3	6.52	6.87	7.03	7.17	7.28	7.39	7.46							
KP 1.1	6,5	7,4	7,2	6,9	-	-	-	-							
KP 1.2	6,6	7,1	7,0	6,7	6,7	-	-	-							
KP 1.3	6,6	6,9	7,3	7,0	-	-	-	-							
KP 1.4	6,6	6,8	6,8	7,3	6,5	-	-	-							
KP 1.5	6,6	6,6	6,7	6,4	-	-	-	-							
KP 1.6	6,6	7,2	7,4	7,5	7,1	-	-	-							
KP 1.7	6,6	7,2	6,8	6,8	-	-	-	-							
KP 1.8	6,7	7,0	7,3	7,2	7,0	-	-	-							
KP 1.9	6,7	7,5	7,8	7,5	7,3	-	-	-							
KP 1.10	6,7	7,4	6,9	7,2	7,4	-	-	-							
KP 2.1	6,7	7,4	7,2	7,5	7,1	-	-	-							
KP 2.2	6,7	8,1	7,7	7,3	-	-	-	-							
KP 2.3	6,8	8,3	8,4	8,0	7,6	-	-	-							
KP 2.4	6,8	7,8	7,0	7,3	-	-	-	-							
KP 2.5	6,8	7,4	7,5	7,6	7,6	-	-	-							
KP 2.6	6,8	7,6	7,2	7,2	6,9	-	-	-							
KP 2.7	6,8	7,1	7,3	7,4	6,7	-	-	-							
KP 2.8	7	7,9	7,3	7,4	7,1	-	-	-							
KP 2.9	7	8,0	8,4	8,5	8,2	-	-	-							
KP 2.10	7	8,2	8,4	8,0	-	-	-	-							
KP 3.1	7,1	7,9	8,3	8,4	8,0	-	-	-							
KP 3.2	7,1	7,7	8,0	8,3	7,5	-	-	-							
KP 3.3	7,2	8,4	8,1	8,7	-	-	-	-							
KP 3.4	7,3	8,1	8,6	8,5	8,6	-	-	-							
KP 3.5	7,3	7,6	7,9	8,2	8,4	-	-	-							
KP 3.6	7,3	7,5	7,8	7,6	-	-	-	-							
KP 3.7	7,4	8,3	7,9	8,1	-	-	-	-							
KP 3.8	7,5	7,8	8,5	8,2	7,7	-	-	-							
KP 3.9	7,5	7,2	8,1	8,4	8,1	-	-	-							
KP 3.10	7,5	8,1	8,4	8,6	8,5	-	-	-							
Rata-rata	7.08	7.82	7.9	8.005	7.61	-	-	-							
Sd	0.31±	0.48±	0.58±	0.63±	0.61±	-	-	-							