



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH PENAMBAHAN TEPUNG CANGKANG
KERANG HIJAU PADA MEDIUM PERTUMBUHAN
TERHADAP KEMAMPUAN *Metarhizium majus* UICC 295
MENGINFEKSI LARVA *Oryctes rhinoceros* Linnaeus**

SKRIPSI

**OKTARINA SUMANDARI
0806453314**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH PENAMBAHAN TEPUNG CANGKANG
KERANG HIJAU PADA MEDIUM PERTUMBUHAN
TERHADAP KEMAMPUAN *Metarhizium majus* UICC 295
MENGINFEKSI LARVA *Oryctes rhinoceros* Linnaeus**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**OKTARINA SUMANDARI
0806453314**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2012**

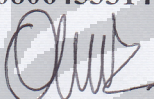
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Oktarina Sumandari

NPM : 0806453314

Tanda tangan

: 

Tanggal : 26 Juni 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Oktarina Sumandari
NPM : 0806453314
Program Studi : S1 Biologi
Judul Skripsi : Pengaruh Penambahan Tepung Cangkang Kerang Hijau pada Medium Pertumbuhan terhadap Kemampuan *Metarhizium majus* UICC 295 Menginfeksi Larva *Oryctes rhinoceros* Linnaeus

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. Anom Bowolaksono (.....

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 26 Juni 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yesus Kristus atas segala anugerah, rahmat, dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian hingga akhir penulisan skripsi. Penulis mengucapkan terima kasih 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)* yang telah membiayai penelitian ini.
3. Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D. dan Dr. Anom Bowolaksono selaku penguji atas saran dan masukan yang diberikan.
4. Dr.rer.nat. Mufti Petala Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Titi Soedjiarti, SU. selaku Koordinator Pendidikan Departemen Biologi FMIPA UI dan seluruh staf pengajar Departemen Biologi FMIPA UI atas bekal ilmu, perhatian dan dukungan kepada penulis.
5. Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. dan Dra. Setiorini, M.Kes. yang telah memberikan saran-saran dan bimbingan kepada penulis.
6. Dr. Susiani Purbaningsih, DEA. selaku Penasihat Akademik atas nasihat, perhatian, dan dukungannya.
7. Ahmad Supriyadi, S.Pi, Asri Martini, S.Si, dan seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA UI atas semua bantuan yang penulis terima.
8. Kedua orang tuaku, Ir. Muntar Adjis Mustafa Sirait dan Frintiana Napitupulu atas doa, kasih sayang, pengertian, pengorbanan, serta dukungan moril dan materil yang selalu diberikan hingga skripsi ini dapat diselesaikan. Saudara-saudaraku tersayang, Monica Marsella, Normaria Mustiana, dan Posma Ayu Erdina atas doa, kasih sayang, dan dukungan yang selalu menjadi motivasi bagi penulis.

9. Rekan-rekan penelitianku, Grand Septia Yama, Nur Amalina Khodijah, Cinthya Karlina, dan Dhian Chitra Ayu atas kebersamaan dalam suka maupun duka selama masa penelitian hingga penulisan skripsi.
10. Teman-temanku, DIVAS (Dhila, Savit, Hanum, Seyla), DEMON (Dessy, Edvan, Michelle, Omen, Alvin), CITRUS (Chiki, Fathon, Rusli, Sentot), dan Putri Pratiwi atas bantuan dan dukungan selama menyelesaikan penelitian ini. LUNA (Galuh, Doni, Bama), RED (Fahreza, Dachniar), NADIN (Hana, Bidin), Kak Dafina, dan Kak Irvan yang telah banyak membantu selama penelitian ini.
11. Jason Fredrick Siregar, S.H., M.H. yang selalu memberikan semangat, perhatian, dan dukungan kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi.
12. Teman-teman BIOSENTRIS, atas pertemanan yang tidak terlupakan. Sahabat-sahabatku tersayang, Visky Rianti, Padmasanti Ugrasmitha, Nova Elizabeth, dan Nona Nainggolan atas persahabatan dan dukungan yang telah diberikan.
13. Bapak Endi dan Bapak Sangsang yang telah membantu menyediakan larva *Oryctes rhinoceros* Linnaeus.
14. Bapak Yaya dan seluruh karyawan *fotocopy* Cenat-cenut atas bantuan yang telah diberikan.
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.

Depok, 26 Juni 2012

Penulis

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

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

Nama : Oktarina Sumandari
NPM : 0806453314
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 :

Pengaruh Penambahan Tepung Cangkang Kerang Hijau pada Medium Pertumbuhan terhadap Kemampuan *Metarhizium majus* UICC 295 Menginfeksi Larva *Oryctes rhinoceros* Linnaeus

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, 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 : 26 Juni 2012

Yang menyatakan



(Oktarina Sumandari)

ABSTRAK

Nama : Oktarina Sumandari
Program Studi : Biologi
Judul : Pengaruh Penambahan Tepung Cangkang Kerang Hijau pada Medium Pertumbuhan terhadap Kemampuan *Metarhizium majus* UICC 295 Menginfeksi Larva *Oryctes rhinoceros* Linnaeus

Metarhizium majus UICC 295 adalah kapang entomopatogen. Penelitian bertujuan mengetahui pengaruh penambahan tepung cangkang kerang hijau terhadap kemampuan *M. majus* UICC 295 menginfeksi larva *O. rhinoceros* dan viabilitas *M. majus* UICC 295 setelah dipreservasi dengan metode *freezing* pada suhu -80°C . *Metarhizium majus* UICC 295 pada medium *Saboraud Dextrose with Yeast Extract Agar* (SDYA) dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) dapat membunuh larva *O. rhinoceros* 6,67%--100% dalam waktu 7--12 hari. *Metarhizium majus* UICC 295 pada medium SDYA dapat membunuh larva *O. rhinoceros* 3,33%--100% dalam waktu 7--11 hari. *Metarhizium majus* UICC 295 setelah dipreservasi selama 30 hari dalam gliserol 10% (v/v) dan dalam gliserol 10% (v/v) dengan glukosa 5% (v/v) tetap memiliki viabilitas. *Metarhizium majus* UICC 295 yang dipreservasi bersama kadaver larva *O. rhinoceros* setelah dipreservasi selama 1 hari dalam gliserol 10% dan dalam gliserol 10% dengan glukosa 5% tetap memiliki viabilitas.

Kata Kunci : *freezing*, *Metarhizium majus*, *Oryctes rhinoceros*, preservasi, tepung cangkang kerang hijau.

xv + 101 halaman; 19 gambar; 3 tabel; 27 lampiran
Daftar referensi : 68 (1974--2012)

ABSTRACT

Nama : Oktarina Sumandari
Study Program : Biology
Title : The Effect of Green Mussel Shell Powder in Growth Medium on The Pathogenicity of *Metarhizium majus* UICC 295 to Infect *Oryctes rhinoceros* Linnaeus Larvae.

Metarhizium majus UICC 295 is an entomopathogenic fungus. This research investigated the effect of green mussel shell powder on the pathogenicity of *M. majus* UICC 295 to infect *O. rhinoceros* larvae and investigated the viability of *M. majus* UICC 295 after preservation with freezing at -80 °C. *Metarhizium majus* UICC 295 in *Saboraud Dextrose Agar with Yeast Extract* (SDAY) medium with 10% (w/v) green mussel shell powder caused 6.67%--100% larval mortality in 7--12 days. *Metarhizium majus* UICC 295 in SDAY medium caused 3.33%--100% larval mortality in 7--11 days. *Metarhizium majus* UICC 295 after being preserved for 30 days in 10% (v/v) glycerol and 10% (v/v) glycerol with 5% (v/v) glucose are still viable. *Metarhizium majus* UICC 295 on cadaver of *O. rhinoceros* larvae after being preserved for 1 day in 10% glycerol and 10% glycerol with 5% glucose are still viable.

Keywords : freezing, green mussel shell powder, *Metarhizium majus*, *Oryctes rhinoceros*, preservation

xv + 101 pages; 19 pictures; 3 tables; 27 attachments

Bibliography : 68 (1974--2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
1. PENDAHULUAN.....	1
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Kapang Entomopatogen.....	6
2.2 Kumbang Badak (<i>Oryctes rhinoceros</i> Linnaeus).....	11
2.3 Medium Pertumbuhan dengan Penambahan Cangkang Kerang Hijau.....	14
2.4 Aplikasi Kapang pada Serangga.....	16
2.5 Preservasi Fungi.....	17
3. METODOLOGI PENELITIAN.....	20
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	20
3.2 Alat dan Bahan.....	20
3.2.1 Alat.....	20
3.2.2 Bahan.....	20
3.2.2.1 Mikroorganisme.....	20
3.2.2.2 Larva <i>Oryctes rhinoceros</i>	21
3.2.2.3 Cangkang Kerang Hijau.....	21
3.2.2.4 Medium.....	21
3.2.2.5 Bahan Kimia.....	21
3.2.2.6 Bahan Habis Pakai.....	21
3.3 Cara Kerja.....	22
3.3.1 Pembuatan medium <i>Sabourad Dextrose with Yeast Extract Agar</i> (SDYA).....	22
3.3.2 Pembuatan tepung cangkang kerang hijau.....	22
3.3.3 Pembuatan medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau.....	23
3.3.4 Pemeliharaan kapang <i>M. majus</i> UICC 295.....	23
3.3.5 Pengamatan morfologi kapang <i>M. majus</i> UICC 295.....	24
3.3.6 Perhitungan jumlah konidia/hifa kapang <i>M. majus</i> UICC 295 dengan enumerasi.....	24
3.3.7 Perhitungan jumlah konidia kapang <i>M. majus</i> UICC 295 dengan hemositometer.....	25

3.3.8	Pengelompokan dan pemeliharaan larva <i>O. rhinoceros</i> untuk pengujian.....	26
3.3.9	Pengujian kemampuan <i>M. majus</i> UICC 295 menginfeksi larva <i>O. rhinoceros</i> dengan aplikasi kontak langsung.....	26
3.3.10	Preservasi <i>M. majus</i> UICC 295 dan kadaver larva <i>O. rhinoceros</i> pada suhu -80° C.....	28
3.3.11	Pengujian viabilitas <i>M. majus</i> UICC 295 dan kadaver larva <i>O. rhinoceros</i> setelah preservasi pada suhu -80° C.....	29
3.3.12	Pengolahan dan analisis data.....	30
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	31
4.1	Pengaruh penambahan tepung cangkang kerang hijau pada medium pertumbuhan terhadap karakter morfologi <i>M. majus</i> UICC 295.....	31
4.2	Pengujian suspensi kapang <i>M. majus</i> UICC 295 pada larva <i>O. rhinoceros</i>	44
4.3	Pengujian viabilitas <i>M. majus</i> UICC 295 setelah dipreservasi pada suhu -80° C.....	53
5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	64
5.1	Kesimpulan.....	64
5.2	Saran.....	64
	DAFTAR REFERENSI.....	65
	LAMPIRAN.....	72

DAFTAR TABEL

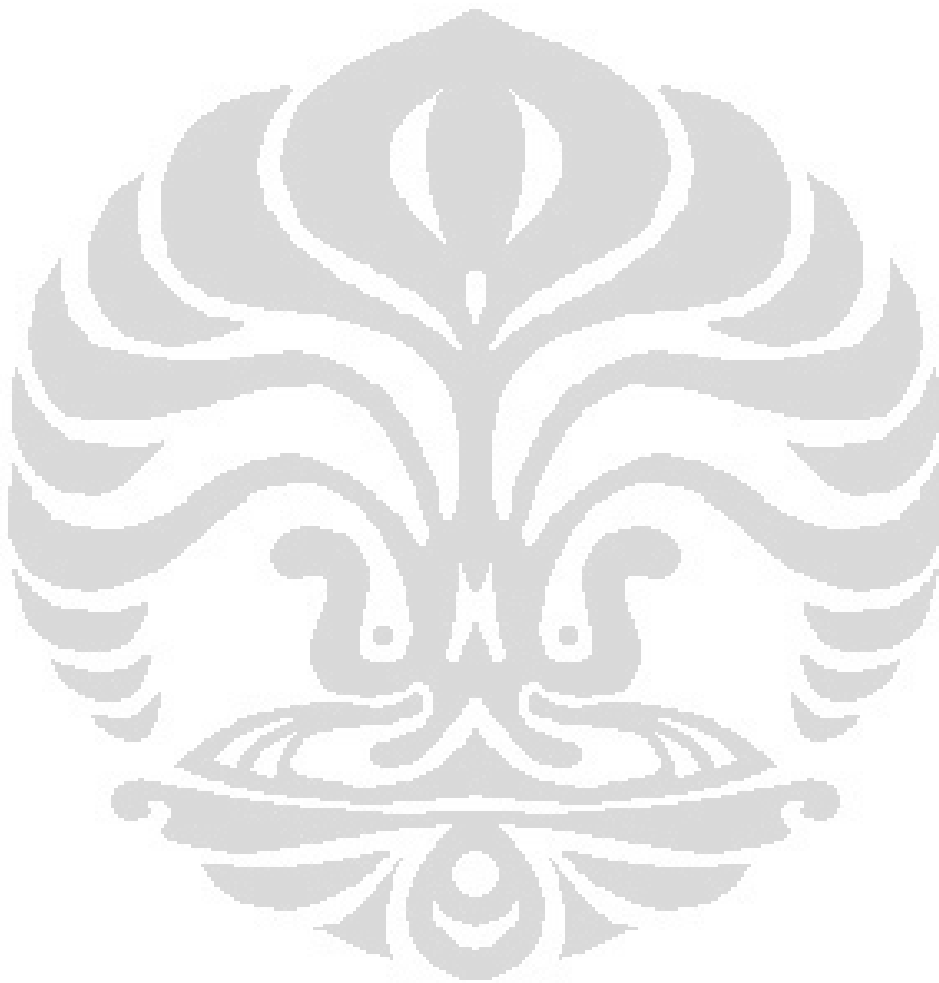
Tabel 4.1.1.	Hasil pengamatan morfologi kapang <i>M. majus</i> UICC 295 secara makroskopik umur 18 hari pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) umur 10 hari dengan suhu inkubasi 28° C dan kondisi gelap.....	35
Tabel 4.1.2.	Hasil pengamatan morfologi kapang <i>M. majus</i> UICC 295 secara mikroskopik umur 18 hari pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) umur 10 hari dengan suhu inkubasi 28° C dan kondisi gelap.....	39
Tabel 4.3.1.	Hasil perhitungan jumlah konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada setelah preservasi.....	56



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.1.	<i>Metarhizium majus</i> umur 14 hari pada medium SDAY dengan suhu inkubasi 23° C	10
Gambar 2.1.2.	<i>Cordyceps brittlebankisoides</i>	11
Gambar 2.2.1.	<i>Oryctes rhinoceros</i>	14
Gambar 2.3.1.	Kerang hijau.....	16
Gambar 4.1.1.	Hasil pembuatan tepung cangkang kerang hijau.....	32
Gambar 4.1.2.	Koloni <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA umur 18 hari dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau umur 10 hari dengan suhu inkubasi 28° C dan kondisi gelap.....	36
Gambar 4.1.3.	Diagram batang persentase peningkatan ukuran diameter koloni <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau dibandingkan dengan medium SDYA dan berumur 10 hari.....	37
Gambar 4.1.4.	Hasil pengamatan morfologi <i>M. majus</i> UICC 295 secara mikroskopik pada medium SDYA umur 21 hari dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau umur 14 hari dengan suhu inkubasi 28° C dan kondisi gelap.....	40
Gambar 4.1.5.	Diagram batang ukuran lebar hifa, panjang dan lebar konidia <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau berumur 10 hari.....	41
Gambar 4.2.1.	Grafik kematian larva <i>O. rhinoceros</i> setelah diaplikasi <i>M. majus</i> UICC 295 selama 15 hari.....	46
Gambar 4.2.2.	Melanisasi pada hari ke-5 pada tubuh larva <i>O. rhinoceros</i>	49
Gambar 4.2.3.	Pertumbuhan <i>M. majus</i> UICC 295 yang berasal dari medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) pada larva <i>O. rhinoceros</i>	50
Gambar 4.2.4.	Grafik berat larva <i>O. rhinoceros</i> sebelum dan setelah diaplikasi <i>M. majus</i> UICC 295 selama 15 hari.....	52
Gambar 4.3.1.	Diagram batang persentase viabilitas <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA setelah dipreservasi selama 30 hari.....	56
Gambar 4.3.2.	Diagram batang persentase viabilitas <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) setelah dipreservasi selama 30 hari.....	57
Gambar 4.3.3.	Koloni <i>M. majus</i> UICC 295 berasal dari kadaver larva <i>O. rhinoceros</i> pada medium SDYA pada suhu 28° C dengan kondisi gelap.....	59
Gambar 4.3.4.	Koloni <i>M. majus</i> UICC 295 berasal dari kadaver larva <i>O. rhinoceros</i> pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) pada suhu 28° C dengan kondisi gelap.....	60

- Gambar 4.3.5. Hasil pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* secara mikroskopik pada medium SDYA dengan suhu inkubasi 28° C dan kondisi gelap..... 61
- Gambar 4.3.6. Hasil pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* secara mikroskopik pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) dengan suhu inkubasi 28° C dan kondisi gelap..... 62



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Skema kerja penelitian.....	72
Lampiran 2.	Standar warna Faber Castell.....	73
Lampiran 3.	Cara kerja pembuatan medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v).....	74
Lampiran 4.	Pengamatan morfologi secara makroskopik dan mikroskopik <i>M. majus</i> UICC 295.....	75
Lampiran 5.	Hasil pengukuran konidia dan hifa <i>M. majus</i> UICC 295 dalam medium SDYA umur 21 hari dengan suhu inkubasi 28° C dan kondisi gelap.....	76
Lampiran 6.	Hasil pengukuran konidia dan hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 5% (b/v) umur 14 hari dengan suhu inkubasi 28° C dan kondisi gelap.....	77
Lampiran 7.	Hasil pengukuran konidia dan hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) umur 14 hari dengan suhu inkubasi 28° C dan kondisi gelap.....	78
Lampiran 8.	Hasil pengukuran konidia dan hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 15% (b/v) umur 14 hari dengan suhu inkubasi 28° C dan kondisi gelap.....	79
Lampiran 9.	Hasil uji anova panjang konidia <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau.....	80
Lampiran 10.	Hasil uji tukey panjang konidia <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau.....	80
Lampiran 11.	Hasil uji anova lebar konidia <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau.....	81
Lampiran 12.	Hasil uji tukey lebar konidia <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau.....	81
Lampiran 13.	Hasil uji anova lebar hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau.....	82
Lampiran 14.	Hasil uji tukey lebar hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau.....	82
Lampiran 15.	Hasil enumerasi kapang <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (w/v) berumur 23 hari dengan suhu inkubasi 28° C dengan kondisi gelap.....	83
Lampiran 16.	Hasil hemositometer konidia kapang <i>M. majus</i> UICC 295	

	pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (w/v) dengan suhu inkubasi suhu 28° C dengan kondisi gelap.....	84
Lampiran 17.	Hasil perhitungan jumlah larva <i>O. rhinoceros</i> yang mati setelah aplikasi kontak langsung dengan konidia <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) selama pengamatan 15 hari.....	85
Lampiran 18.	Hasil perhitungan jumlah larva <i>O. rhinoceros</i> yang mati setelah aplikasi kontak langsung dengan konidia <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA selama pengamatan 15 hari.....	86
Lampiran 19.	Hasil perhitungan berat larva <i>O. rhinoceros</i> kontrol selama pengamatan 15 hari (g).....	87
Lampiran 20.	Hasil perhitungan berat larva <i>O. rhinoceros</i> yang masih hidup setelah diaplikasi <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) selama pengamatan 15 hari (g).....	88
Lampiran 21.	Hasil perhitungan berat larva <i>O. rhinoceros</i> yang masih hidup setelah diaplikasi <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA selama pengamatan 15 hari (g).....	89
Lampiran 22.	Hasil enumerasi <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA setelah dipreservasi selama 30 hari menggunakan akuades pada suhu -80° C.....	90
Lampiran 23.	Hasil enumerasi <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA setelah dipreservasi selama 30 hari menggunakan gliserol 10% (v/v) pada suhu -80° C.....	92
Lampiran 24.	Hasil enumerasi <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA setelah dipreservasi selama 30 hari menggunakan gliserol 10% (v/v) pada suhu -80° C.....	94
Lampiran 25.	Hasil enumerasi <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) setelah dipreservasi selama 30 hari menggunakan akuades pada suhu -80° C.....	96
Lampiran 26.	Hasil enumerasi <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) setelah dipreservasi selama 30 hari menggunakan gliserol 10% (v/v) pada suhu -80° C.....	98
Lampiran 27.	Hasil enumerasi <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) setelah dipreservasi selama 30 hari menggunakan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v) pada suhu -80° C.....	100

BAB 1 PENDAHULUAN

Kapang entomopatogen adalah kapang yang memiliki kemampuan untuk menginfeksi dan membunuh serangga (Wang dkk. 2008: 302). Kapang entomopatogen dapat digunakan sebagai pengganti pestisida kimia dalam membunuh serangga hama (Dhar & Kaur 2010: 65). Tahapan awal kapang entomopatogen menginfeksi serangga adalah kontak antara konidia dengan kutikula serangga. Konidia kapang kemudian melekat pada kutikula dan bergerminasi membentuk *germ tube*. *Germ tube* akan berpenetrasi ke dalam kutikula serangga dan berkembang di dalam hemolimfa serangga (Bidochka & Small 2005: 29).

Metarhizium Sorokin, *Beauveria* Vuillemin, dan *Paecilomyces* Bainier adalah contoh dari kapang entomopatogen (Ahmed dkk. 2009: 707). Kapang *Metarhizium* dapat tumbuh pada lingkungan dengan kelembapan di atas 90% (Prayogo 2006: 49), suhu 25--30° C (Zimmermann 2007: 893), dan dengan kisaran pH 2,5--10,5 (Matsumoto 2006: 297). *Metarhizium majus* (Johnst.) Bisch., Rehner dan Humber adalah salah satu contoh spesies kapang entomopatogen yang dapat diisolasi dari tanah. *Metarhizium majus* merupakan salah satu varian dari *M. anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin yang sebelumnya dikenal sebagai *M. anisopliae* var. *major* atau *majus* (Bischoff dkk. 2009: 520). *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin var. *majus* (Johnston) Tulloch diketahui dapat membunuh larva *Oryctes rhinoceros* Linnaeus (Gopal dkk. 2006: 1803).

Oryctes rhinoceros merupakan serangga hama bagi suku *Palmae* (sagu, pinang, nipah, kelapa sawit, dan enau) dan juga pada tanaman tebu, pakis haji, dan pisang (Pracaya 2009: 193). *Oryctes rhinoceros* (*Coleoptera: Scarabaeidae*) memiliki kemampuan merusak yang tinggi dan populasi yang besar sepanjang tahun. Hama *O. rhinoceros* tersebar luas hampir di seluruh propinsi di Indonesia (Sambiran & Hosang 2007: 2). Kerusakan daun kelapa yang disebabkan oleh *O. rhinoceros* berkorelasi dengan penurunan produksi buah kelapa. Kerusakan daun kelapa oleh *O. rhinoceros* di Kabupaten Lumajang dan Jombang, Jawa

Timur, dari tahun 1988--2004 terus mengalami peningkatan dan menyebabkan penurunan produksi buah kelapa sebanyak 38--55% (Mawikere dkk. 2007: 22 & 26). Kerugian perkebunan kelapa akibat serangan *O. rhinoceros* di Indonesia pada tahun 2004 diperkirakan Rp. 11.146.198.961.940, sehingga perlu ditanggulangi untuk menghindari kerugian yang lebih besar (Sambiran & Hosang 2007: 2).

Larva *O. rhinoceros* dapat dibunuh oleh *M. majus* UICC 295 dengan pengujian aplikasi kontak langsung. Pengujian tersebut dilakukan dengan meneteskan suspensi kapang *M. majus* UICC 295 pada permukaan tubuh larva *O. rhinoceros* (Rosadi 2011: 20 & 28). Aplikasi kontak langsung memungkinkan konidia kapang langsung melekat pada tubuh serangga, sehingga cepat bergerminasi membentuk *germ tube* kemudian berpenetrasi ke dalam kutikula serangga (Desyanti dkk. 2007: 74).

Proses penetrasi hifa kapang entomopatogen ke dalam kutikula serangga dibantu oleh enzim kitinase, protease, dan lipase. Enzim kitinase berperan dalam proses degradasi kutikula serangga yang mengandung kitin (Zimmermann 2007: 887). Kitin merupakan salah satu komponen penyusun dinding sel fungi, eksoskeleton serangga, kulit udang, cangkang kepiting, dan cangkang kerang (Andrade dkk. 2003: 150). Kemampuan kapang entomopatogen menginfeksi serangga dapat ditingkatkan dengan menambahkan kitin pada medium pertumbuhan kapang. Kitin yang ditambahkan pada medium pertumbuhan menyebabkan kapang entomopatogen meningkatkan produksi enzim kitinase. Enzim kitinase memiliki peranan penting dalam proses degradasi kutikula serangga, sehingga kapang cepat berpenetrasi ke dalam tubuh serangga dan menginfeksi serangga tersebut. Kapang entomopatogen *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin yang ditumbuhkan pada medium dengan penambahan substrat kitin berupa tepung jangkrik dapat meningkatkan persentase kematian *Plutella xylostella* Linnaeus (ulat daun kubis) sebesar 8,61% (Herlinda dkk. 2006: 71--77).

Penggunaan kapang entomopatogen sebagai agen pembasmi hama perlu diimbangi dengan upaya preservasi kapang tersebut (Zimmermann 2007: 909). Preservasi merupakan suatu upaya penyimpanan dan pemeliharaan fungi untuk

menjaga kestabilan morfologi, fisiologi, dan genetik fungi dalam jangka waktu tertentu. Preservasi fungi dalam jangka waktu pendek dapat dilakukan dengan membiakkan fungi secara terus-menerus pada medium pertumbuhan. Namun demikian, karakter morfologi dan fisiologi fungi dapat berubah dari waktu ke waktu. Selain itu, kemampuan fungi untuk menginfeksi inang dapat menurun selama proses pembiakan berulang, sehingga diperlukan preservasi fungi dalam jangka waktu panjang (Nakasone dkk. 2004: 37--38).

Preservasi dalam jangka waktu panjang dapat dilakukan dengan metode *freezing*, yaitu penyimpanan fungi dalam suhu rendah. Preservasi dengan metode *freezing* dapat mempertahankan kestabilan karakter fungi. Preservasi dengan metode *freezing* membutuhkan protektan. Protektan adalah senyawa kimia yang dapat mencegah kerusakan sel selama preservasi dengan metode *freezing* (Nakasone dkk. 2004: 41). Protektan berfungsi untuk mengurangi pembentukan kristal es yang besar dan kasar karena suhu rendah dan mengurangi hilangnya cairan dalam sel (Smith & Onions 1994: 59).

Protektan yang umum digunakan dalam preservasi fungi adalah gliserol. Gliserol merupakan *penetrating agent* yang berfungsi sebagai protektan intraseluler dan ekstraseluler. Gliserol dapat menghambat pembentukan kristal es yang besar dan kasar dengan membentuk kristal es dengan ukuran kecil, sehingga tidak merusak sel (Uzunova-Doneva & Donev 2005: 22). Penyimpanan fungi dalam larutan gliserol 10% pada suhu -80°C berhasil mempreservasi fungi selama lima tahun (Nakasone dkk. 2004: 41). Glukosa merupakan *non-penetrating agent* yang berfungsi sebagai protektan ekstraseluler (Nakasone dkk. 2004: 41). Glukosa dapat menghambat pembentukan kristal es dengan meningkatkan viskositas larutan. Penggunaan kombinasi protektan gliserol 10% (v/v) dengan glukosa 5% (v/v) dapat melindungi sel mikroorganisme lebih baik saat dipreservasi dibandingkan penggunaan agen protektan tunggal dalam mempreservasi sel mikroorganisme (Hubalek 2003: 211 & 220). Preservasi fungi entomopatogen dapat dilakukan beserta jaringan tubuh serangga inang dengan metode *freezing* (Nakasone dkk. 2004: 40).

Limbah cangkang kerang hijau merupakan sumber kitin alami yang melimpah di Indonesia dengan konsentrasi kitin 43,88% dari berat awal cangkang

(Kusumaningsih dkk. 2004: 63). Pertumbuhan kapang *M. majus* UICC 295 pada medium *Saboraud Dextrose with Yeast Extract Agar* (SDYA) yang ditambahkan substrat cangkang kerang hijau dengan konsentrasi 10% (b/v) telah dilakukan pada masa prapenelitian. Hasil prapenelitian menunjukkan bahwa sporulasi *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan substrat cangkang kerang hijau lebih cepat tiga hari dibandingkan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA (kontrol). Selain itu, *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan substrat cangkang kerang hijau memiliki ukuran konidia lebih panjang 15,90% dan lebih lebar 9,34% dibandingkan dengan ukuran konidia *M. majus* pada medium SDYA sebagai kontrol.

Hasil prapenelitian membuktikan bahwa *M. majus* UICC 295 dapat tumbuh pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau. Namun demikian, kemampuan *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros* belum diketahui. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh penambahan tepung cangkang kerang hijau dalam medium pertumbuhan *M. majus* UICC 295 terhadap kemampuan *M. majus* UICC 295 menginfeksi larva *O. rhinoceros*. Selain itu, preservasi *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau dan *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva *O. rhinoceros* belum dilakukan. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai preservasi *M. majus* UICC 295 dalam larutan gliserol 10% dan dalam larutan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v) kemudian diuji viabilitasnya setelah dipreservasi.

Hipotesis penelitian adalah *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau tetap memiliki kemampuan dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros*. Preservasi dalam larutan gliserol 10% (v/v) dan dalam larutan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v) pada suhu -80° C dapat mempertahankan viabilitas *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau dan *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva *O. rhinoceros*.

Hasil yang diharapkan dari penelitian ini adalah memperoleh substrat kitin yang tepat untuk meningkatkan kemampuan *M. majus* UICC 295 menginfeksi larva *O. rhinoceros*, sehingga *M. majus* UICC 295 dapat digunakan sebagai agen biokontrol yang efektif membunuh hama *O. rhinoceros*. Pemanfaatan limbah cangkang kerang hijau sebagai substrat kitin merupakan salah satu upaya mengurangi limbah cangkang kerang hijau yang melimpah di Indonesia. Medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau diharapkan dapat menjadi medium pertumbuhan yang efektif bagi kapang *M. majus* UICC 295. Selain itu, dari hasil penelitian ini diharapkan diperoleh metode preservasi dan krioprotektan yang tepat untuk menjaga viabilitas *M. majus* UICC 295.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 KAPANG ENTOMOPATOGEN

Fungi adalah mikroorganisme eukariotik yang bersifat heterotrof (kemo-organotrof) (Deacon 2006: 5). Fungi dapat berbentuk uniseluler atau multiseluler, ber dinding sel dari kitin dan glukukan dan bereproduksi secara seksual dan aseksual (Webster & Weber 2007: 1). Fungi dapat hidup sebagai saprofit atau parasit. Fungi sebagai saprofit memperoleh nutrisi dari materi organik organisme yang sudah mati. Fungi sebagai parasit memperoleh nutrisi dari organisme yang masih hidup. Fungi juga dapat hidup bersimbiosis dengan organisme lain seperti alga atau akar tumbuhan (Madigan dkk. 2012: 602).

Fungi berdasarkan penampakan morfologinya dikelompokkan ke dalam khamir (*yeast*), kapang (*moulds/molds*), dan cendawan (*mushrooms*) (Madigan dkk. 2012: 601). Khamir adalah fungi uniseluler dengan dinding sel yang tersusun atas mannan, kitin, dan glukukan. Kapang adalah fungi multiseluler berfilamen. Filamen kapang merupakan hifa bercabang yang berkumpul membentuk miselium (Walker & White 2005: 2--3). Hifa terbentuk dari pertumbuhan konidia atau spora (Gandjar dkk. 2006: 10). Cendawan adalah fungi multiseluler dengan tubuh buah (karpus) yang besar dan kasar (Walker & White 2005: 2).

Fungi dapat dibedakan menjadi fungi teleomorf dan anamorf. Fungi teleomorf adalah fungi yang telah ditemukan alat reproduksi seksualnya. Alat reproduksi seksual yang diketahui dapat berupa askospora, basidiospora, dan zigospora. Fungi anamorf adalah fungi yang belum ditemukan alat reproduksi seksualnya (Webster & Weber 2007: 32). Alat reproduksi aseksual yang diketahui dapat berupa konidia, arthrokonidia, blastokonidia, kladokonidia, dan sporangiospora (Gandjar dkk. 2006: 5--6).

Pengelompokan fungi terbagi menjadi lima filum berdasarkan analisis filogenetik dengan 18S rDNA dan perbedaan morfologi alat reproduksi seksual. Lima filum fungi, yaitu *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*,

Ascomycota, dan *Basidiomycota* (Glazer & Nikaido 2007: 35). Filum *Chytridiomycota* bersifat uniseluler, hidup berkoloni, menghasilkan alat reproduksi seksual berupa oospora dan antherozoid dan menghasilkan alat reproduksi aseksual berupa zoospora yang memiliki flagella pada bagian posterior (Gandjar dkk. 2006: 48,74). Filum *Zygomycota* menghasilkan alat reproduksi seksual berupa zigospora dan menghasilkan alat reproduksi aseksual berupa aplanospora (Gandjar dkk. 2006: 77--78).

Filum *Glomeromycota* ditemukan hidup pada akar tumbuhan dan tidak ditemukan hidup secara independen tanpa keberadaan tumbuhan. Filum tersebut memiliki spora aseksual dengan diameter 400 μm (Deacon 2006: 22). Filum *Ascomycota* menghasilkan alat reproduksi seksual berupa askospora dan memiliki dinding sel yang terdiri dari dua lapisan (Gandjar dkk. 2006: 79). Filum *Basidiomycota* menghasilkan alat reproduksi seksual berupa basidiospora (Gandjar dkk. 2006: 84).

Kapang entomopatogen adalah kapang yang memiliki kemampuan untuk menginfeksi dan membunuh serangga (Wang dkk. 2008: 302). Mekanisme kapang entomopatogen dalam menginfeksi serangga diawali dengan kontak antara konidia kapang entomopatogen dan kutikula serangga. Tahap selanjutnya adalah pelekatan dan germinasi konidia kapang entomopatogen pada kutikula serangga. Konidia kapang entomopatogen akan bergerminasi membentuk *germ tube* yang kemudian akan berpenetrasi ke dalam tubuh serangga (Prayogo dkk. 2005: 21). *Germ tube* dapat masuk langsung ke dalam tubuh serangga melalui spirakel, saluran pencernaan atau melalui luka yang ada pada tubuh serangga. *Germ tube* juga dapat masuk ke dalam tubuh serangga melalui penetrasi ke dalam integumen serangga dengan bantuan enzim (Zimmermann 2007: 886). *Germ tube* yang berhasil masuk ke dalam tubuh serangga akan membentuk hifa dan berkembang di dalam hemolimfa dan menyerang seluruh jaringan dalam tubuh serangga (Prayogo dkk. 2005: 21). Kapang entomopatogen akan ke luar dari dalam tubuh serangga melalui kutikula serangga jika bagian dalam tubuh serangga sudah tidak dapat digunakan lagi sebagai sumber nutrisi (Desyanti dkk. 2007: 75). Kapang entomopatogen akan kembali membentuk hifa saat akan tumbuh ke luar dari dalam tubuh serangga yang sudah mati (Zimmermann 2007: 887).

Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) Sorokin merupakan salah satu jenis kapang entomopatogen yang dapat menginfeksi beberapa jenis serangga dari ordo *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Homoptera*, *Hemiptera*, dan *Isoptera* (Prayogo dkk. 2005: 20). Bentuk *M. anisopliae* saat berada di dalam hemolimfa serangga adalah *yeast-like cells* (Zimmermann 2007: 887). Selain dapat hidup di dalam tubuh serangga, *M. anisopliae* juga dapat hidup sebagai saprofit pada tanah (Prayogo dkk. 2005: 20).

Pertumbuhan *M. anisopliae* dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti suhu, kelembapan, sinar matahari, dan pH. *Metarhizium anisopliae* dapat tumbuh dengan baik pada lingkungan dengan kisaran suhu 25--30° C (Zimmermann 2007: 893). Kelembapan yang tinggi (di atas 90%) diperlukan *M. anisopliae* untuk tumbuh dan mencegah terjadinya dehidrasi konidia (Prayogo 2006: 49). Paparan sinar matahari pada *M. anisopliae* dapat menghambat germinasi konidia (Zimmermann 2007: 909). *Metarhizium anisopliae* dapat tumbuh pada lingkungan dengan kisaran pH 2,5--10,5 (Matsumoto 2006: 297).

Metarhizium anisopliae diketahui memiliki enam enzim, yaitu lipase, kitinase, amilase, protease, pospatase, dan esterase. Enzim-enzim tersebut berperan penting dalam proses penetrasi hifa *M. anisopliae* ke dalam integumen serangga (Prayogo dkk. 2005: 21). Selain itu, *M. anisopliae* diketahui memiliki metabolit sekunder, yaitu destruksin. Destruksin adalah *cyclic hexadepsipeptides* yang mengandung *α-hydroxyl acid* dan lima asam amino seperti β-alanin, alanin, valin, isoleusin and prolin (Zimmermann 2007: 888). Destruksin dapat menyebabkan kelumpuhan sel dan kelainan fungsi lambung bagian tengah, tubulus malphigi, dan jaringan otot (Widiyanti & Muyadihardja 2004: 29). Destruksin merupakan toksin neuromuskular yang dapat menginduksi depolarisasi membran otot serangga, sehingga menyebabkan kelumpuhan dan kematian pada serangga (Male dkk. 2009: 1447--1448).

Metarhizium anisopliae berdasarkan ukuran konidia terbagi menjadi dua varian yaitu *M. anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin var. *anisopliae* Tulloch dan *M. anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin var. *majus* (Johnston) Tulloch (Nishi dkk. 2010: 19). *Metarhizium anisopliae* var. *majus* atau *major* dikeluarkan dari varian *M. anisopliae* dan ditetapkan menjadi spesies *M. majus* (Johnst.) Bisch., Rehner

dan Humber. Perubahan tersebut didasari perbedaan ukuran konidia *M. majus* yang lebih besar dibandingkan dengan *M. anisopliae*. *Metarhizium majus* memiliki konidia berukuran (8,5--14,5) x (2,5--5,0) μm , sedangkan *M. anisopliae* memiliki konidia berukuran (5,0--7,0) x (2,0--3,5) μm .

Analisis filogenetik berdasarkan *translation elongation factor 1-alpha* (EF-1 α), *RNA polymerase II largest subunit* (RPB1), *RNA polymerase second largest subunit* (RPB2), dan *β -tubulin* (Bt) menunjukkan bahwa *M. anisopliae* dan *M. majus* terletak pada *clade* yang berbeda. Oleh karena itu, *M. majus* dikeluarkan dari varian *M. anisopliae*. Selain *M. anisopliae* dan *M. majus*, terdapat spesies *Metarhizium* lain seperti, *M. guizhouense* Q. T. Chen dan H. L. Guo, *M. pingshaense* Q. T. Chen dan H. L. Guo, *M. robertsii* J. F. Bisch., Rehner dan Humber, *M. brunneum* Petch, *M. lepidiotae* (Driver & Milner) J. F. Bisch., Rehner dan Humber, *M. acridum* (Driver & Milner) J. F. Bisch., Rehner dan Humber, *M. globosum* J. F. Bisch., Rehner dan Humber, dan *M. frigidum* J. F. Bisch. dan S. A. Rehner (Bischoff dkk. 2009: 520--522 & 525).

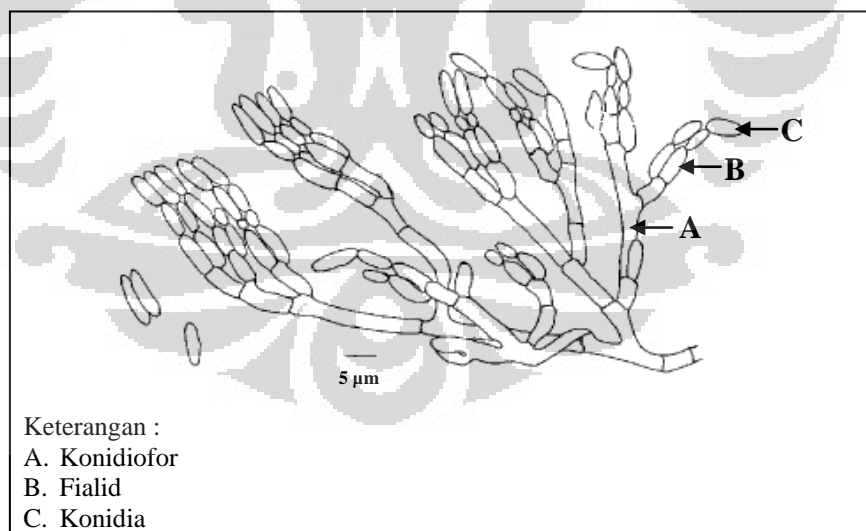
Berdasarkan Purnamasari (2011: 30), *M. majus* UICC 295 berumur 19 hari pada medium SDYA dengan suhu inkubasi 22--24° C memiliki tekstur koloni granular dengan miselium berwarna putih dan konidia berwarna *olive green*. *Metarhizium majus* memiliki zona pertumbuhan dengan *exudate drops* berwarna kuning. *Metarhizium majus* tidak memiliki zonasi dan jari-jari koloni. Hifa *M. majus* bercabang dan bersepta dengan ukuran lebar 1,32--3,22 μm . Konidia berbentuk silindris dengan ukuran (6,19--11,37) x (2,39--3,55) μm .

Berdasarkan Liu dkk. (2001: 178--180), *M. anisopliae* var. *majus* adalah anamorf dari *Cordyceps brittlebankisoides* Liu, Liang, Whalley, Yao, dan Liu. *Cordyceps brittlebankisoides* diisolasi dari larva *Coleoptera* mati yang ditemukan di tanah. Askus dari *Cord. brittlebankisoides* berbentuk silindris dengan ukuran (188--313) x (3,0--3,2) μm . Askospora tidak berwarna (hialin), berbentuk silindris dengan ukuran (180--300) x (0,94) μm . Askospora, sklerotia, dan stroma *Cord. brittlebankisoides* ditumbuhkan pada medium PDA (*Potato Dextrose Agar*) pada suhu 23° C. Koloni yang tumbuh pada umur 14 hari berwarna hijau kekuningan dan warna sebalik koloni adalah kuning pucat. Pengamatan morfologi koloni secara mikroskopik memperlihatkan hifa hialin dengan lebar

1,5--2,0 μm dan konidiofor hialin berbentuk silindris. Selain itu, terlihat fialid berbentuk silindris dengan panjang 7,6--15,9 μm , dan konidia hialin berbentuk silindris dengan ukuran panjang 7,0--10,8 μm . Karakter morfologi fialid dan konidia tersebut memiliki kesamaan dengan karakteristik *M. anisopliae* var. *majus*. Oleh karena itu, *M. anisopliae* var. *majus* ditetapkan sebagai anamorf dari *Cord. brittlebankisoides*.

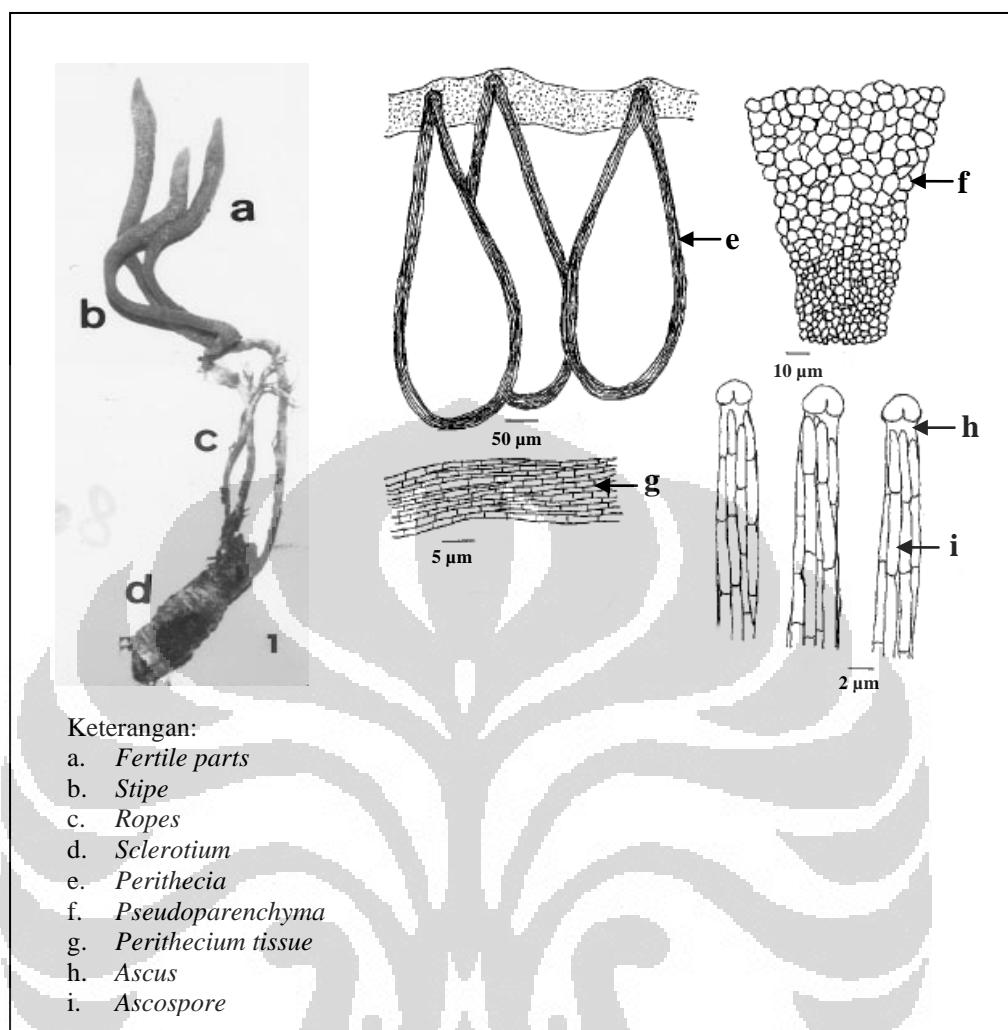
Klasifikasi kapang *M. majus* berdasarkan Bischoff dkk. (2009: 512) adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Eumycota*
 Filum : *Ascomycota*
 Subfilum : *Ascomycotina*
 Kelas : *Sordariomycetes*
 Ordo : *Hypocreales*
 Suku : *Clavicipitaceae*
 Marga : *Metarhizium*
 Jenis : *Metarhizium majus* (Johnst.) Bisch., Rehner dan Humber



Gambar 2.1.1. *Metarhizium anisopliae* var. *majus*

[Sumber: Liu dkk. 2001: 181.]



Gambar 2.1.2. *Cordyceps brittlebankisoides*

[Sumber: Liu dkk. 2001: 180.]

2.2 KUMBANG BADAK (*Oryctes rhinoceros* Linnaeus)

Oryctes rhinoceros merupakan hama bagi suku *Palmae* (sagu, pinang, nipah, kelapa sawit, dan enau) dan juga pada tanaman tebu, pakis haji, dan pisang (Pracaya 2009 : 193). *Oryctes rhinoceros* memiliki nama lokal kumbang badak atau wangwung kelapa (Pracaya 2009 : 193). Kumbang badak dewasa memiliki bentuk seperti badak yang mempunyai cula. Kumbang dewasa tersebut memiliki panjang 5--6 cm (Pracaya 2008: 114). Telur dari kumbang badak berwarna putih dengan panjang 3--3,5 mm dan lebar 2 mm. Lama stadium telur 11--13 hari.

Telur kumbang badak dapat ditemukan pada sampah-sampah membusuk, pohon yang sudah melapuk, dan kotoran hewan (Departemen Pertanian 1993: 1).

Larva kumbang badak berwarna putih dengan kepala berwarna cokelat dan mulut berwarna merah kecokelatan. Larva instar awal memiliki panjang 7--8 mm. Larva instar akhir memiliki panjang 60--105 mm dan lebar 25 mm. Bentuk badan larva membengkok dan bagian ujung abdomen membentuk kantung. Badan larva ditumbuhi rambut-rambut pendek (Departemen Pertanian 1993: 1--2).

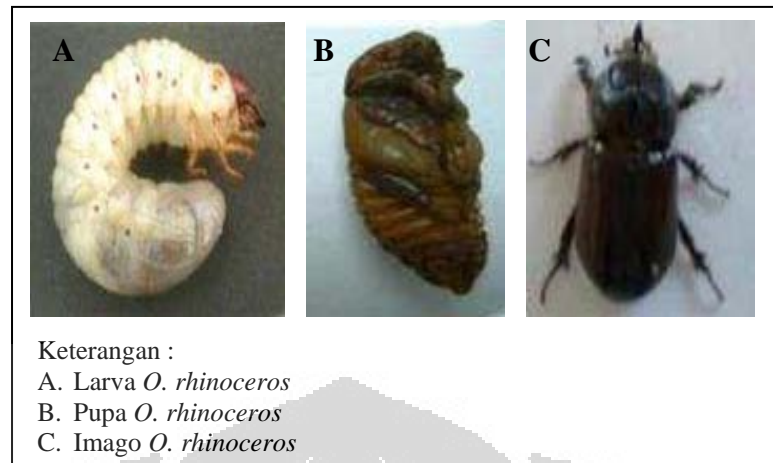
Larva kumbang badak terbagi atas tiga instar berdasarkan umur. Lama stadium larva instar I adalah 1--21 hari setelah menetas dari telur. Lama stadium larva instar II adalah 21--42 hari dan larva instar III 42--105 hari setelah menetas dari telur (Hinckley 1973: 113). Lamanya stadium larva berubah-ubah bergantung pada suhu dan kelembapan. Selain itu, jenis makanan dan iklim juga memengaruhi lamanya stadium larva. Larva instar akhir akan masuk ke dalam tanah dan tidak aktif selama 7--12 hari (Departemen Pertanian 1993: 2). Larva tersebut akan mulai membentuk pupa berwarna putih kekuningan dengan panjang 5--9 cm. Pupa akan berubah menjadi kumbang badak setelah 2--4 minggu. Kumbang badak dapat hidup selama 2--7 bulan (Pracaya 2009: 194).

Efektivitas kemampuan *M. anisopliae* dalam menginfeksi serangga dipengaruhi oleh umur serangga yang diinfeksi. Larva instar I paling rentan terhadap infeksi *M. anisopliae*. Serangga pada stadium larva memiliki integumen yang sangat tipis, sehingga mempermudah penetrasi hifa *M. anisopliae* (Prayogo dkk. 2005: 23). Larva instar I dan instar II *O. rhinoceros* yang terinfeksi *M. anisopliae* akan mengalami perubahan warna tubuh dari putih menjadi kusam. Miselium *M. anisopliae* akan terlihat pada bagian kepala larva instar I pada hari ke-2 setelah kematian dan tubuh larva instar I yang mati tidak mengeras. Tubuh larva instar II yang mati akan mengeras dan ditutupi oleh miselium *M. anisopliae* (Sambiran & Hosang 2007: 4--5). Larva instar III *O. rhinoceros* yang terinfeksi *M. anisopliae* akan mengalami penurunan aktivitas makan dan perubahan warna tubuh menjadi kusam. Tubuh larva *O. rhinoceros* yang sudah mati akan mengeras. Beberapa hari setelah kematian larva *O. rhinoceros*, konidia *M. anisopliae* yang berwarna hijau akan menutupi permukaan tubuh larva (Sambiran & Hosang 2007: 7).

Serangga memiliki mekanisme pertahanan tubuh terhadap infeksi kapang entomopatogen. Mekanisme pertahanan tubuh serangga meliputi fagositosis, melanisasi, pembentukan nodul, dan enkapsulasi (Samson dkk. 1988: 135--137). Seluruh mekanisme tersebut melibatkan hemosit, yaitu sel yang melindungi tubuh serangga dari segala parasit dan partikel asing yang masuk ke dalam tubuh serangga (Vilmos & Kurucz 1998: 60). Hemosit dalam mekanisme fagositosis berperan sebagai sel fagosit yang akan menelan parasit dan partikel asing dalam tubuh serangga (Samson dkk. 1988: 135). Melanisasi adalah proses pembentukan pigmen hitam (melanin) oleh enzim *phenoloxidase* di dalam hemosit. Melanin akan dikeluarkan oleh sel yang rusak ke dalam kutikula atau di sekitar luka pada tubuh serangga. Nodul yang dibentuk dalam mekanisme pertahanan tubuh serangga merupakan kumpulan hemosit yang memerangkap parasit dan partikel asing. Nodul yang terbentuk akan melekat pada jaringan dan organ di dalam tubuh serangga. Mekanisme enkapsulasi terjadi melalui pembentukan kapsul dari kumpulan hemosit yang membentuk lapisan. Kapsul tersebut akan menyelubungi parasit dan partikel asing yang masuk ke dalam tubuh serangga (Vilmos & Kurucz 1998: 60 & 62).

Klasifikasi kumbang badak (*O. 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 2.2.1. *Oryctes rhinoceros*

[Sumber: Soltani 2010: 180.]

2.3 MEDIUM PERTUMBUHAN DENGAN PENAMBAHAN CANGKANG KERANG HIJAU

Mikroorganisme yang ditumbuhkan dalam laboratorium membutuhkan medium buatan. Medium buatan mengandung nutrisi dan kondisi lingkungan yang telah disesuaikan dengan habitat alami mikroorganisme tersebut (Hogg 2005: 84). *Metarhizium majus* diketahui dapat tumbuh pada medium *Saboraud Dextrose Agar with Yeast Extract* (SDAY) (Bischoff dkk. 2009: 514). Medium SDYA mengandung dekstrosa, pepton, ekstrak khamir, dan agar (Desyanti dkk. 2007 : 69). Dekstrosa atau glukosa dapat digunakan oleh mikroorganisme sebagai sumber karbon, sedangkan pepton sebagai sumber karbon dan nitrogen. Ekstrak khamir dapat digunakan oleh mikroorganisme sebagai sumber karbon, nitrogen, dan vitamin. Agar adalah polisakarida yang berfungsi sebagai bahan pengeras medium yang umum digunakan (Atlas 2010: 1--4).

Sumber karbon dan nitrogen untuk pertumbuhan kapang entomopatogen dapat diperoleh dari kitin. Kemampuan kapang entomopatogen menginfeksi serangga dapat ditingkatkan dengan menambahkan kitin pada medium pertumbuhan kapang. Kitin yang ditambahkan pada medium pertumbuhan menyebabkan kapang entomopatogen meningkatkan produksi enzim kitinase (Herlinda dkk. 2006: 76--77). Enzim kitinase digunakan kapang entomopatogen

untuk mendegradasi kutikula serangga yang mengandung kitin (Bidochka & Small 2005: 30). Kapang *M. anisopliae* dapat memproduksi enzim kitinase melalui mekanisme induksi represisi. Keberadaan substrat yang mengandung kitin menginduksi produksi enzim kitinase oleh *M. anisopliae*. Penambahan substrat kitin berupa kitin koloidal pada medium pertumbuhan dapat menginduksi kapang *M. anisopliae* memproduksi enzim kitinase (Dhar & Kaur 2009: 545).

Kitin adalah polimer linier dari N-asetil-glukosamin dengan subunit yang dihubungkan oleh ikatan β -(1,4)-glukosida. Kitin merupakan salah satu komponen penyusun dinding sel fungi dan eksoskeleton serangga. Kitin dapat diperoleh dari kulit udang, cangkang kepiting, dan cangkang kerang (Andrade dkk. 2003: 150).

Cangkang kerang hijau (*Perna viridis* L.) terdiri dari lapisan luar dan dalam. Lapisan luar cangkang (periostrakum) merupakan lapisan tipis berwarna hijau kebiruan. Garis-garis melengkung yang terdapat pada permukaan cangkang bagian luar merupakan garis umur. Lapisan dalam cangkang berwarna putih keperakan yang tersusun atas kalsit (Niswari 2004: 5). Cangkang kerang hijau tersusun atas mineral, protein, dan kitin. Tepung cangkang kerang hijau memiliki kandungan kitin 43,88% (Kusumaningsih dkk. 2004: 63), kalsium 33,56%, protein 4,14%, lemak 3,55%, dan fosfor 0,12% (Permana 2006: 43--46).

Klasifikasi kerang hijau (*P. viridis*) berdasarkan Barnes (1974: 194) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Animalia</i>
Filum	: <i>Moluska</i>
Kelas	: <i>Bivalvia</i>
Bangsa	: <i>Anisomyria</i>
Suku	: <i>Mytilidae</i>
Marga	: <i>Perna</i>
Jenis	: <i>Perna viridis</i> Linnaeus



Gambar 2.3.1. Kerang hijau

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

2.4 APLIKASI KAPANG PADA SERANGGA

Aplikasi kapang entomopatogen terhadap serangga dapat dilakukan pada skala lapangan dan skala laboratorium. Aplikasi kapang entomopatogen di lapangan dapat dilakukan dengan melepaskan kumbang *O. rhinoceros* yang terinfeksi kapang entomopatogen pada perkebunan tanaman kelapa, sehingga dapat menyebarkan kapang pada individu kumbang lainnya. Aplikasi pada skala lapangan juga dapat dilakukan dengan menyemprotkan suspensi kapang *M. anisopliae* pada sarang-sarang yang berisi larva *O. rhinoceros* (Munaan dkk. 1996: 302--306).

Aplikasi kapang entomopatogen terhadap serangga juga dapat dilakukan dalam skala laboratorium. Berdasarkan Rosadi 2011(20 & 28--29), pengujian dalam skala laboratorium dapat dilakukan dengan meneteskan suspensi kapang *M. majus* UICC 295 pada permukaan tubuh larva *O. rhinoceros*. Larva *O. rhinoceros* yang terinfeksi *M. majus* UICC 295 dengan aplikasi kontak langsung menunjukkan perubahan warna tubuh berubah menjadi kusam, gerakan larva menjadi lamban, dan timbul bercak berwarna cokelat kehitaman. Larva *O. rhinoceros* yang telah mati tubuhnya akan mengeras. Tiga hari setelah kematian larva, hifa kapang mulai tumbuh pada permukaan tubuh larva. Empat hari setelah kematian larva, kapang mulai bersporulasi menghasilkan konidia yang berwarna hijau. Enam hari setelah kematian larva, tubuh larva akan tertutup konidia *M. majus* UICC 295.

2.5 PRESERVASI FUNGI

Preservasi merupakan suatu upaya penyimpanan dan pemeliharaan fungi untuk menjaga kestabilan morfologi, fisiologi, dan genetik fungi dalam jangka waktu tertentu. Preservasi fungi penting dilakukan untuk menjaga biodiversitas fungi. Preservasi fungi terbagi menjadi preservasi dalam jangka waktu pendek dan jangka waktu panjang. Preservasi fungi dalam jangka waktu pendek dapat dilakukan dengan *continuous growth*, yaitu menumbuhkan fungi secara terus menerus pada medium pertumbuhan dalam tabung reaksi atau cawan petri. Biakan fungi yang sudah tumbuh kemudian dipreservasi pada suhu ruang atau pada suhu 4° C. Medium pertumbuhan harus selalu diperbaharui agar nutrisi untuk pertumbuhan fungi tetap tersedia. Metode tersebut berhasil mempreservasi kapang selama 1--2 tahun pada suhu 4° C. Kelebihan dari preservasi dengan metode *continuous growth* adalah biaya yang dibutuhkan rendah, tenaga kerja yang dibutuhkan sedikit, metode pengerjaan sederhana dan mudah untuk dilakukan. Kekurangan dari preservasi dengan metode *continuous growth* adalah biakan fungi rentan terkontaminasi, karakter morfologi serta fisiologi biokimia fungi dapat berubah setelah ditumbuhkan berulang kali, dan biakan fungi dapat kehilangan kemampuan untuk bersporulasi (Nakasone dkk. 2004: 37).

Preservasi fungi dalam jangka waktu panjang dapat dilakukan dengan metode *freezing*, liofilisasi, *oil overlay*, *silica gel*, dan substrat organik. Preservasi dengan metode *freezing* dapat dilakukan dengan menyimpan biakan fungi dalam *freezer* pada suhu -20° hingga -80° C. Kelebihan dari preservasi dengan metode *freezing* adalah dapat mempertahankan kestabilan karakter fungi dalam jangka waktu yang lama, biakan fungi yang dipreservasi terhindar dari resiko kontaminasi, efisiensi waktu dalam pengerjaan, dan jumlah peralatan serta tenaga kerja yang dibutuhkan sedikit. Kekurangan dari preservasi dengan metode *freezing* adalah biaya yang dibutuhkan tinggi, membutuhkan pengawasan secara teratur, dan biakan perlu ditumbuhkan terlebih dahulu pada medium sebelum dipreservasi dengan metode *freezing* (Nakasone dkk. 2004: 39--42).

Fungi yang tumbuh pada berbagai substrat organik seperti potongan kayu, jerami, tanah, tubuh serangga, dan jaringan tanaman dapat dipreservasi dengan

metode *freezing* bersama substratnya. Fungi entomopatogen dapat dipreservasi beserta jaringan tubuh serangga inang. Metode tersebut telah dilakukan pada konidia *Neozygites fresenii* (Nowakowski) Batko pada kadaver kutu daun. Konidia *N. fresenii* yang dipreservasi dengan metode *freezing* bersama kadaver serangga inang memiliki viabilitas yang tinggi (Nakasone dkk. 2004: 39--42).

Kerusakan sel dapat terjadi selama preservasi dengan metode *freezing*. Oleh karena itu, dibutuhkan protektan untuk mencegah terjadinya kerusakan sel selama preservasi dengan metode *freezing* (Nakasone dkk. 2004: 41). Protektan berfungsi untuk mengurangi pembentukan kristal es yang besar dan kasar karena suhu rendah. Selain itu, protektan berfungsi untuk mengurangi hilangnya cairan dalam sel (Smith & Onions 1994: 59). Protektan terbagi menjadi 2 macam, yaitu *penetrating agent* dan *non-penetrating agent*. Contoh *penetrating agent* adalah gliserol dan *dimethyl sulfoxide* (DMSO) yang dapat menembus membran sel dan berfungsi sebagai protektan intraseluler dan ekstraseluler (Nakasone dkk. 2004: 41). *Penetrating cryoprotectant* dapat mengikat air di dalam sel, sehingga dapat mencegah pembentukan kristal es kasar pada bagian ekstraseluler dan intraseluler. *Penetrating cryoprotectant* menyebabkan pembentukan kristal es yang halus, sehingga tidak merusak membran sel (Hubalek 2003: 218). Contoh *non-penetrating agent* adalah sukrosa, laktosa, glukosa, mannitol, sorbitol, dekstran, *hydroxyethyl starch* (HES), *methyl cellulose*, albumin, gelatin, *polyvinylpyrrolidone* (PVP), *polyethylene glycol* (PEG), *polyethylene oxide* (PEO), dan *polyvinyl alcohol* sebagai protektan ekstraseluler. *Non-penetrating cryoprotectant* dapat menghambat pembentukan kristal es pada bagian ekstraseluler dengan meningkatkan viskositas larutan (Hubalek 2003: 206 & 220).

Gliserol merupakan protektan yang efektif dalam preservasi fungi. Penyimpanan fungi dari filum *Ascomycota* dan *Basidiomycota* dalam larutan gliserol 10% dengan metode *freezing* pada suhu -80°C berhasil mempreservasi fungi tersebut selama 5 tahun (Nakasone dkk. 2004: 41). Gliserol $((\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{OH})_3)$ berperan dalam proses kristalisasi cairan dalam sel selama preservasi dengan metode *freezing*. Gliserol menghambat pembentukan kristal es yang besar dan kasar dengan membentuk kristal es dengan ukuran kecil, sehingga tidak merusak sel (Uzunova-Doneva & Donev 2005: 22). Gliserol dapat

mengurangi titik beku air dan menghambat *osmotic shock* pada sel yang dipreservasi (Hubalek 2003: 211).

Penggunaan kombinasi protektan *penetrating agent* dan *non-penetrating agent* diketahui memberikan hasil yang lebih baik karena dapat bekerja secara sinergis dibandingkan penggunaan agen protektan tunggal dalam mempreservasi sel mikroorganisme. Glukosa merupakan *non-penetrating agent* yang berfungsi sebagai protektan ekstraseluler. Glukosa dapat menghambat pembentukan kristal es dengan meningkatkan viskositas larutan. Penggunaan kombinasi protektan gliserol 10% (v/v) dengan glukosa 5% (v/v) dapat memproteksi sel lebih baik dibandingkan penggunaan agen protektan tunggal dalam mempreservasi sel mikroorganisme (Hubalek 2003: 211 & 220). Kombinasi tersebut dapat dilakukan dengan mencampurkan gliserol 10% (v/v) dengan glukosa 5% (v/v). Kombinasi protektan *penetrating agent* dengan glukosa dalam mempreservasi kapang entomopatogen *Entomophthora exitialis* Hall dan Dunn menunjukkan hasil yang lebih baik, yaitu memiliki viabilitas yang lebih baik dibandingkan dengan *E. exitialis* yang dipreservasi dengan *penetrating agent* tanpa glukosa (Hubalek 2003: 211).

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 LOKASI DAN WAKTU

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Center of Excellence for Indigenous Biological Resources-Genome Studies* (CoE IBR-GS) dan Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, FMIPA-UI, Depok, mulai bulan Februari hingga Mei 2012.

3.2 ALAT DAN BAHAN

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah lemari pendingin [GASSIO], kompor listrik [Sanyo], oven [Heraeus], autoklaf [Hirayama], pemanas air [SHARP], *deep freezer* [SANYO], timbangan digital [AND EW-300 G], timbangan analitik [Oertling], mikropipet [Gilson, Biohit Proline, dan V.A. Howe], mikroskop [Euromex], mikroskop trinokular [Carl ZEISS], mikroskop stereo [Carl ZEISS], kamera digital [Canon], vorteks [Bio-Rad], blender [Philips], *water bath* [Grant Y6], *transfer box*, hemositometer [Improved-Neubauer], *mesh* berukuran 600 mikrometer, erlenmeyer, gelas *beaker*, gelas ukur, cawan petri, tabung reaksi, batang pengaduk, *tips*, *cryotube* [BIOLOGIX], mangkuk plastik kotak dengan tutup, *counter*, spatula, spatel *Drygalski*, jarum tanam tajam, jarum tanam bulat, *object glass*, *cover glass*, pinset, pipet, botol alkohol, pembakar spiritus, dan palu.

3.2.2 Bahan

3.2.2.1 Mikroorganisme

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

3.2.2.2 Larva *Oryctes rhinoceros*

Larva *O. rhinoceros* yang digunakan diperoleh dari Desa Rajagaluh, Kabupaten Majalengka dan Sumedang, Jawa Barat. Pakan larva berupa sisa-sisa dedaunan, kotoran ternak, dan kompos dari sekitar lokasi pengambilan larva. Larva diidentifikasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong.

3.2.2.3 Cangkang Kerang Hijau

Cangkang kerang hijau yang digunakan berasal dari rumah makan seafood di Jalan Margonda Raya, Depok.

3.2.2.4 Medium

Medium yang digunakan untuk pertumbuhan dan pemeliharaan kapang *M. majus* UICC 295 adalah *Saboraud Dextrose with Yeast Extract Agar* (SDYA) dan medium SDYA dengan penambahan substrat cangkang kerang hijau.

3.2.2.5 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah glukosa [Liofilchem], pepton [Liofilchem], *yeast extract* [BD], agar [Liofilchem], antibiotik tetrasiklin [Kimia Farma], triton X-100 [BDH], gliserol p.a. 92,1% [Merck], kloramfenikol [Wako], alkohol 70% (v/v) teknis, ethanol p.a. 96%, aseton teknis, dan *lactophenol cotton blue* [Merck].

3.2.2.6 Bahan Habis Pakai

Bahan habis pakai yang digunakan adalah plastik tahan panas [Bell], masker wajah [Krisbow], sarung tangan plastik, tisu gulung, kertas *Yellow Pages*, dan karet gelang.

3.3 CARA KERJA

Skema kerja penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.3.1 Pembuatan medium *Saboraud Dextrose with Yeast Extract Agar* (SDYA)

Pembuatan medium SDYA untuk pertumbuhan dan pemeliharaan kapang *M. majus* UICC 295 dilakukan berdasarkan Desyanti dkk. (2007: 69). Bubuk glukosa 10 g, pepton 2,5 g, *yeast extract* 2,5 g, dan agar 20 g ditambahkan akuades hingga volume total mencapai 1.000 ml. Medium dipanaskan hingga larut dan mendidih. Medium didinginkan kemudian ditambahkan 200 mg/L kloramfenikol yang telah dilarutkan dalam satu ml ethanol p.a. 96% (v/v). Medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan dua atm selama 15 menit. Medium yang telah steril kemudian dituang secara aseptis ke dalam cawan petri masing-masing sebanyak 20 ml dan dibiarkan hingga mengeras.

Pembuatan medium SDYA miring pada tabung reaksi dilakukan dengan menambahkan 500 g kloramfenikol ke dalam 1.000 ml medium SDYA yang telah larut dan mendidih. Kloramfenikol telah dilarutkan dalam satu ml ethanol p.a. 96% (v/v). Medium dipindahkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak enam ml. Medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan dua atm selama 15 menit. Medium SDYA steril diletakkan pada papan yang dimiringkan hingga mengeras.

3.3.2 Pembuatan tepung cangkang kerang hijau

Pembuatan tepung cangkang kerang hijau dilakukan berdasarkan Permana (2006: 25). Cangkang dibersihkan dari kotoran yang melekat dengan sikat. Seluruh permukaan cangkang kerang hijau kemudian dibersihkan dengan alkohol teknis 70% (v/v). Cangkang yang telah bersih dihancurkan menggunakan palu hingga menjadi serbuk. Serbuk tersebut dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi tepung. Tepung kemudian diayak menggunakan *mesh* berukuran 600 mikrometer.

3.3.3 Pembuatan medium SDYA dengan penambahan substrat cangkang kerang hijau

Pembuatan medium SDYA dengan penambahan substrat cangkang kerang hijau digunakan untuk pertumbuhan dan pemeliharaan kapang *M. majus* UICC 295 (Lampiran 3). Medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang 5% (b/v) dibuat dengan menambahkan dektrosa 9,5 g, pepton 2,375 g, *yeast extract* 2,375 g, agar 19 g, dan tepung cangkang kerang 50 g ke dalam akuades hingga mencapai volume 1.000 ml. Medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang 10% (b/v) dibuat dengan menambahkan dektrosa 9 g, pepton 2,25 g, *yeast extract* 2,25 g, agar 18 g, dan tepung cangkang kerang 100 g ke dalam akuades hingga mencapai volume 1.000 ml. Medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang 15% (b/v) dibuat dengan menambahkan dektrosa 8,5 g, pepton 2,125 g, *yeast extract* 2,125 g, agar 17 g, dan tepung cangkang kerang 150 g ke dalam akuades hingga mencapai volume 1.000 ml. Medium kemudian dipanaskan hingga mendidih. Medium didinginkan dan ditambahkan 200 mg/L kloramfenikol yang telah dilarutkan dalam satu ml alkohol 96% (v/v). Medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan dua atm selama 15 menit. Medium yang telah steril kemudian dituang secara aseptis ke dalam cawan petri masing-masing sebanyak 20 ml dan dibiarkan hingga mengeras.

3.3.4 Pemeliharaan kapang *M. majus* UICC 295

Pemeliharaan kapang *M. majus* UICC 295 dilakukan dengan membuat *stock* dan *working culture* berdasarkan Benson (2001: 152) dan Hogg (2005: 89). Kapang *M. majus* UICC 295 ditransfer ke dalam dua tabung berisi medium SDYA miring dan medium SDYA miring dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau sebagai *stock culture* dan *working culture*. *Stock* dan *working culture* dibuat dengan metode *streak* lurus menggunakan jarum tanam tajam. Metode tersebut dilakukan dengan menggoreskan biakan kapang secara vertikal dari bagian bawah hingga bagian atas pada medium. Biakan kapang *stock culture*

diinkubasi pada suhu hingga bersporulasi penuh, kemudian disimpan dalam lemari pendingin suhu 4° C. Biakan *working culture* tetap diinkubasi pada suhu 28° C hingga selesai digunakan untuk pengerjaan penelitian.

3.3.5 Pengamatan morfologi kapang *M. majus* UICC 295

Pengamatan morfologi kapang *M. majus* UICC 295 dilakukan berdasarkan Tzean dkk. (1997: 150). Pengamatan morfologi kapang dilakukan dengan mengamati morfologi kapang secara makroskopik dan mikroskopik (Lampiran 4). Kapang yang diamati diinokulasi dengan metode *stab* pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau dalam cawan petri. Pengamatan morfologi secara makroskopik yang dilakukan meliputi warna koloni berdasarkan standar warna Faber Castell (Lampiran 2), warna sebalik koloni, tekstur koloni, diameter koloni, ada atau tidaknya *exudate drops*, zonasi, *growing zone*, dan *radial furrow*.

Pembuatan preparat untuk pengamatan morfologi secara mikroskopik dilakukan berdasarkan Tzean dkk. (1997: 150) dan Benson (2001: 16, 52). *Object glass* dan *cover glass* dibersihkan dengan alkohol teknis 70% (v/v) agar terbebas dari kotoran, lemak, atau senyawa kimia lain. Larutan pewarna *lactophenol cotton blue* diteteskan pada permukaan *object glass*. Hifa atau konidia kapang diambil menggunakan jarum tanam tajam dan diletakkan di atas larutan *lactophenol cotton blue*. *Cover glass* digunakan sebagai penutup preparat. Pengamatan morfologi secara mikroskopik dilakukan menggunakan mikroskop trinokular [Carl Zeiss] meliputi ukuran panjang konidia, lebar konidia, dan lebar hifa dengan perbesaran 400x.

3.3.6 Perhitungan jumlah konidia/hifa kapang *M. majus* UICC 295 dengan enumerasi

Enumerasi *M. majus* UICC 295 dilakukan dengan metode *Total Plate Count* (TPC) berdasarkan Hogg (2005: 91--93). Biakan kapang yang digunakan adalah *M. majus* UICC 295 yang diinokulasi dengan metode *streak* sebanyak 15

gores pada medium SDYA miring dan pada medium SDYA miring dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau. Akuades steril sebanyak lima ml ditambahkan ke dalam biakan kapang *M. majus* UICC 295. Biakan kapang kemudian dikerik menggunakan jarum tanam bulat. Suspensi kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks. Suspensi kapang diencerkan menggunakan akuades steril hingga faktor pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} dan 10^{-6} . Sebanyak 0,1 ml suspensi kapang dari masing-masing pengenceran disebarkan dengan mikropipet di permukaan medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau dalam cawan petri dengan tiga pengulangan dan diratakan dengan spatel *Drygalski*. Biakan kemudian diinkubasi pada suhu 28°C dengan kondisi gelap hingga terlihat pertumbuhan kapang.

Jumlah CFU/ml sampel dihitung berdasarkan Hogg (2005: 93) dengan rumus:

$$\text{Jumlah CFU/ml} = \frac{\text{Jumlah rata-rata koloni yang tumbuh}}{\text{Volume inokulum x faktor pengenceran}}$$

3.3.7 Penghitungan jumlah konidia kapang *M. majus* UICC 295 dengan hemositometer

Penghitungan jumlah total konidia kapang *M. majus* UICC dilakukan dengan hemositometer. Sebanyak lima ml akuades steril ditambahkan ke dalam tabung reaksi berisi biakan kapang *M. majus* UICC 295. Biakan kapang kemudian dikerik menggunakan jarum tanam bulat. Suspensi kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks. Sebanyak 0,1 ml suspensi diambil dengan *tips* dan dimasukkan ke dalam kamar hitung Improved-Neubauer. Konidia yang terlihat pada lima ruang pada satu kamar dihitung. Jumlah konidia/ml dihitung berdasarkan Herlinda dkk. (2006: 71) dengan rumus:

$$\text{Jumlah sel/ml} = \frac{\text{jumlah total konidia dalam kotak sampel yang diamati}}{\text{jumlah kotak sampel x 0,25}} \times 10^6$$

3.3.8 Pengelompokan dan pemeliharaan larva *O. rhinoceros* untuk pengujian

Pengelompokan dan pemeliharaan larva *O. rhinoceros* dilakukan berdasarkan Rosadi (2011: 19). Larva *O. rhinoceros* ditimbang berat tubuhnya dan diukur panjang tubuhnya. Pengelompokan larva *O. rhinoceros* dilakukan berdasarkan keseragaman berat tubuh larva. Larva dikelompokkan menjadi satu kelompok kontrol dan dua kelompok perlakuan. Setiap kelompok terdiri atas 30 ekor larva dengan ukuran berat tubuh yang hampir seragam.

Larva *O. rhinoceros* dipelihara di dalam ruangan dengan kondisi gelap dengan suhu berkisar 27—28,4 °C dan kelembapan 74--91%. Larva *O. rhinoceros* beserta pakan ditempatkan dalam kotak plastik dengan panjang 14,5 cm, lebar 9,5 cm, dan tinggi 6 cm dengan tutup yang diberi lubang. Pemberian pakan larva berupa sisa-sisa dedaunan, kotoran ternak, dan kompos dilakukan setiap tiga hari sekali sebanyak 10 g pakan untuk setiap larva.

3.3.9 Pengujian kemampuan *M. majus* UICC menginfeksi larva *O. rhinoceros* dengan aplikasi kontak langsung

Pengujian kemampuan *M. majus* UICC 295 dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros* dilakukan berdasarkan Rosadi (2011: 20). Tahapan awal adalah pembuatan larutan triton X-100. Sebanyak 50 µl triton X-100 (98--100%) ditambahkan akuades hingga volume mencapai 100 ml, sehingga diperoleh larutan triton X-100 dengan konsentrasi 0,05%. Larutan tersebut dihomogenkan menggunakan vorteks. Larutan triton X-100 0,05% yang sudah homogen kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak lima ml. Tabung reaksi yang berisi larutan triton X-100 0,05% kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan dua atm selama 15 menit.

Pembuatan suspensi kapang dilakukan dengan menambahkan lima ml larutan triton X-100 0,05% steril ke dalam biakan kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau. Biakan kapang masing-masing dikerik menggunakan jarum tanam bulat. Suspensi kapang kemudian dihomogenkan menggunakan

vorteks. Sebanyak satu ml suspensi kapang *M. majus* UICC 295 yang tumbuh pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau masing-masing diaplikasikan pada permukaan tubuh 30 ekor larva *O. rhinoceros* pada kelompok perlakuan. Sebanyak satu ml suspensi kapang *M. majus* UICC 295 yang tumbuh pada medium SDYA masing-masing diaplikasikan pada permukaan tubuh 30 ekor larva *O. rhinoceros* pada kelompok perlakuan. Sebanyak satu ml larutan triton X-100 0,05% steril masing-masing diaplikasikan pada permukaan tubuh 30 ekor larva *O. rhinoceros* kelompok kontrol. Suspensi kapang dan larutan triton X-100 0,05% diaplikasikan menggunakan mikropipet. Aplikasi dilakukan sebanyak tiga kali berturut-turut selama tiga hari.

Larva pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan diletakkan dalam ruangan dengan kondisi gelap dan suhu berkisar antara 27--28° C. Pengamatan larva dilakukan dengan menghitung jumlah larva yang mati setiap hari selama 15 hari dan menimbang berat larva *O. rhinoceros* yang masih hidup setelah aplikasi kontak langsung dengan konidia *M. majus* UICC 295. Kemampuan kapang *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros* dapat dilihat melalui kematian pada larva yang diaplikasikan suspensi kapang.

Persentase kematian larva dihitung berdasarkan Ihsan dan Octriana (2009: 64) dengan rumus:

$$\text{Persentase kematian larva (\%)} = \frac{\text{Jumlah larva mati}}{\text{Jumlah seluruh larva}} \times 100\%$$

Persentase kematian yang diperoleh kemudian dikoreksi menggunakan rumus Abbott's berdasarkan Hasyim dkk. (2005: 118), yaitu:

$$\text{Persentase kematian terkoreksi (\%)} = \frac{\% \text{ kematian larva} - \% \text{ kematian kontrol}}{100 - \% \text{ kematian kontrol}} \times 100\%$$

3.3.10 Preservasi *M. majus* UICC 295 dan kadaver larva *O. rhinoceros* pada suhu -80° C

Pembuatan larutan gliserol dan prosedur preservasi dilakukan berdasarkan Murjito (2010: 22). Pembuatan larutan gliserol dilakukan dengan menambahkan 10,86 ml gliserol 92,1% (v/v) ke dalam akuades hingga volume total larutan 100 ml, sehingga diperoleh larutan gliserol 10% (v/v). Larutan gliserol dihomogenkan dengan vorteks dan dimasukkan sebanyak lima ml ke dalam tabung reaksi. Larutan gliserol yang homogen disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit.

Tahapan pembuatan larutan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v) diawali dengan pembuatan larutan stok gliserol 20% (v/v) dan stok larutan glukosa 10% (v/v). Sebanyak 21,7 ml gliserol 92,1% (v/v) ditambahkan akuades hingga volume total larutan 100 ml, sehingga diperoleh larutan stok gliserol 20% (v/v). Larutan stok gliserol 20% (v/v) dihomogenkan dengan vorteks kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit. Pembuatan larutan stok glukosa 10% (v/v) dilakukan dengan menambahkan 10 g bubuk glukosa ke dalam akuades hingga volume total larutan 100 ml. Larutan stok glukosa 10% (v/v) dihomogenkan dengan vorteks kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit. Larutan stok gliserol 20% (v/v) steril sebanyak 100 ml dan larutan stok glukosa 10% (v/v) steril sebanyak 100 ml dicampur ke dalam satu labu Erlenmeyer, sehingga diperoleh 200 ml larutan yang mengandung gliserol 10% (v/v) dan glukosa 5% (v/v) dengan perbandingan 1:1. Larutan kemudian dihomogenkan dengan vorteks.

Biakan kapang yang digunakan untuk pembuatan suspensi adalah *M. majus* UICC 295 yang diinokulasi dengan metode *streak* sebanyak 15 gores pada medium SDYA miring dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau. Preservasi dilakukan dengan menambahkan masing-masing sebanyak 5 ml larutan gliserol 10% (v/v), larutan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v), dan akuades steril (kontrol) ke dalam biakan kapang *M. majus* UICC 295. Biakan kapang kemudian dikerik menggunakan jarum tanam bulat. Sebanyak

satu ml suspensi kapang dimasukkan ke dalam *cryotube* kemudian diadaptasikan pada suhu dingin dalam lemari pendingin pada suhu 4° C selama satu jam.

Cryotube yang telah berisi suspensi kapang selanjutnya dipreservasi selama 30 hari di dalam *deep freezer* dengan suhu -80° C.

Preservasi *M. majus* UICC 295 yang tumbuh pada kadaver larva *O. rhinoceros* dilakukan sebagai berikut: potongan kadaver larva yang terinfeksi *M. majus* UICC 295 dimasukkan ke dalam *cryotube*. Larutan gliserol 10% (v/v) sebanyak satu ml, larutan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v) sebanyak satu ml, dan akuades steril (kontrol) sebanyak satu ml masing-masing dimasukkan ke dalam *cryotube* yang berisi potongan kadaver larva. *Cryotube* diadaptasikan pada suhu dalam lemari pendingin pada suhu 4 ° C selama satu jam. *Cryotube* yang berisi potongan kadaver larva selanjutnya dipreservasi selama satu hari di dalam *deep freezer* dengan suhu -80° C.

3.3.11 Pengujian viabilitas *M. majus* UICC 295 dan kadaver larva *O. rhinoceros* setelah dipreservasi pada suhu -80° C

Pengujian viabilitas *M. majus* UICC 295 dilakukan dengan menghitung jumlah kapang yang masih hidup setelah dipreservasi dengan melakukan enumerasi. Enumerasi *M. majus* UICC 295 dilakukan dengan metode *Total Plate Count* (TPC) berdasarkan Hogg (2005: 91--93). Viabilitas *M. majus* UICC 295 diketahui dengan melakukan enumerasi kapang *M. majus* UICC 295 pada hari ke-0 preservasi dan pada hari ke-1, ke-14, dan ke-30 setelah preservasi. Proses *thawing* biakan kapang *M. majus* UICC 295 yang telah dipreservasi dilakukan pada suhu 37° C selama satu menit hingga mencair kemudian diencerkan.

Suspensi berisi biakan *M. majus* UICC 295 dalam akuades steril dan dalam larutan protektan diencerkan menggunakan akuades steril dengan faktor pengenceran 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5} . Sebanyak 0,1 ml suspensi dari masing-masing pengenceran disebarkan dengan mikropipet di permukaan medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau dalam cawan petri dengan tiga pengulangan dan diratakan dengan spatel *Drygalski*. Biakan

kemudian diinkubasi pada suhu 28° C dengan kondisi gelap hingga terlihat pertumbuhan kapang.

Jumlah CFU/ml sampel dihitung berdasarkan Hogg (2005: 93) dengan rumus:

$$\text{Jumlah CFU/ml} = \frac{\text{Jumlah rata-rata koloni yang tumbuh}}{\text{Volume inokulum x faktor pengenceran}}$$

Pengujian viabilitas *M. majus* UICC 295 yang terdapat pada kadaver larva *O. rhinoceros* dilakukan dengan menumbuhkan *M. majus* UICC 295 yang terdapat pada kadaver larva di medium pertumbuhan. Viabilitas *M. majus* UICC 295 diketahui dengan melihat pertumbuhan kapang *M. majus* UICC 295 pada hari ke-0 preservasi dan pada hari ke-1 setelah preservasi. Proses *thawing* biakan kapang *M. majus* UICC 295 yang telah dipreservasi dilakukan pada suhu 37° C selama satu menit hingga mencair. Kadaver larva kemudian ditumbuhkan pada medium pertumbuhan dan diamati pertumbuhannya.

3.3.12 Pengolahan dan analisis data

Data yang diperoleh disusun dalam bentuk tabel dan gambar. Data yang diperoleh meliputi data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif meliputi data pengamatan morfologi secara makroskopik kapang *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau. Data kuantitatif meliputi data pengamatan morfologi secara mikroskopik kapang *M. majus* UICC 295 dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau, hasil enumerasi kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau dengan metode TPC, jumlah larva yang mati, berat larva yang masih hidup setelah aplikasi, dan hasil enumerasi kapang *M. majus* UICC 295 setelah preservasi dalam larutan gliserol 10% (v/v) dan dalam larutan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v).

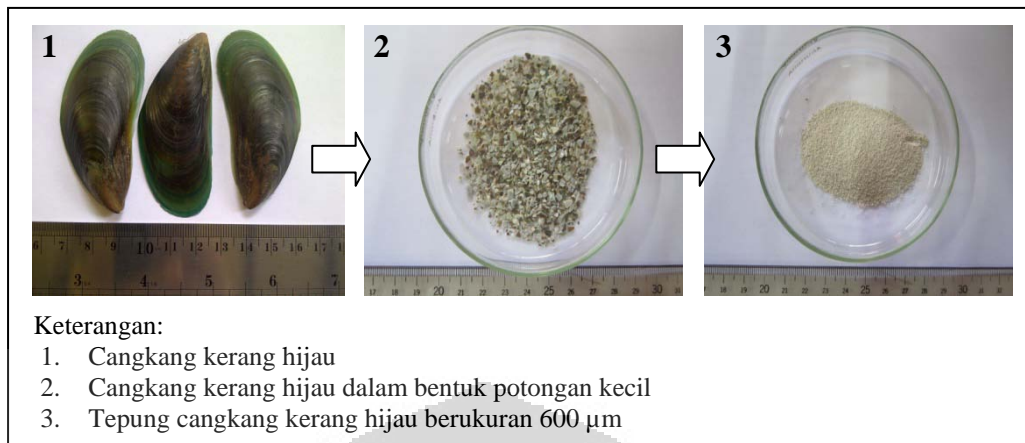
BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 PENGARUH PENAMBAHAN TEPUNG CANGKANG KERANG HIJAU PADA MEDIUM PERTUMBUHAN TERHADAP KARAKTER MORFOLOGI *Metarhizium majus* UICC 295

Ukuran partikel tepung cangkang kerang hijau yang ditambahkan ke dalam medium SDYA adalah 600 μm . Ukuran cangkang kerang hijau dalam bentuk tepung lebih kecil dibandingkan dengan ukuran cangkang kerang hijau dalam bentuk potongan kecil tanpa dijadikan tepung (Gambar 4.1.1). Diduga semakin kecil ukuran partikel substrat maka semakin besar luas permukaan substrat, sehingga semakin besar kemungkinan substrat kontak dengan kapang. Hal tersebut memungkinkan kapang *M. majus* UICC 295 dapat dengan cepat dan mudah mendegradasi tepung sebagai nutrisi untuk melakukan pertumbuhan. Menurut Sindhu dkk. (2012: 502), ukuran partikel substrat memengaruhi jumlah produksi enzim untuk mendegradasi substrat. Jumlah enzim amilase yang dihasilkan *Penicillium janthinellum* pada medium yang mengandung tepung kulit gandum berukuran 425--500 μm adalah 300 U/gds, sedangkan jumlah enzim amilase yang dihasilkan *P. janthinellum* pada medium dengan tepung kulit gandum berukuran 1000--1400 μm adalah 100 U/gds. Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin kecil ukuran substrat maka semakin besar luas permukaan substrat yang kontak dengan kapang. Hal tersebut menyebabkan substrat semakin mudah didegradasi oleh kapang yang ditunjukkan dengan semakin tinggi jumlah produksi enzim yang dihasilkan kapang untuk mendegradasi substrat.

Tepung cangkang kerang hijau sebagai sumber nutrisi bagi pertumbuhan kapang *M. majus* UICC 295 mengandung kitin, protein, kalsium, lipid dan fosfor. Tepung cangkang kerang hijau didegradasi oleh *M. majus* UICC 295 dengan bantuan enzim kitinase, protease, dan lipase yang dimiliki oleh *M. majus* UICC 295. Pertumbuhan kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau dapat diketahui dengan melakukan pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 secara makroskopik dan mikroskopik.



Gambar 4.1.1. Hasil pembuatan tepung cangkang kerang hijau

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Medium SDYA merupakan medium artifisial bagi kapang *M. majus* UICC 295 yang digunakan sebagai sumber nutrisi untuk melakukan pertumbuhan. Medium SDYA mengandung dekstrosa, pepton, ekstrak khamir, dan agar. Dekstrosa atau glukosa merupakan sumber karbon, pepton merupakan sumber karbon dan nitrogen, dan ekstrak khamir merupakan sumber karbon, nitrogen, dan vitamin. Karbon dan nitrogen merupakan makronutrien yang digunakan kapang dalam metabolisme seperti, sintesis karbohidrat, protein, lipid, dan asam nukleat. Ketersediaan karbon dan nitrogen di dalam medium SDYA menyebabkan kapang dapat melakukan metabolisme yang ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan kapang. Pertumbuhan kapang dapat dilihat dengan terbentuknya hifa dan konidia pada koloni kapang. Menurut Deacon (2006: 101), pembentukan konidiofor tidak akan terjadi apabila pada medium pertumbuhan tidak mengandung nitrogen. Nitrogen akan digunakan konidiofor untuk membentuk fialid. Pembentukan konidia oleh fialid ditunjang dengan keberadaan glukosa dan nitrogen pada medium pertumbuhan.

Pertumbuhan kapang *M. majus* UICC 295 selain dipengaruhi oleh nutrisi dalam medium pertumbuhan juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti, pH, suhu, dan sinar matahari. Medium SDYA memiliki pH 6 dan medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau memiliki pH 8. Suhu inkubasi *M. majus* UICC 295 adalah 28° C dengan kondisi gelap. Matsumoto (2006: 297)

melaporkan bahwa *M. anisopliae* dapat tumbuh pada lingkungan dengan kisaran pH 2,5--10,5. Menurut Zimmermann (2007: 893 & 909), *M. anisopliae* dapat tumbuh dengan baik pada lingkungan dengan kisaran suhu 25--30° C. Paparan sinar matahari pada *M. anisopliae* dapat menghambat germinasi konidia, sehingga dibutuhkan kondisi gelap selama pertumbuhan *M. anisopliae*.

Pertumbuhan kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan miselium pada hari ke-5, *full sporulation* pada hari ke-21 dan pertambahan ukuran diameter koloni. Deskripsi morfologi kapang *M. majus* UICC 295 berumur 18 hari yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan suhu inkubasi 28° C dan kondisi gelap adalah sebagai berikut: warna miselium putih dengan konidia berwarna *olive green* (berdasarkan standar warna Faber Castell), warna sebalik koloni kuning, tekstur granular, *exudate drops* berwarna kuning, memiliki zonasi, *growing zone* dan *radial furrow* (Tabel 4.1.1 dan Gambar 4.1.1). Hasil pengamatan kapang *M. majus* UICC 295 sesuai dengan deskripsi oleh Bischoff dkk. (2009: 516) dan deskripsi Purnamasari (2011: 30) kecuali karakter morfologi berupa zonasi dan *radial furrow*. Bischoff dkk. (2009: 516) mendeskripsikan bahwa *M. majus* pada medium SDAY berumur 14 hari yang diinkubasi pada suhu 23° C memiliki konidia berwarna *olive green*. Purnamasari (2011: 30) mendeskripsikan bahwa *M. majus* UICC 295 berumur 19 hari pada medium SDYA dengan suhu inkubasi 22--24° C memiliki tekstur koloni granular, warna sebalik koloni hialin, dan memiliki zona pertumbuhan dengan *exudate drops* berwarna kuning. *Metarhizium majus* UICC 295 tidak memiliki zonasi dan jari-jari koloni.

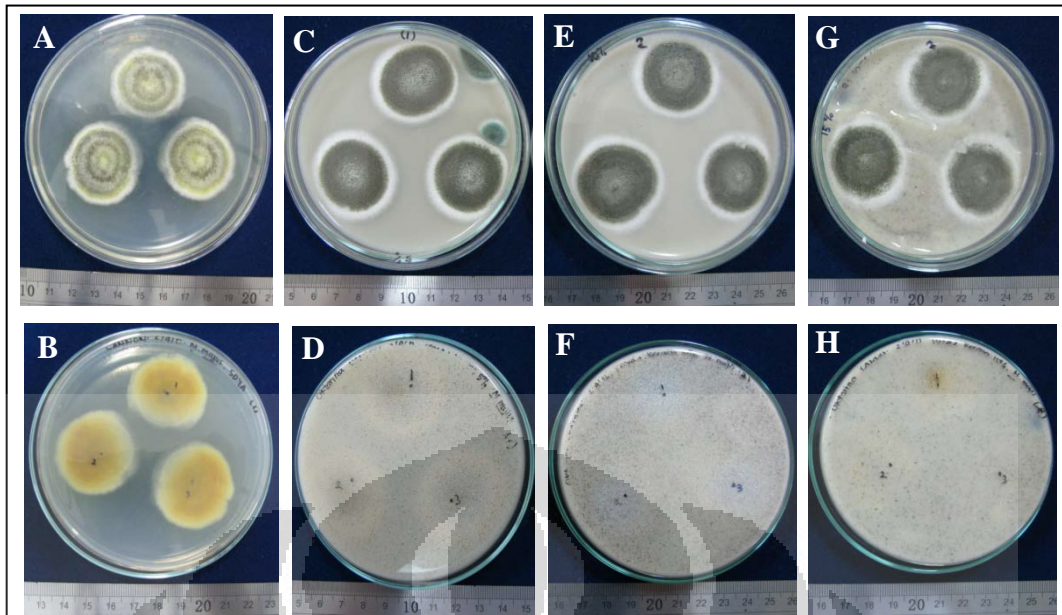
Penambahan berbagai konsentrasi tepung cangkang kerang hijau dilakukan untuk mengetahui konsentrasi tepung cangkang kerang hijau dalam medium SDYA yang paling mendukung pertumbuhan kapang *M. majus* UICC 295. Pertumbuhan kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan hifa pada hari ke-3, *full sporulation* pada hari ke-10 dan ukuran diameter koloni. Deskripsi morfologi kapang *M. majus* UICC 295 berumur 10 hari yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) dengan suhu inkubasi

28° C dan kondisi gelap adalah sebagai berikut: warna miselium putih dengan konidia berwarna *sea green* (berdasarkan standar warna Faber Castell), warna sebalik koloni hialin, tekstur granular, *exudate drops* berwarna bening, memiliki zonasi dan *growing zone*, tetapi tidak memiliki *radial furrow* (Tabel 4.1.1 dan Gambar 4.1.1).

Hasil pengamatan morfologi kapang *M. majus* UICC 295 dengan mikroskop stereo menunjukkan bahwa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau memiliki kerapatan konidia lebih tinggi dibandingkan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA. Tepung cangkang kerang hijau yang ditambahkan pada medium pertumbuhan merupakan sumber kitin, protein, lipid, kalsium, dan fosfor tambahan bagi pertumbuhan kapang *M. majus* UICC 295. Karbon, nitrogen dan fosfor merupakan makronutrien, sedangkan kalsium merupakan mikronutrien bagi pertumbuhan kapang. Sumber nutrisi tambahan yang terkandung dalam tepung cangkang kerang hijau diduga menyebabkan kapang *M. majus* UICC 295 memiliki kerapatan konidia yang lebih tinggi dan lebih cepat mengalami *full sporulation*. Keberadaan sumber karbon tambahan diduga menyebabkan kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau mengalami *full sporulation* lebih cepat 11 hari dibandingkan dengan kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA. Menurut Leger dkk. (1994: 1657), germinasi konidia, jumlah konidia, dan sporulasi kapang dipengaruhi oleh nutrisi pada medium pertumbuhan. Germinasi konidia *M. anisopliae* dipengaruhi oleh keberadaan sumber karbon pada medium pertumbuhan. Menurut Alam dkk. (2001: 1226), pigmentasi konidia dipengaruhi oleh keberadaan glukosa. Penambahan glukosa sebanyak 35 gram pada medium *Potato agar* menyebabkan pigmentasi konidia *Botryodiplodia theobromae* Pat. berwarna hitam sebanyak 100% pada hari ke-15. Hal tersebut menunjukkan bahwa kapang telah *full sporulation*. *Botryodiplodia theobromae* yang ditumbuhkan pada medium *Potato agar* tanpa penambahan glukosa menghasilkan konidia dengan pigmentasi warna hitam sebanyak 5% dan konidia berwarna putih sebanyak 95% pada hari ke-15. Pigmentasi konidia kapang *B. theobromae* meningkat sesuai dengan penambahan konsentrasi glukosa pada medium *Potato agar*.

Tabel 4.1.1. Hasil pengamatan morfologi kapang *M. majus* UICC 295 secara makroskopik dalam medium SDYA umur 18 hari dan medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) umur 10 hari dengan suhu inkubasi 28° C dan kondisi gelap

Karakteristik	SDYA	SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau		
		5% (b/v)	10% (b/v)	15% (b/v)
Warna	<i>Olive green</i>	<i>Sea green</i>	<i>Sea green</i>	<i>Sea green</i>
Warna sebalik koloni	Kuning	Hialin	Hialin	Hialin
Tekstur	Granular	Granular	Granular	Granular
<i>Exudate drops</i>	Ada	Ada	Ada	Ada
<i>Zonasi</i>	Ada	Ada	Ada	Ada
<i>Radial furrow</i>	Ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
<i>Growing zone</i>	Ada	Ada	Ada	Ada
Diameter koloni umur 10 hari	20,85 mm	26,27 mm	26,71 mm	24,65 mm

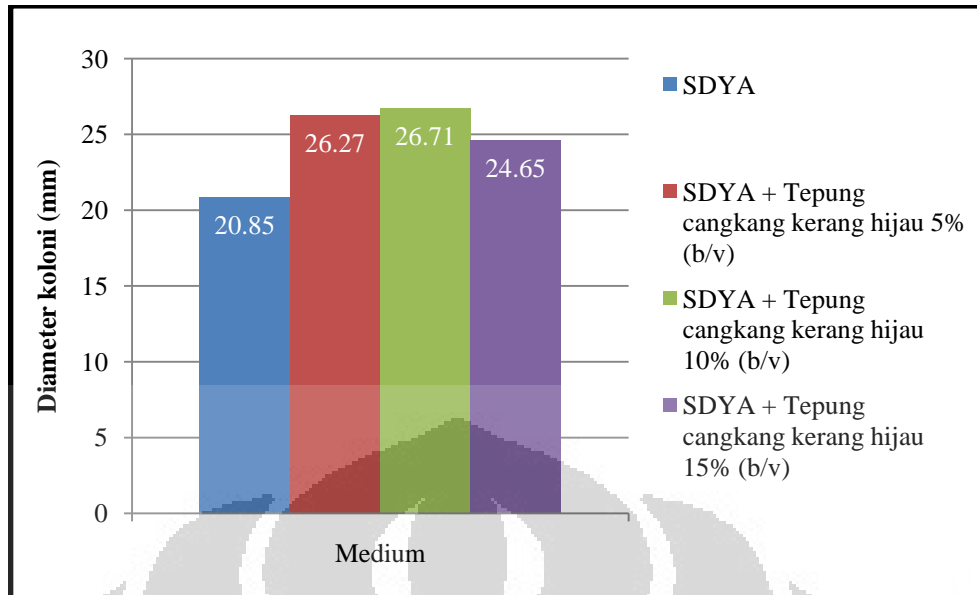


Keterangan :

- A. Koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA
- B. Sebalik koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA
- C. Koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 5% (b/v)
- D. Sebalik koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 5% (b/v)
- E. Koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v)
- F. Sebalik koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v)
- G. Koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 15% (b/v)
- H. Sebalik koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 15% (b/v)

Gambar 4.1.2. Koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA umur 18 hari dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau umur 10 hari dengan suhu inkubasi 28° C dan kondisi gelap

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.1.3. Diagram batang ukuran diameter koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau berumur 10 hari

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Hasil pengukuran diameter koloni *M. majus* UICC 295 menunjukkan bahwa penambahan tepung cangkang kerang hijau memberikan pengaruh terhadap besarnya diameter koloni *M. majus* UICC 295 (Gambar 4.1.3). Namun demikian, jumlah inokulum yang diinokulasikan pada masing-masing medium tidak seragam, sehingga diameter koloni tidak dapat menunjukkan perbedaan pengaruh penambahan tepung cangkang kerang hijau pada medium SDYA secara nyata. Oleh karena itu, hasil pengamatan ukuran diameter koloni perlu ditunjang dengan hasil pengamatan ukuran hifa dan konidia *M. majus* UICC 295. Pertambahan ukuran diameter koloni mengindikasikan peningkatan ukuran pertumbuhan kapang, khususnya pertumbuhan panjang hifa pada koloni kapang. Pertumbuhan hifa dipengaruhi oleh keberadaan nutrisi yang terdapat di dalam medium SDYA. Keberadaan kitin dan protein pada medium pertumbuhan diduga memiliki pengaruh pada pertumbuhan hifa kapang. Tepung cangkang kerang hijau mengandung kitin, protein, kalsium, lipid, dan fosfor yang merupakan nutrisi tambahan bagi pertumbuhan *M. majus* UICC 295. Kitin dan protein merupakan sumber karbon dan nitrogen yang diduga berperan dalam proses

pembentukan hifa dan germinasi konidia. Menurut Walker dan White (2005: 13), fosfor berperan penting dalam biosintesis asam nukleat, fosfolipid, dan ATP. Menurut Carlile dkk. (2001: 114), pertumbuhan ujung hifa dipengaruhi oleh sintesis kitin dan sintesis β -(1,3)-glukan. Kitin dan glukan merupakan komponen penyusun dinding sel hifa. Kitin pada medium pertumbuhan dapat digunakan oleh kapang dengan mengkonversi *glucose-6-phosphate* menjadi prekursor kitin, yaitu *uridine diphosphate N-acetylglucosamine* (UDP-GlcNAc). Senyawa UDP-GlcNAc akan diubah menjadi monomer kitin dengan bantuan enzim kitin sintase. Monomer kitin akan digunakan kapang untuk pembentukan ujung sel hifa, percabangan hifa, dan pembentukan septa. Mustafa dan Kaur (2009: 926 & 929) melaporkan bahwa kandungan karbon dan nitrogen pada medium *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) memengaruhi besarnya ukuran diameter koloni *M. anisopliae*. *Metarhizium anisopliae* berumur 8 hari dengan suhu inkubasi 28° C pada medium SDA dengan kandungan glukosa dan pepton 35:1 mengalami peningkatan ukuran diameter koloni 0,35 mm per hari dibandingkan dengan diameter koloni *M. anisopliae* pada medium SDA dengan kandungan glukosa dan pepton 10:1.

Hasil pengamatan morfologi kapang *M. majus* UICC 295 secara mikroskopik yang ditumbuhkan pada medium SDYA berumur 21 hari menunjukkan kapang memiliki hifa bercabang dan berseptum. Kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA memiliki lebar hifa (1,84--2,91) μm (Gambar 4.1.3, Tabel 4.1.2, dan Lampiran 5). Kisaran ukuran lebar hifa *M. majus* UICC 295 sesuai dengan deskripsi *M. majus* oleh Tzean dkk. (1997: 150). Tzean dkk. (1997: 150) mendeskripsikan bahwa *M. var. majus* pada medium SDYA memiliki hifa bercabang dan berseptum dengan ukuran lebar (1,8--4,0) μm .

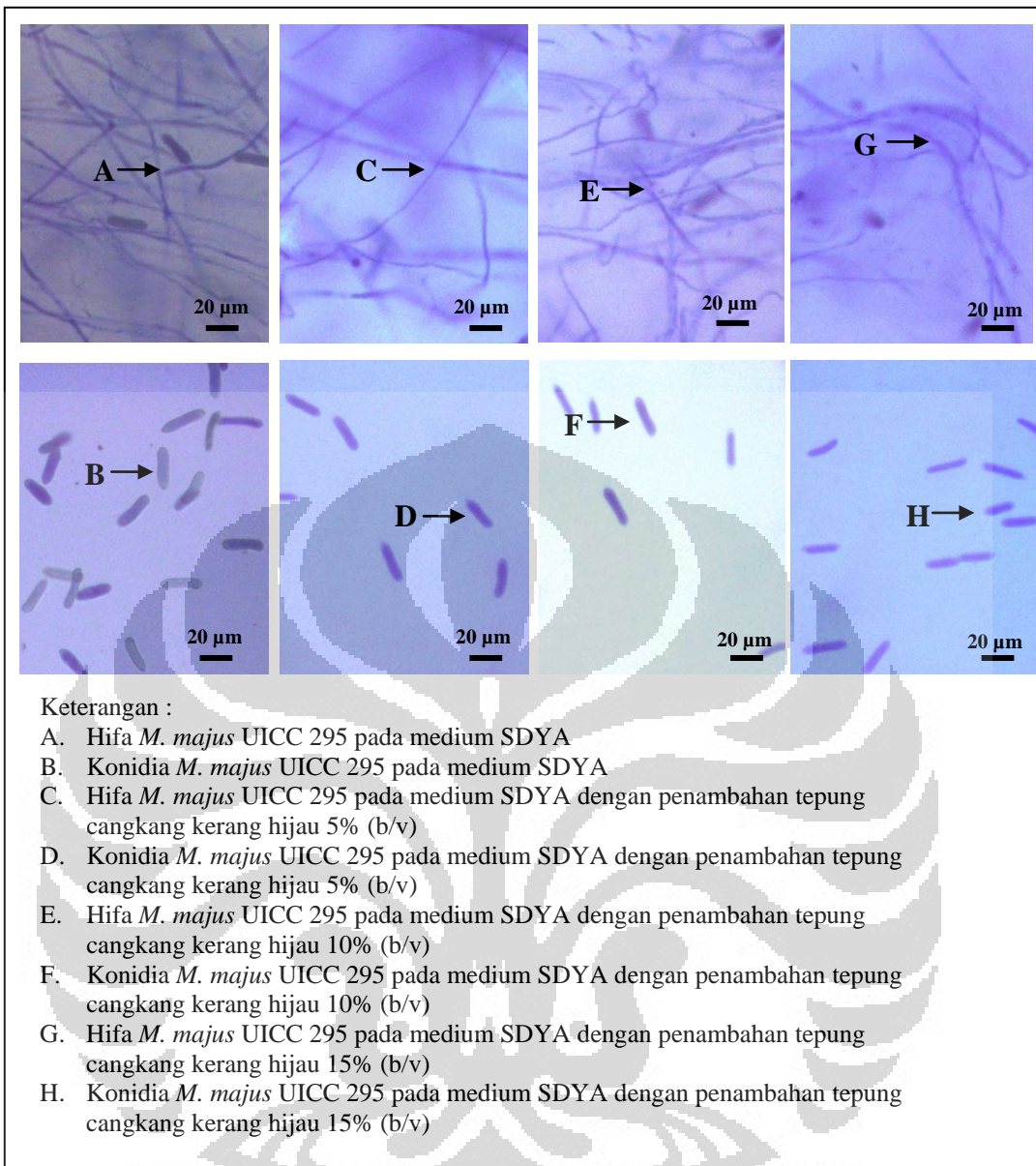
Konidia kapang *M. majus* UICC 295 berbentuk silindris dengan ukuran (19,32--26,44) x (4,60--7,49) μm (Gambar 4.1.3, Tabel 4.1.2, dan Lampiran 5). Namun demikian, terdapat perbedaan ukuran panjang dan lebar konidia *M. majus* UICC 295 yang diduga karena perbedaan umur saat pengamatan morfologi secara mikroskopik dibandingkan dengan deskripsi *M. majus* oleh Bischoff dkk. (2009: 525). Bischoff dkk. (2009: 525) mendeskripsikan bahwa *M. majus* berumur 14

hari pada medium SDYA dengan suhu inkubasi 23° C memiliki konidia berbentuk silindris dengan ukuran (8,5--14,5) x (2,5--5) µm.

Hasil pengamatan morfologi kapang *M. majus* UICC 295 secara mikroskopik yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 5% (b/v) (Lampiran 6), 10% (b/v) (Lampiran 7), dan 15% (b/v) (Lampiran 8) berumur 10 hari menunjukkan kapang memiliki hifa bercabang dan berseptum serta konidia berbentuk silindris (Gambar 4.1.3 dan Tabel 4.1.2).

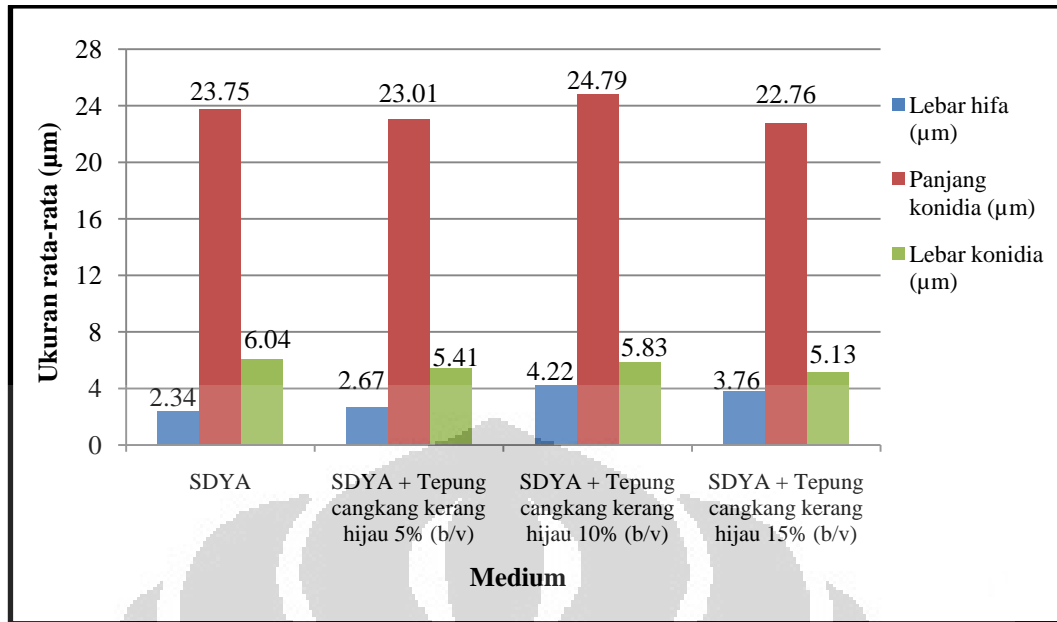
Tabel 4.1.2. Hasil pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 secara mikroskopik pada medium SDYA umur 21 hari dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau umur 14 hari dengan suhu inkubasi 28° C dan kondisi gelap

Karakter morfologi	SDYA	SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau			
		5%(b/v)	10%(b/v)	15%(b/v)	
Hifa	Septa	Ada	Ada	Ada	Ada
	Percabangan	Ada	Ada	Ada	Ada
	Kisaran lebar (µm) ± SD	1,84--2,91 ± 0,37	1,95--3,68 ± 0,39	3,25--5,76 ± 0,58	2,68--4,74 ± 0,60
	Rata-rata lebar (µm) ± SD	2,34 ± 0,37	2,67 ± 0,39	4,22 ± 0,58	3,76 ± 0,60
	Bentuk	Silindris	Silindris	Silindris	Silindris
Konidia	Kisaran panjang (µm) ± SD	19,32--26,44 ± 2,10	20,83--24,29 ± 1,06	23,60--26,70 ± 0,81	20,56--24,34 ± 1,19
	Rata-rata panjang (µm) ± SD	23,75 ± 2,10	23,01 ± 1,06	24,79 ± 0,81	22,76 ± 1,19
	Kisaran lebar (µm) ± SD	4,60--7,49 ± 0,73	4,34--5,97 ± 0,40	4,60--6,59 ± 0,58	4,24--5,82 ± 0,43
	Rata-rata lebar (µm) ± SD	6,04 ± 0,73	5,41 ± 0,40	5,83 ± 0,58	5,13 ± 0,43
	Bentuk	Silindris	Silindris	Silindris	Silindris



Gambar 4.1.4. Hasil pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 secara mikroskopik pada medium SDYA umur 21 hari dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau umur 14 hari dengan suhu inkubasi 28° C dan kondisi gelap

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.1.5. Diagram batang ukuran lebar hifa, panjang dan lebar konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau berumur 10 hari

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Hasil pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 secara mikroskopik menunjukkan bahwa panjang konidia rata-rata dan lebar hifa rata-rata yang paling besar dimiliki oleh *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v). *Metarhizium majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) memiliki panjang konidia dan lebar hifa rata-rata lebih besar dibandingkan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 5% (b/v) (Gambar 4.1.5). Menurut Dawes dan Sutherland (1992: 43-44), konsentrasi suatu substrat pada medium pertumbuhan dapat memengaruhi tingkat pertumbuhan mikroorganisme. Apabila konsentrasi suatu substrat pada medium pertumbuhan dikurangi, maka tingkat pertumbuhan akan menurun. Penurunan yang terjadi tidak akan terlihat nyata secara relatif hingga konsentrasi substrat terendah dicapai.

Metarhizium majus UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) memiliki panjang konidia dan lebar hifa rata-rata lebih besar dibandingkan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA

dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 15% (b/v) (Gambar 4.1.5). Kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 15% (b/v) menunjukkan ukuran panjang dan lebar konidia serta diameter koloni paling kecil dibandingkan dengan kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 5% (b/v), 10% (b/v), dan pada medium SDYA (kontrol). Diduga kapang yang ditumbuhkan pada medium pertumbuhan dengan konsentrasi kitin terlalu tinggi dapat menyebabkan kapang menghasilkan katabolit yang berlebih. Katabolit tersebut dapat menekan ekspresi gen kapang dalam memproduksi enzim, sehingga kapang tidak dapat memproduksi enzim kitinase untuk mendegradasi kitin sebagai sumber nutrisi untuk melakukan pertumbuhan. Menurut Herlinda dkk. (2006: 76--77), penambahan konsentrasi kitin yang terlalu tinggi pada medium pertumbuhan kapang dapat menghambat pembentukan konidia. Menurut Dhar dan Kaur (2010: 8098), kapang yang ditumbuhkan pada medium kitin koloidal yang mengandung N-asetil-glukosamin dapat menginduksi gen penghasil enzim kitinase pada kapang untuk memproduksi enzim kitinase. Namun demikian, kapang yang ditumbuhkan pada medium yang mengandung N-asetil-glukosamin dengan konsentrasi yang tinggi dapat menyebabkan kapang menghasilkan katabolit berlebih yang dapat menekan ekspresi gen penghasil enzim kitinase. Hal tersebut menyebabkan enzim kitinase tidak dapat diproduksi oleh kapang.

Berdasarkan ukuran lebar hifa rata-rata, panjang konidia rata-rata, dan pertambahan ukuran diameter koloni rata-rata, *M. majus* UICC 295 yang memiliki ukuran paling besar adalah *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v). Oleh karena itu, tepung cangkang kerang hijau pada konsentrasi 10% (b/v) dianggap yang paling mendukung pertumbuhan *M. majus* UICC 295. *Metarhizium majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) memiliki panjang konidia dan lebar hifa rata-rata lebih besar dibandingkan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA. Perbedaan tersebut diduga karena pengaruh penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) pada medium SDYA. Kitin yang terdapat pada tepung cangkang kerang hijau digunakan oleh *M. majus* UICC 295 sebagai prekursor untuk membentuk

mikrofibril yang merupakan penyusun utama dinding sel hifa. Hal tersebut menyebabkan peningkatan lebar hifa rata-rata *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) dibandingkan pada medium SDYA. Menurut Carlile dkk. (2001: 100), kitin adalah polimer linier N-asetilglukosamin yang subunitnya dihubungkan oleh ikatan β -(1,4)-glukosida. Ikatan hidrogen yang sangat kuat akan membentuk struktur rigid pada fungi. Substrat kitin dalam medium pertumbuhan akan digunakan fungi untuk pembentukan dinding sel hifa melalui proses pembentukan *microfibril*. Kitin juga berperan dalam proses pemanjangan *germ tube* secara longitudinal, dan pembentukan septa pada hifa.

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 secara mikroskopik diketahui bahwa terdapat perbedaan ukuran rata-rata maupun kisaran panjang konidia, lebar konidia, dan lebar hifa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau. Namun demikian, untuk mengetahui apakah penambahan tepung cangkang kerang hijau pada medium SDYA memberikan pengaruh secara nyata pada ukuran konidia dan hifa kapang *M. majus* UICC 295 perlu dilakukan uji statistika. Berdasarkan hasil perhitungan statistika dengan uji ANOVA diketahui bahwa terdapat perbedaan ukuran panjang konidia (Lampiran 9), lebar konidia (Lampiran 11), dan lebar hifa (Lampiran 13) kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa penambahan tepung cangkang kerang hijau pada medium SDYA memberikan pengaruh pada ukuran panjang konidia, lebar konidia dan lebar hifa kapang *M. majus* UICC 295.

Berdasarkan uji Tukey, penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) berbeda nyata pada panjang konidia rata-rata *M. majus* UICC 295 dibandingkan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA maupun pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 5% (b/v) dan 15% (b/v) (Lampiran 10). Berdasarkan uji Tukey, penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) dan 15% (b/v) berbeda nyata pada lebar hifa rata-rata

M. majus UICC 295 dibandingkan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA maupun pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 5% (b/v) (Lampiran 14). Namun demikian, penambahan tepung cangkang kerang hijau 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) tidak berbeda nyata pada ukuran lebar konidia rata-rata *M. majus* UICC 295 (Lampiran 12). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) pada medium SDYA memberikan pengaruh nyata pada ukuran panjang konidia dan lebar hifa kapang *M. majus* UICC 295.

4.2. PENGUJIAN SUSPENSI KAPANG *Metarhizium majus* UICC 295 PADA LARVA *Oryctes rhinoceros*

Hasil enumerasi konidia *M. majus* UICC 295 yang viabel pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) berumur 23 hari adalah $(1,12--3,5) \times 10^6$ CFU/ml dan pada medium SDYA adalah $(6,20--7,00) \times 10^6$ CFU/ml (Lampiran 15). Hasil hemositometer jumlah total konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) berumur 23 hari adalah $1,23 \times 10^7$ konidia/ml dan pada medium SDYA adalah $8,7 \times 10^6$ konidia/ml (Lampiran 16).

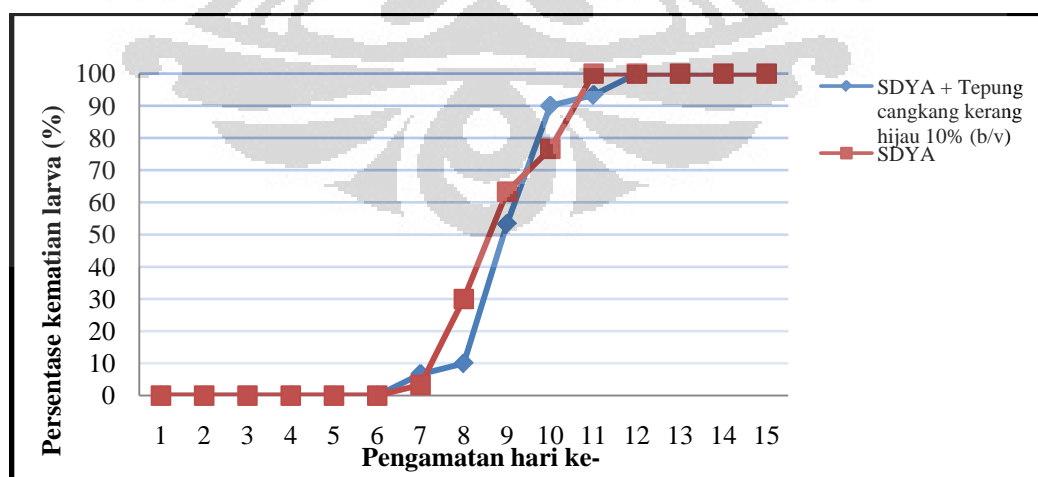
Berdasarkan hasil hemositometer jumlah total konidia/ml pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) lebih banyak 41,37% dibandingkan pada medium SDYA. Penambahan tepung cangkang kerang hijau pada medium SDYA mengindikasikan dapat meningkatkan produksi konidia. Kapang *M. majus* UICC 295 memanfaatkan tepung cangkang kerang hijau sebagai sumber karbon dan nitrogen karena karbon berperan dalam proses germinasi konidia dan nitrogen berperan dalam pertumbuhan hifa. Hifa *M. majus* UICC 295 akan berkembang membentuk *conidiogenous cell* (fialid) yang akan menghasilkan konidia, dengan demikian semakin banyak hifa yang dihasilkan diduga akan semakin banyak konidia yang dihasilkan. Menurut Weber dan Webster (2007: 30--31), hifa akan berkembang membentuk *conidiogenous cell* (fialid), yaitu sel yang dapat menghasilkan

konidia. Jumlah hifa pada koloni kapang akan memengaruhi jumlah *conidiogenous cell* yang menghasilkan konidia.

Aplikasi tiga hari berturut-turut diharapkan dapat memperbesar jumlah konidia kapang yang melekat pada tubuh larva, sehingga jumlah konidia kapang yang dapat menginfeksi larva lebih besar pula. Jumlah konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) yang diaplikasikan pada larva *O. rhinoceros* adalah 1×10^7 konidia/ml. Pengulangan aplikasi dan jumlah suspensi kapang yang diaplikasikan pada larva dapat memengaruhi keberhasilan kapang menginfeksi larva. Berdasarkan Prayogo dkk. (2005: 24), konidia *M. anisopliae* yang diaplikasikan sebanyak 10^7 konidia/ml sebanyak satu kali hanya dapat membunuh larva *Spodoptera litura* sebanyak 40%, sedangkan aplikasi konidia *M. anisopliae* tiga kali berturut-turut dapat membunuh larva *S. litura* sebanyak 83%. Aplikasi konidia *M. anisopliae* sebanyak tiga kali berturut-turut dengan jumlah 10^7 konidia /ml merupakan metode yang paling efektif dalam mengendalikan larva *S. litura*.

Penghitungan jumlah larva yang mati setelah aplikasi dilakukan setiap hari selama 15 hari. Larva *O. rhinoceros* yang diaplikasikan kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) mengalami kematian 6,67%--100% dalam waktu 7--12 hari (Lampiran 17). Larva *O. rhinoceros* yang diaplikasikan kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA mengalami 3,33%--100% kematian dalam waktu 7--11 hari (Lampiran 18). Larva pada kelompok kontrol tidak mengalami kematian. Hasil pengamatan menunjukkan persentase kematian larva terkoreksi adalah 100%. Keberhasilan *M. majus* UICC 295 dalam menyebabkan mortalitas larva 100% dipengaruhi oleh keberhasilan germinasi konidia pada larva sebagai tahap awal kapang menginfeksi larva (Gambar 4.2.1). Germinasi konidia kapang dipengaruhi oleh suhu, kelembapan relatif dan cahaya matahari. Kisaran suhu ruangan selama 15 hari pengamatan adalah 27,1--28,4° C. Kisaran suhu tersebut merupakan kisaran suhu yang cocok untuk germinasi konidia dan pertumbuhan kapang. Kelembapan relatif yang dibutuhkan konidia untuk bergerminasi dan berpenetrasi adalah di atas 90%. Kelembapan relatif ruangan pada tiga hari aplikasi kapang berturut-turut adalah 90%, 91%, dan 90%. Kondisi ruangan selama masa adaptasi

hingga 15 hari setelah aplikasi adalah gelap dan terhindar dari cahaya matahari. Paparan cahaya matahari diduga dapat menghambat germinasi konidia karena cahaya matahari dapat meningkatkan suhu ruangan yang menyebabkan kelembapan turun, sehingga menghambat germinasi konidia. Selain itu, paparan cahaya matahari diduga dapat menyebabkan kerusakan DNA pada konidia kapang *M. majus* UICC 295. Kerusakan tersebut menyebabkan DNA pada konidia kapang tidak dapat bereplikasi untuk membentuk sel yang baru, sehingga germinasi konidia terhambat. Faktor lingkungan seperti suhu, kelembapan relatif, dan kondisi gelap yang mendukung pertumbuhan *M. majus* UICC 295 diduga menyebabkan kapang *M. majus* UICC 295 berhasil bergerminasi, berpenetrasi dan tumbuh pada tubuh larva. Menurut Prayogo (2006: 49), kelembapan di atas 90% selama 6--12 jam setelah aplikasi dibutuhkan kapang untuk bergerminasi dan berpenetrasi ke dalam tubuh larva. Menurut Zimmermann (2007: 893 & 909), *M. anisopliae* dapat tumbuh dengan baik pada lingkungan dengan kisaran suhu 25--30° C. Paparan sinar matahari pada *M. anisopliae* dapat menghambat germinasi konidia, sehingga dibutuhkan kondisi gelap selama pertumbuhan *M. anisopliae*. Menurut Chelico dkk. (2006: 969), paparan sinar matahari dapat menyebabkan kerusakan DNA pada konidia kapang entomopatogen. Konidia yang terpapar sinar matahari menjadi tidak aktif melakukan *DNA damage repair*, sehingga DNA menjadi rusak dan tidak dapat bereplikasi membentuk sel baru.



Gambar 4.2.1. Grafik persentase kematian larva *O. rhinoceros* setelah diaplikasi *M. majus* UICC 295 selama 15 hari
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Seluruh larva *O. rhinoceros* yang terinfeksi kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) dan pada medium SDYA menunjukkan gejala awal seperti gerakan tubuh melambat, warna tubuh menjadi kusam, dan timbul bercak berwarna coklat kehitaman pada permukaan tubuh larva *O. rhinoceros*. Gerakan tubuh larva melambat terlihat pada hari ke-4 setelah aplikasi diduga disebabkan oleh infeksi kapang *M. majus* UICC 295. Kapang yang berhasil berpenetrasi ke dalam tubuh larva kemudian berkembang di dalam hemolimfa larva. Kapang di dalam hemolimfa larva menggunakan cairan dan jaringan tubuh larva sebagai nutrisi dan menghasilkan destruktin yang dapat menyebabkan kelumpuhan sel dan kelainan fungsi lambung bagian tengah. Kelainan fungsi lambung diduga menyebabkan nutrisi dalam tubuh larva tidak dapat dicerna, sehingga larva menjadi kekurangan nutrisi dan kemudian menjadi lemas. Hal tersebut menyebabkan penurunan aktivitas larva berupa aktivitas makan dan bergerak. Menurut Sambiran dan Hosang (2007: 7), gejala infeksi kapang *Metarhizium* terlihat dengan perubahan warna pada tubuh larva *O. rhinoceros* menjadi kusam, gerakan larva menjadi lambat, dan penurunan aktivitas makan.

Bercak berwarna coklat kehitaman terlihat pada permukaan tubuh larva pada hari ke-5 setelah aplikasi (Gambar 4.2.2). Bercak coklat kehitaman tersebut adalah pigmen melanin yang terbentuk melalui proses melanisasi. Hasil pengamatan menunjukkan terdapat lima larva yang mengalami melanisasi pada hari ke-5 setelah aplikasi, sepuluh larva pada hari ke-6 setelah aplikasi, 19 larva pada hari ke-7 setelah aplikasi, dan 30 larva pada hari ke-8 setelah aplikasi. Melanisasi terjadi pada bagian bawah tubuh larva, bagian ruas antar tubuh dan abdomen larva. Kapang yang masuk ke dalam tubuh larva dikenali oleh sistem imunitas tubuh larva sebagai partikel asing yang harus dihancurkan karena dapat menyebabkan gangguan metabolisme. Hal tersebut menyebabkan sistem imunitas tubuh larva menghasilkan pigmen melanin untuk menghancurkan kapang yang masuk ke dalam tubuh larva. Menurut Vilmos dan Kurucz (1998: 60), melanisasi adalah salah satu mekanisme pertahanan diri serangga terhadap infeksi kapang. Melanisasi adalah proses pembentukan pigmen hitam (melanin) oleh enzim *phenoloxidase* di dalam hemosit. Melanin akan dikeluarkan oleh sel yang rusak

ke dalam kutikula atau di sekitar luka pada tubuh serangga. Menurut Capinera (2008: 1943), produksi melanin menyebabkan tubuh serangga menjadi menggelap. Hal tersebut merupakan respon serangga terhadap partikel asing yang masuk ke dalam hemolimfa.

Larva yang diaplikasikan dengan suspensi kapang *M. majus* UICC 295 berumur 23 hari pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) mulai mati sebanyak 6,67% pada hari ke-7 setelah aplikasi dan mencapai kematian 100% pada hari ke-12 setelah aplikasi. Tubuh larva yang mati mengeras seperti mumi. Empat hari setelah kematian larva, miselium berwarna putih muncul di sekitar kepala dan abdomen tubuh larva. Enam hari setelah kematian larva, konidia berwarna *juniper green* menutupi permukaan tubuh larva (Gambar 4.2.3). Larva yang diapikasi dengan suspensi kapang *M. majus* UICC 295 berumur 23 hari pada medium SDYA mulai mati sebanyak 3,33% pada hari ke-7 setelah aplikasi dan mencapai kematian 100% pada hari ke-11 setelah aplikasi. Tubuh larva yang mati mengeras seperti mumi. Tiga hari setelah kematian larva, miselium berwarna putih muncul di sekitar kepala dan abdomen tubuh larva. Lima hari setelah kematian larva, konidia berwarna *olive green* menutupi permukaan tubuh larva. Larva yang telah mati ditumbuhi hifa kapang yang menembus keluar tubuh larva melalui bagian integumen melalui celah alami pada tubuh larva, dan membentuk konidia. Warna konidia *M. majus* UICC 295 pada tubuh larva memperlihatkan warna yang sama saat *M. majus* UICC 295 ditumbuhkan pada medium pertumbuhan.

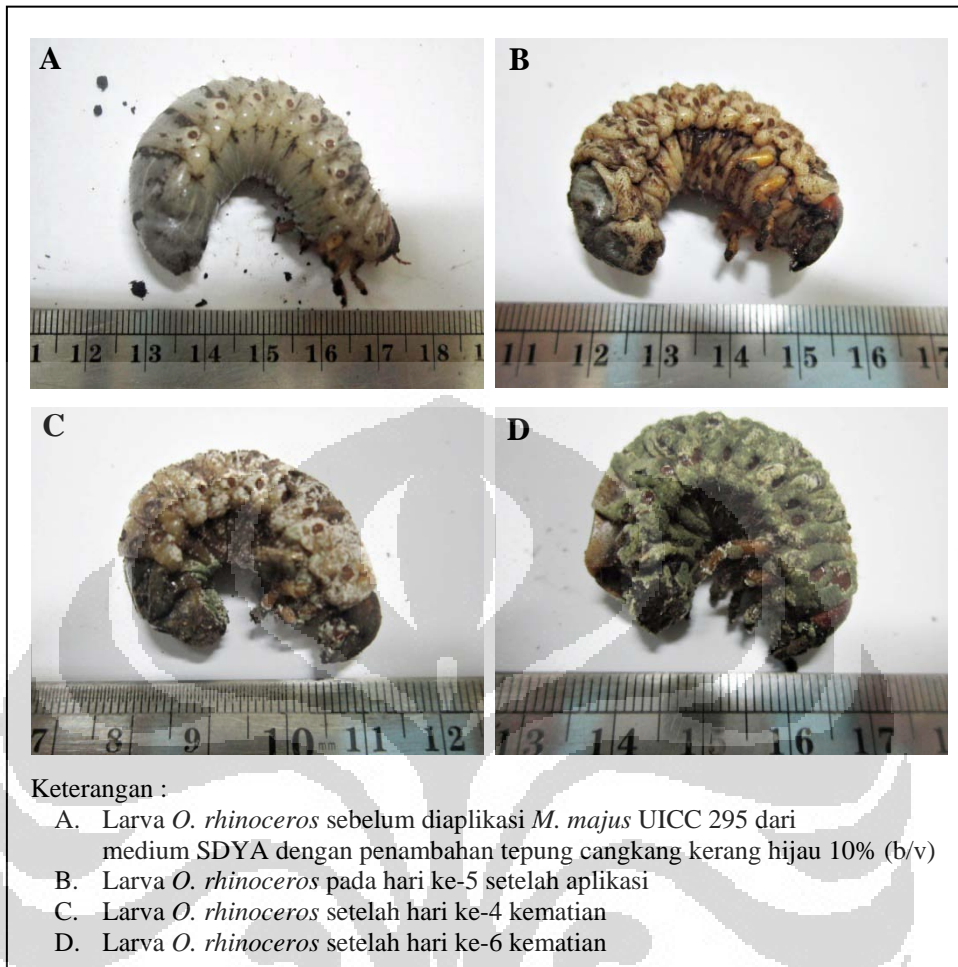
Kapang *M. majus* UICC 295 berhasil menyebabkan kematian pada larva karena konidia kapang yang melekat pada permukaan tubuh larva *O. rhinoceros* berhasil bergerminasi membentuk *germ tube*. *Germ tube* berpenetrasi ke dalam tubuh larva dengan mengeluarkan enzim kitinase, protease, dan lipase untuk mendegradasi kutikula larva yang mengandung kitin, protein, dan lipid. *Germ tube* akan masuk ke dalam hemolimfa larva dan berkembang menjadi hifa dengan menggunakan jaringan dan cairan tubuh larva sebagai nutrisi. Hifa kapang *M. majus* UICC 295 dapat menghasilkan toksin neuromuskular berupa destruksin yang dapat menyebabkan kelumpuhan sel dan kelainan fungsi jaringan tubuh. Toksin akan terus dihasilkan oleh kapang selama berada di dalam tubuh larva.

Penggunaan cairan dan jaringan tubuh larva sebagai nutrisi oleh kapang dan destruksin yang dihasilkan oleh kapang diduga menyebabkan kematian larva. Kapang *M. majus* UICC 295 akan menggunakan tubuh larva sebagai sumber nutrisi hingga habis dan kemudian hifa kapang akan keluar dari dalam tubuh larva. Menurut Widiyanti dan Muyadihardja (2004: 29), kapang *M. anisopliae* menghasilkan metabolit sekunder, yaitu destruksin yang dapat menyebabkan kelumpuhan sel dan kelainan fungsi lambung bagian tengah, tubulus malphigi, dan jaringan otot pada serangga. Menurut Sambiran dan Hosang (2007: 7), tubuh larva *O. rhinoceros* yang mati akan mengeras dan beberapa hari setelah kematian larva *O. rhinoceros*, konidia *M. anisopliae* yang berwarna hijau akan menutupi permukaan tubuh larva. Zimmermann (2007: 887) melaporkan bahwa *M. anisopliae* akan keluar dari dalam tubuh serangga melalui kutikula serangga jika bagian dalam tubuh serangga sudah tidak dapat digunakan lagi sebagai sumber nutrisi.

Kapang *M. majus* UICC 295 dapat berkembang di dalam tubuh larva karena jaringan tubuh larva mengandung nutrisi yang mendukung pertumbuhan *M. majus* UICC 295. Karbohidrat, protein, lipid, dan asam nukleat yang merupakan komponen penyusun sel tubuh larva digunakan *M. majus* UICC 295 untuk melakukan pertumbuhan. Okaraonye dan Ikewuchi (2009: 36) melaporkan bahwa larva *O. rhinoceros* mengandung 42,29 % protein dan 27,73% karbohidrat dari berat basah larva. Larva *O. rhinoceros* juga mengandung kalsium, magnesium, potasium, sodium, dan fosfor.



Gambar 4.2.2. Melanisasi pada hari ke-5 pada tubuh larva *O. rhinoceros*
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.2.3. Pertumbuhan *M. majus* UICC 295 yang berasal dari medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) pada larva *O. rhinoceros*

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

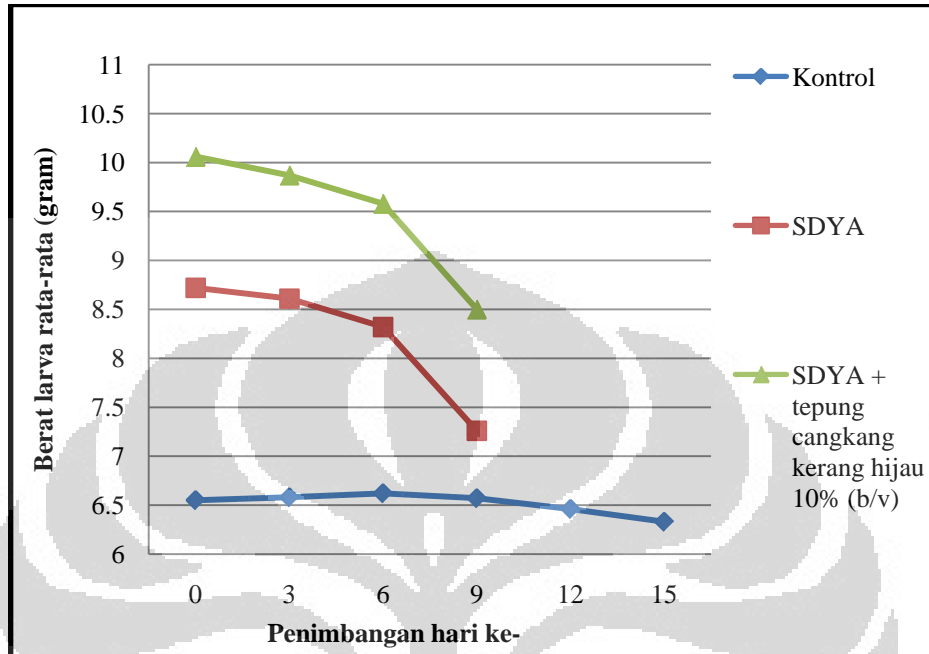
Larva *O. rhinoceros* yang diaplikasikan kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA mengalami kematian 100% lebih cepat satu hari dibandingkan dengan larva yang diaplikasikan kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v). Diduga terdapat pengaruh penambahan tepung cangkang kerang hijau pada medium pertumbuhan kemampuan konidia *M. majus* UICC 295 menginfeksi larva *O. rhinoceros*.

Kematian larva oleh infeksi kapang dipengaruhi oleh kemampuan konidia kapang dalam menginfeksi larva. Medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) dapat meningkatkan produksi konidia, namun

tidak semua konidia tersebut memiliki kemampuan menginfeksi larva. Kemampuan konidia *M. majus* UICC 295 dalam menginfeksi larva dipengaruhi oleh keberadaan enzim-enzim yang berperan dalam tahapan awal kapang menginfeksi larva. Aktivitas enzim-enzim tersebut diduga dipengaruhi oleh keberadaan nutrisi di dalam medium pertumbuhan. Menurut Safavi dkk. (2007: 120), kemampuan virulensi kapang entomopatogen dipengaruhi oleh aktivitas enzim Pr1. Enzim Pr1 yang terdapat pada konidia berperan dalam tahapan awal kapang menginfeksi kutikula larva, sehingga berperan sebagai penentu virulensi kapang. Kapang entomopatogen *B. bassiana* yang ditumbuhkan pada medium pertumbuhan yang mengandung ekstrak khamir 1% memiliki konidia dengan aktivitas enzim Pr1 yang lebih tinggi dibandingkan dengan *B. bassiana* yang ditumbuhkan pada medium pertumbuhan yang mengandung rasio C/N sebesar 75:1. Rasio C/N yang tinggi pada medium pertumbuhan dapat menyebabkan penurunan aktivitas enzim Pr1.

Penghitungan berat larva yang masih hidup setelah aplikasi bertujuan untuk mengetahui pengaruh kapang *M. majus* UICC 295 yang diaplikasikan terhadap berat larva. Hasil penimbangan berat larva menunjukkan bahwa 20 larva kelompok kontrol mengalami kenaikan berat selama pengamatan 15 hari (Lampiran 19). Hasil penimbangan berat larva menunjukkan bahwa setelah hari ke-3 aplikasi, terdapat larva yang mengalami peningkatan berat badan. Peningkatan berat tubuh larva setelah hari ke-3 aplikasi mengindikasikan bahwa kapang *M. majus* UICC 295 belum menginfeksi larva, sehingga metabolisme larva belum terganggu. Larva masih dapat melakukan metabolisme dengan baik diduga karena konidia yang melekat pada kutikula larva belum melakukan germinasi dan penetrasi ke dalam tubuh larva, sehingga larva belum terinfeksi oleh kapang. Penurunan berat tubuh larva yang terinfeksi kapang *M. majus* UICC 295 secara signifikan terjadi pada hari ke-6 setelah aplikasi (Lampiran 20 dan Lampiran 21). Penurunan tersebut terjadi karena kapang *M. majus* UICC 295 sudah bergerminasi dan berpenetrasi ke dalam tubuh larva. Hal tersebut diketahui dengan terlihatnya melanisasi pada tubuh larva setelah hari ke-5 aplikasi. Melanisasi yang terlihat pada tubuh larva membuktikan bahwa kapang *M. majus* UICC 295 berhasil berpenetrasi ke dalam tubuh larva.

Penurunan berat terus terjadi hingga semua larva *O. rhinoceros* mati (Gambar 4.2.4).



Gambar 4.2.4. Grafik berat larva *O. rhinoceros* sebelum dan setelah diaplikasi *M. majus* UICC 295 selama 15 hari [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Kapang *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA berhasil menyebabkan mortalitas pada larva *O. rhinoceros* 3,33%--100% dalam waktu 7--11 hari. Kapang *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) berhasil menyebabkan mortalitas pada larva *O. rhinoceros* 6,67%--100% dalam waktu 7--12 hari. Medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau merupakan medium yang dapat menggantikan medium SDYA sebagai medium pertumbuhan *M. majus* UICC 295. Hal tersebut didukung oleh hasil penelitian yang menunjukkan bahwa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang hijau 10% (b/v) dapat tumbuh dengan baik dan tidak menghilangkan kemampuan *M. majus* UICC 295 dalam menginfeksi dan menyebabkan kematian pada larva *O. rhinoceros*. Cangkang kerang hijau merupakan limbah dapat diperoleh dalam jumlah melimpah dengan biaya murah.

Oleh karena itu, penggunaan medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau dapat menjadi pengganti medium SDYA.

4.3 PENGUJIAN VIABILITAS *Metarhizium majus* UICC 295 SETELAH DIPRESERVASI PADA SUHU -80°C

Kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) tetap memiliki viabilitas setelah dipreservasi selama 30 hari dengan akuades (Lampiran 22 dan Lampiran 25), gliserol 10% (v/v) (Lampiran 23 dan Lampiran 26), dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v) (Lampiran 24 dan Lampiran 27) dalam *deep freezer* pada suhu -80°C (Tabel 4.3.1). Viabilitas kapang *M. majus* UICC 295 dilihat melalui pertumbuhan kapang pada medium pertumbuhan setelah dipreservasi selama 1, 14, dan 30 hari. Kapang *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA (Gambar 4.3.1) maupun pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) (Gambar 4.3.2) memiliki viabilitas hingga 30 hari dipreservasi pada suhu -80°C .

Kapang *M. majus* UICC 295 dari medium SDYA dan dari medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) yang dipreservasi dalam akuades (kontrol) memiliki persentase viabilitas tertinggi. Diduga kapang *M. majus* UICC 295 dapat menghasilkan *compatible solute* yang berperan dalam penyesuaian a_w di dalam sel, sehingga dapat menjaga keseimbangan tekanan osmotik sel. Keberadaan *compatible solute* tersebut diduga dapat melindungi kapang saat terjadi *osmotic shock*, yaitu keluarnya cairan di dalam sel karena perbedaan tekanan osmotik di dalam dan di luar sel yang dapat menyebabkan membran sel mengerut dan rusak. Diduga keberadaan *compatible solute* pada konidia kapang *M. majus* UICC 295 dapat meningkatkan konsentrasi zat terlarut di dalam sel. Perbedaan tekanan yang disebabkan perubahan suhu saat dipreservasi diduga menyebabkan konsentrasi akuades steril (kontrol) yang berada di luar sel meningkat. Hal tersebut menyebabkan konsentrasi di dalam dan di luar sel kapang menjadi seimbang (isotonis), sehingga kapang tidak mengalami

osmotic shock selama dipreservasi dalam akuades pada suhu -80°C selama 30 hari. Menurut Madigan dkk. (1997: 150 & 170), *compatible solute* merupakan zat terlarut di dalam sitoplasma yang berperan dalam penyesuaian a_w di dalam sel. Penyesuaian tersebut terjadi dengan meningkatkan konsentrasi zat terlarut pada intraseluler. Menurut Hallsworth dan Magan (1996: 2440), kapang entomopatogen seperti *M. anisopliae* memiliki konidia yang dapat menghasilkan *compatible solute* berupa gliserol, mannitol, dan trehalosa. Koloni kapang *M. anisopliae* berumur 15 hari dapat menghasilkan senyawa gliserol. Konidia kapang *M. anisopliae* dapat menghasilkan trehalosa saat diinkubasi pada medium SDA dengan suhu 35°C . Konidia kapang *M. anisopliae* dapat menghasilkan mannitol sebanyak 130 mg/konidia saat diinkubasi pada medium SDA dengan suhu pH 4,4-9,4.

Kapang *M. majus* UICC 295 yang dipreservasi dalam gliserol 10% (v/v) dan dalam gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v) tetap memiliki viabilitas. Gliserol 10% umum digunakan sebagai krioprotektan fungi dalam preservasi dengan metode *freezing*, sehingga diduga gliserol tidak menyebabkan toksik pada kapang *M. majus* UICC 295. Hubalek (2003: 210 & 216) melaporkan bahwa gliserol dengan konsentrasi 2--55% (umumnya 10%) berhasil digunakan pada preservasi kapang, khamir, bakteri, protozoa, dan alga. Nakasone dkk. (2004: 41) melaporkan bahwa gliserol merupakan protektan yang efektif dalam preservasi fungi. Penyimpanan fungi dari filum *Ascomycota* dan *Basidiomycota* dalam larutan gliserol 10% dengan metode *freezing* pada suhu -80°C berhasil mempreservasi fungi tersebut selama 5 tahun.

Persentase viabilitas kapang *M. majus* UICC 295 yang dipreservasi dalam gliserol 10% (v/v) dan dalam gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v) lebih rendah dibandingkan dengan kapang *M. majus* UICC 295 yang dipreservasi dalam akuades (kontrol). Diduga penggunaan waktu dan suhu ekuilibrisasi gliserol yang kurang tepat pada preservasi *M. majus* UICC 295. Gliserol adalah krioprotektan yang berpenetrasi ke dalam sel secara lambat. Oleh karena itu, waktu ekuilibrisasi yang dibutuhkan gliserol untuk masuk ke dalam sel cukup lama, yaitu 1--4 jam. Waktu ekuilibrisasi yang digunakan selama penelitian adalah satu jam pada suhu 4°C . Penggunaan gliserol sebagai krioprotektan

menyebabkan kondisi sel kapang menjadi hipertonis. Waktu ekuilibrase yang kurang lama tersebut diduga menyebabkan gliserol belum masuk mencapai ke bagian intraseluler, sehingga belum tercapai keadaan yang isotonis ketika sel kapang dipreservasi. Sel kapang yang dipreservasi pada suhu -80°C diduga mengalami *osmotic shock* karena keberadaan gliserol. Kurangnya waktu ekuilibrase tersebut diduga menyebabkan gliserol tidak dapat bekerja secara efektif sebagai krioprotektan kapang *M. majus* UICC 295. Diduga tekanan osmotik ekstraseluler menjadi lebih tinggi dibandingkan intraseluler, karena keberadaan gliserol, sehingga cairan intraseluler keluar dan menyebabkan sel mengerut dan rusak. Kapang *M. majus* UICC 295 yang dipreservasi pada gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v) menunjukkan persentase viabilitas terendah. Diduga penggunaan gliserol dengan penambahan glukosa menyebabkan perbedaan tekanan osmotik ekstraseluler dan intraseluler yang lebih tinggi dibandingkan dengan penggunaan gliserol tanpa glukosa. Hal tersebut menyebabkan lebih banyak cairan intraseluler yang keluar kemudian membran sel menjadi mengerut dan rusak. Hubalek (2003: 210 & 216) melaporkan bahwa *penetrating cryoprotectant* membutuhkan waktu dan suhu ekuilibrase untuk mencapai intraseluler sebelum *freezing*. *Penetrating cryoprotectant* seperti gliserol membutuhkan waktu ekuilibrase yang cukup lama dalam suhu yang tinggi untuk masuk ke dalam sel. Waktu ekuilibrase yang optimum untuk gliserol adalah 1--4 jam dengan suhu ekuilibrase yang tinggi.

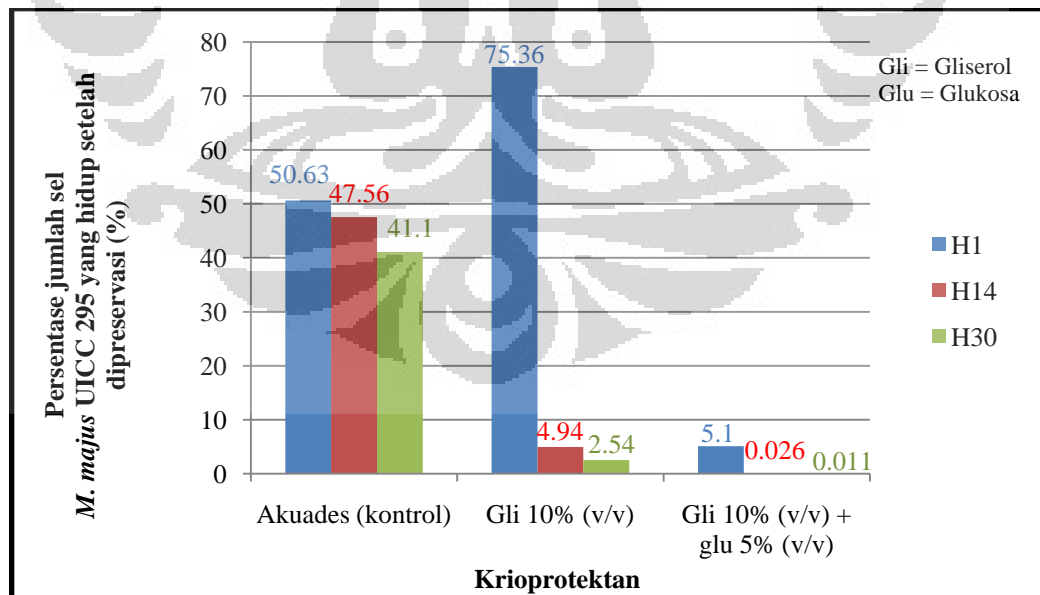
Penggunaan krioprotektan gliserol maupun gliserol dengan penambahan glukosa tidak menghilangkan viabilitas kapang setelah dipreservasi selama 30 hari. Gliserol merupakan salah satu krioprotektan yang melindungi bagian ekstraseluler dan intraseluler. Gliserol berperan sebagai krioprotektan fungsi dengan mengikat air yang berada di bagian dalam maupun luar sel, sehingga kristal es yang terbentuk tidak tajam, namun berupa butiran halus yang tidak akan merusak membran sel. Glukosa merupakan krioprotektan yang melindungi bagian ekstraseluler yang dapat meningkatkan viskositas larutan, sehingga kristal es yang terbentuk sedikit. Menurut Uzunova-Doneva dan Donev (2005: 22), gliserol berperan dalam proses kristalisasi cairan dalam sel selama preservasi dengan metode *freezing*. Gliserol menghambat pembentukan kristal es yang besar

dan kasar dengan membentuk kristal es dengan ukuran kecil, sehingga tidak merusak sel. Hubalek (2003: 211 & 220) melaporkan bahwa glukosa berfungsi sebagai protektan ekstraseluler yang dapat menghambat pembentukan kristal es dengan meningkatkan viskositas larutan.

Tabel 4.3.1. Hasil perhitungan jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 setelah preservasi

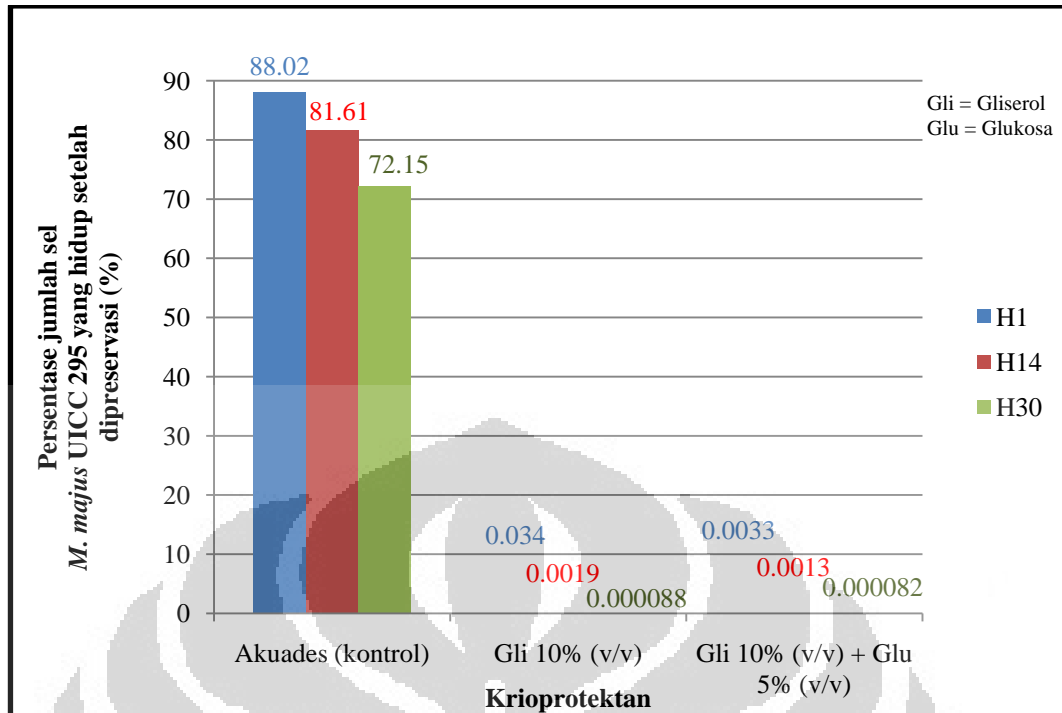
<i>M. majus</i> UICC 295	Krioprotektan	Σ konidia/hifa hidup (%)					
		(H ₁)		(H ₁₄)		(H ₃₀)	
		B1	B2	B1	B2	B1	B2
SDYA	Akuades (kontrol)	56,06	45,21	51,36	43,76	47,42	34,78
	Gliserol 10%	70,15	80,57	4,04	5,85	1,87	3,21
	Gliserol 10% + Glukosa 5%	8,33	1,88	0,026	0,027	0,0068	0,016
SDYA + Tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v)	Akuades (kontrol)	82,59	93,46	80,88	82,35	73,72	70,58
	Gliserol 10%	0,022	0,046	0,0015	0,0023	0,000091	0,000086
	Gliserol 10% + Glukosa 5%	0,0022	0,0044	0,0013	0,0013	0,000079	0,000086

Keterangan :
B1 = Batch 1
B2 = Batch 2



Gambar 4.3.1. Diagram batang persentase viabilitas *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA setelah dipreservasi selama 30 hari

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.3.2. Diagram batang persentase viabilitas *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) setelah dipreservasi selama 30 hari

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

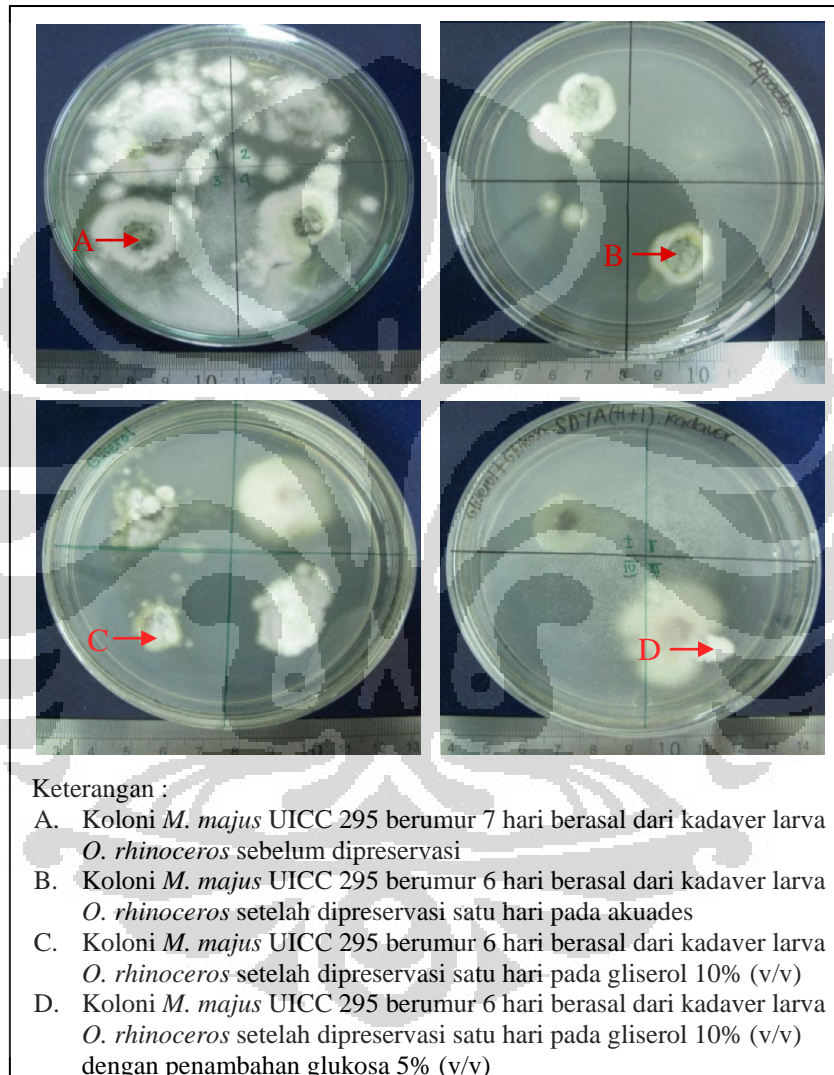
Pengujian viabilitas pada kapang *M. majus* UICC 295 yang dipresevasi bersama kadaver larva *O. rhinoceros* dilakukan secara kualitatif, yaitu dengan melihat pertumbuhan *M. majus* UICC 295 ketika ditumbuhkan pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v). Pertumbuhan koloni *M. majus* UICC 295 setelah dipreservasi mengindikasikan bahwa sel kapang yang telah dipreservasi selama satu hari tetap memiliki kemampuan untuk hidup (viabel). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kapang *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva *O. rhinoceros* yang dipreservasi dalam akuades (kontrol), gliserol 10% (v/v), dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v) tetap memiliki viabilitas setelah dipreservasi selama satu hari pada suhu -80°C . Nakasone dkk. (2004: 39--42) melaporkan bahwa fungi entomopatogen dapat dipreservasi beserta jaringan tubuh serangga inang. Konidia *Neozygites fresenii* pada kadaver kutu daun yang dipreservasi dengan metode *freezing* bersama kadaver serangga inang memiliki viabilitas yang tinggi.

Pertumbuhan *M. majus* UICC 295 dari kadaver larva *O. rhinoceros* pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) setelah dipreservasi satu hari dalam akuades (kontrol), gliserol 10% (v/v), dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v) akuades menunjukkan pertumbuhan hifa yang lebih cepat dan mengalami sporulasi lebih cepat dibandingkan dengan pertumbuhan *M. majus* UICC 295 dari suspensi konidia pada medium SDYA (Gambar 4.3.3) dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) (Gambar 4.3.4) setelah dipreservasi satu hari pada suhu -80° C.

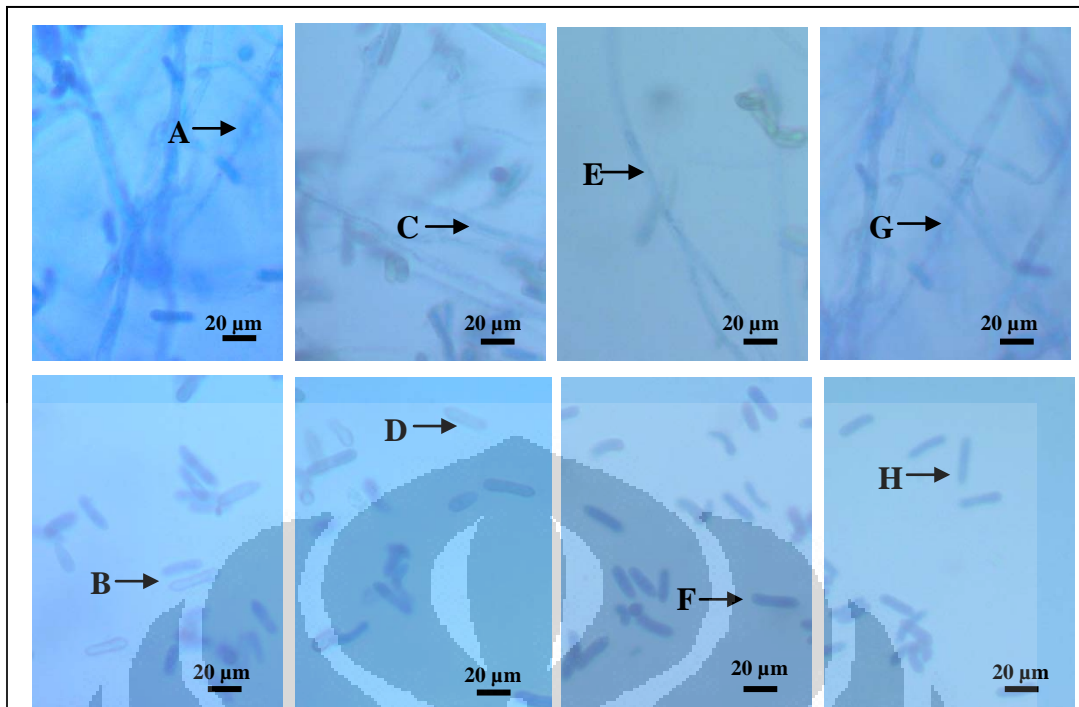
Hasil pengamatan pertumbuhan koloni *M. majus* UICC 295 dari kadaver larva *O. rhinoceros* setelah dipreservasi selama satu hari mengindikasikan adanya pengaruh kadaver larva terhadap pertumbuhan *M. majus* UICC 295. Kapang *M. majus* UICC 295 yang berasal dari kadaver larva memiliki pertumbuhan yang lebih cepat dibandingkan dengan pertumbuhan *M. majus* UICC 295 yang berasal dari suspensi. Kapang *M. majus* UICC 295 yang dipreservasi dalam bentuk suspensi kapang merupakan kapang yang telah ditumbuhkan berulang kali pada medium pertumbuhan. Medium SDYA sebagai medium pertumbuhan artifisial bagi kapang *M. majus* UICC 295 tidak memiliki kandungan yang sama dengan substrat alami kapang *M. majus* UICC 295 khususnya kitin. Substrat alami kapang *M. majus* UICC 295 adalah larva *O. rhinoceros* dengan kutikula yang mengandung kitin, protein, dan lipid. Herlinda dkk. (2006: 76) melaporkan bahwa kapang entomopatogen yang ditumbuhkan terus-menerus pada medium buatan dengan kandungan nutrisi yang berbeda dengan serangga inangnya dapat menurunkan viabilitas kapang tersebut.

Hasil pengamatan pertumbuhan *M. majus* UICC 295 yang berasal dari kadaver sebelum dan setelah dipreservasi memperlihatkan adanya kontaminasi mikroorganisme lain, seperti kapang dan khamir. Kontaminan yang tumbuh diduga berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* yang mengandung mikroorganisme lain. Oleh karena itu, dilakukan pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 secara mikroskopik untuk membuktikan bahwa kapang yang tumbuh pada kadaver adalah *M. majus* UICC 295. Hasil pengamatan morfologi kapang yang terdapat pada kadaver larva secara mikroskopik menunjukkan bahwa kapang

yang tumbuh pada kadaver larva *O. rhinoceros* adalah kapang *M. majus* UICC 295 yang dibuktikan dari konidia berbentuk silindris dan hifa bercabang dan bersepta (Gambar 4.3.6 dan Gambar 4.3.8). Menurut Tzean dkk. (1997: 150), *M. anisopliae* var. *majus* memiliki hifa bersepta dan bercabang dan memiliki konidia berbentuk silindris.



Gambar 4.3.3. Koloni *M. majus* UICC 295 berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* pada medium SDYA pada suhu 28° C dengan kondisi gelap [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

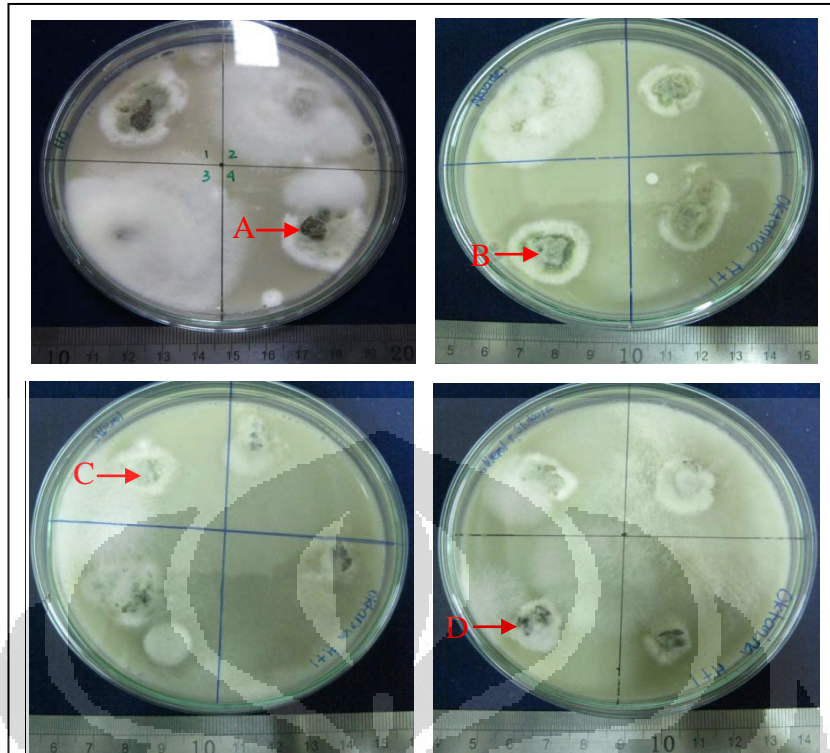


Keterangan :

- A. Hifa *M. majus* UICC 295 berumur 21 hari berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* sebelum dipreservasi
- B. Hifa *M. majus* UICC 295 berumur 22 hari berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* setelah dipreservasi satu hari pada akuades
- C. Hifa *M. majus* UICC 295 berumur 22 hari berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* setelah dipreservasi satu hari pada gliserol 10% (v/v)
- D. Hifa *M. majus* UICC 295 berumur 22 hari berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* setelah dipreservasi satu hari pada gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v)
- E. Konidia *M. majus* UICC 295 berumur 21 hari berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* sebelum dipreservasi
- F. Konidia *M. majus* UICC 295 berumur 22 hari berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* setelah dipreservasi satu hari pada akuades
- G. Konidia *M. majus* UICC 295 berumur 22 hari berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* setelah dipreservasi satu hari pada gliserol 10% (v/v)
- H. Konidia *M. majus* UICC 295 berumur 22 hari berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* setelah dipreservasi satu hari pada gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v)

Gambar 4.3.5. Hasil pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* secara mikroskopik pada medium SDYA dengan suhu inkubasi 28° C dan kondisi gelap

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

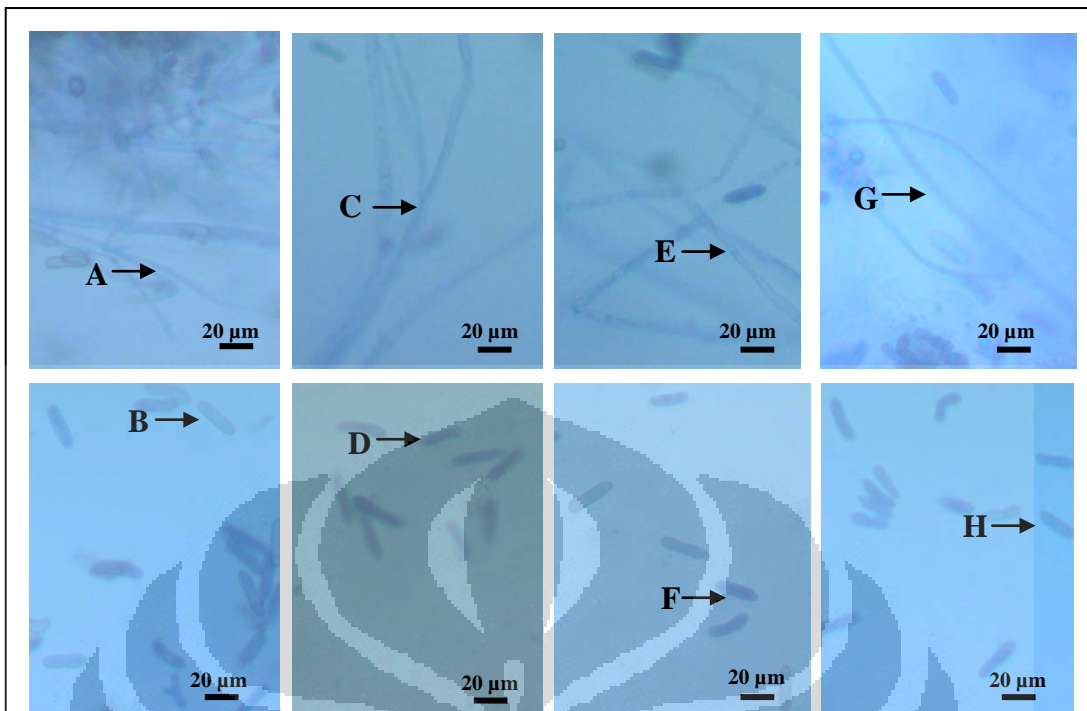


Keterangan :

- A. Koloni *M. majus* UICC 295 berumur 7 hari berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* sebelum dipreservasi
- B. Koloni *M. majus* UICC 295 berumur 6 hari berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* setelah dipreservasi satu hari pada akuades
- C. Koloni *M. majus* UICC 295 berumur 6 hari berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* setelah dipreservasi satu hari pada gliserol 10% (v/v)
- D. Koloni *M. majus* UICC 295 berumur 6 hari berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* setelah dipreservasi satu hari pada gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v)

Gambar 4.3.5. Koloni *M. majus* UICC 295 berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) pada suhu 28° C dengan kondisi gelap

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Keterangan :

- A. Hifa *M. majus* UICC 295 berumur 21 hari berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* sebelum dipreservasi
- B. Hifa *M. majus* UICC 295 berumur 22 hari berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* setelah dipreservasi satu hari pada akuades
- C. Hifa *M. majus* UICC 295 berumur 22 hari berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* setelah dipreservasi satu hari pada gliserol 10% (v/v)
- D. Hifa *M. majus* UICC 295 berumur 22 hari berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* setelah dipreservasi satu hari pada gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v)
- E. Konidia *M. majus* UICC 295 berumur 21 hari berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* sebelum dipreservasi
- F. Konidia *M. majus* UICC 295 berumur 22 hari berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* setelah dipreservasi satu hari pada akuades
- G. Konidia *M. majus* UICC 295 berumur 22 hari berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* setelah dipreservasi satu hari pada gliserol 10% (v/v)
- H. Konidia *M. majus* UICC 295 berumur 22 hari berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* setelah dipreservasi satu hari pada gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v)

Gambar 4.3.6. Hasil pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 berasal dari kadaver larva *O. rhinoceros* secara mikroskopik pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) dengan suhu inkubasi 28° C dan kondisi gelap

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Pada penelitian ini telah berhasil dilakukan pertumbuhan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau. Penambahan tepung cangkang kerang hijau memengaruhi karakter morfologi kapang *M. majus* UICC 295 yang terlihat secara makroskopik maupun mikroskopik. Kapang *M. majus* UICC 295 dari medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) terbukti dapat membunuh larva *O. rhinoceros* 100%. Kapang *M. majus* UICC 295 dalam bentuk suspensi telah berhasil dipreservasi dalam akuades (kontrol), gliserol 10% (v/v), dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v) dan tetap memiliki viabilitas setelah dipreservasi selama 30 hari pada suhu -80° C. Selain itu, kapang *M. majus* UICC 295 bersama kadaver larva *O. rhinoceros* tetap memiliki viabilitas setelah dipreservasi pada suhu -80° C selama satu hari. Diharapkan limbah cangkang kerang hijau dapat dimanfaatkan oleh masyarakat untuk meningkatkan produksi konidia kapang *M. majus* UICC 295 sebagai bioinsektisida pembasmi hama larva *O. rhinoceros*.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

1. Kapang *M. majus* UICC 295 dari medium SDYA dengan penambahan cangkang kerang hijau 10% (b/v) dapat menginfeksi dan membunuh larva *O. rhinoceros* 6,67%--100% dalam waktu 7--12 hari. Kapang *M. majus* UICC 295 dari medium SDYA dapat menginfeksi dan membunuh larva *O. rhinoceros* 3,33%--100% dalam waktu 7--11 hari.
2. Kapang *M. majus* UICC 295 yang dipreservasi dalam akuades (kontrol), dalam larutan gliserol 10% (v/v) dan dalam larutan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v) tetap memiliki viabilitas setelah dipreservasi selama 30 hari pada suhu -80° C. Persentase viabilitas *M. majus* UICC 295 paling tinggi setelah dipreservasi selama 30 hari terlihat pada *M. majus* UICC 295 yang dipreservasi dengan akuades sebagai kontrol.
3. Kapang *M. majus* UICC 295 yang dipreservasi bersama kadaver larva *O. rhinoceros* dalam akuades (kontrol), dalam larutan gliserol 10% (v/v) dan dalam larutan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v) tetap memiliki viabilitas setelah dipreservasi selama 1 hari pada suhu -80° C.

5.2 SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai waktu dan suhu ekuilibrisasi protektan yang tepat dalam preservasi kapang *M. majus* UICC 295 untuk mempertahankan viabilitas kapang *M. majus* UICC 295.
2. Perlu dilakukan pengujian kemampuan *M. majus* UICC 295 setelah dipreservasi untuk mengetahui pengaruh preservasi terhadap kemampuan *M. majus* UICC 295 menginfeksi larva *O. rhinoceros*.

DAFTAR REFERENSI

- Ahmed, S., M.R. Ashraf, A. Hussain, & M.A. Riaz. 2009. Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* from Gujranwala (Pakistan) against *Coptotermes heimi* (Wasmann) (Isoptera: Rhinotermitidae). *International Journal of Agriculture & Biology* **11**(6): 707--711.
- Alam, M.S., M-F Begum, M.A. Sarkar, M.R. Islam, & M.S. Alam. 2001. Effect of temperature, light, and media on growth, sporulation, formation of pigments and pycnidia of *Botryodiplodia theobromae* Pat. *Pakistan Journal of Biological science* **4**(10): 1224--1227.
- Andrade, V.S., B.B. Neto, K. Fukushima & G.M. Campos-Takaki. 2003. Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570). *Revista Iberoamericana de Micologia* **20**: 149--153.
- Atlas, R.M. 2010. *Handbook of microbiological media*. 4th ed. CRC Press, Boca Raton: iii + 2036 hlm.
- Barnes, R.D. 1974. *Invertebrate*. 3rd ed. Saunder Company. Philadelphia: 870 hlm.
- Benson. 2001. *Microbiological application: Laboratory manual in general microbiology*. 8th ed. The McGraw-Hill Companies, New York: xi + 478 hlm.
- Bidochka, M.J. & C.L. Small. 2005. Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. Dalam: Vega, F.E. & M. Blackwell. 2005. *Insect-fungal associations: ecology and evolution*. Oxford University Press, New York: xvii + 333 hlm.
- Bischoff, J.F., S.A. Rehner, & R.A. Humber. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* **101**: 512--530.
- Capinera, J.L. 2008. *Encyclopedia of entomology*. 2nd. Springer, Florida: xiv + 4345 hlm.
- Cappuccino, J.G. & N. Sherman. 2001. *Microbiology: a laboratory manual*. Benjamin Cummings, San Francisco: xvi + 491 hlm.

- Carlile, M.J., S.C. Watkinson, & G.W. Gooday. 2001. *The fungi*. Academic Press, London: xix + 588 hlm.
- Chelico, L., J.L. Haughian, & G.G. Khachatourians. 2006. Nucleotide excision repair and photoreactivation in the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Beauveria nivea*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces farinosus* and *Verticillium lecanii*. *Journal of Applied Microbiology* **100**: 964--972.
- Dawes, I.W. & I.W. Sutherland. 1992. *Microbial physiology*. 2nd ed. Blackwell Scientific Publication : xiv + 289 hlm.
- Deacon, J.W. 2006. *Fungal biology*. 4th ed. Blackwell Publishing, Malden: vii + 371 hlm.
- 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 dan Teknologi Kayu Tropis* **5**(2): 68--77.
- Dhar, P. & G. Kaur. 2009. Effects of carbon and nitrogen sources on the induction and repression of chitinase enzyme from *Metarhizium anisopliae* isolates. *Annals of Microbiology* **59**(3): 545--551.
- Dhar, P. & G. Kaur. 2009. Effects of carbon and nitrogen sources on the induction and repression of chitinase enzyme from *Beauveria bassiana* isolates. *African Journal of Biotechnology* **9**(47): 8092--8099.
- Digital. 2008. Colour chart for Faber Castell polychromos pencils and pastels. <http://www.drawinganddrafting.com/au/category2471.htm>, 25 Mei 2012, pk. 22.30.
- 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, & A. Oetari. 2006. *Mikologi: dasar dan terapan*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta: xi + 238 hlm.

- Glazer, A.N. & H. Nikaido. 2007. *Microbial biotechnology : fundamental of applied microbiology*. 2nd ed. Cambridge University Press, New York: xvii + 554 hlm.
- Gopal, M., A. Gupta, & G.V. Thomas. 2006. Prospects of using *Metarhizium anisopliae* to check the breeding of insect pest, *Oryctes rhinoceros* L. in coconut leaf vermicomposting sites. *Bioresource Technology* **97**: 1801--1806.
- Hallsworth, J.E. & N. Magan. 1996. Culture age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Applied and Environmental Microbiology* **62**(7): 2435--2442.
- Hasyim, A., H. Yasir, & Azwana. 2005. Seleksi substrat untuk perbanyakan *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin dan infektivitasnya terhadap hama penggerek bonggol pisang, *Cosmopolites sordides* Germar. *Jurnal Hortikultura* **15**(2): 116--123.
- Herlinda, S., M.D. Utama, Y. Pujianti, & Suwandi. 2006. Kerapatan dan viabilitas spora *Beauveria bassiana* (Bals.) akibat subkultur dan pengayaan media, serta virulensinya terhadap larva *Plutella xylostella* (Linn.). *Jurnal Hama Penyakit Tanaman Tropika* **6**(2): 70--78.
- Hogg, S. 2005. *Essential microbiology*. John Wiley dan Sons, Ltd., England: xi + 468 hlm.
- Hubalek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* **46**: 205--229.
- Ihsan, F. & L. 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.
- Kusumaningsih, K., V. Suryanti, & W. Permana. 2004. Karakterisasi kitosan hasil destilasi kitin dari cangkang kerang hijau (*Mytilus viridis linneaus*). *Alchemy* **3**(1): 63--73.
- Leger, R.J. St., M.J. Bidochka, & D.W. Roberts. 1994. Germination triggers of *Metarhizium anisopliae* conidia are related to host species. *Microbiology* **140**: 1651--1660.

- 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, & J. Parker. 1997. *Brock biology of microorganisms*. 8th ed. Benjamin Cumming, San Fransisco: xiv + 986 hlm.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, D.A. Stahl, & D.P. Clark. 2012. *Brock biology of microorganisms*. 13th ed. Benjamin Cumming, San Fransisco: xxviii + 1043 hlm.
- Male, K.B., Y-M. Tzeng, J. Montes, B-L. Liu, W-C. Liao, A. Kamen, & J.H.T. Luong. 2009. Probing inhibitory effects of destruxins from *Metarhizium anisopliae* using insect cell based impedance spectroscopy: Inhibition vs chemical structure. *Analyst* **134**: 1447--1452.
- Matsumoto, K.S. 2006. Fungal chitinase. *Enzyme* **661**(186): 289--304.
- Mawikere, J., J.C. Alouw, & M.L.A. Hosang. 2007. Serangan hama *Oryctes rhinoceros* pada pertanaman kelapa di Jawa Timur. *Eugenia* **13**(1): 20--27.
- Munaan, A., Suharyon, & R. Noveriza. 1996. Penelitian pengendalian hayati *Oryctes rhinoceros* di Jawa Timur. *Jurnal Litri* **1**(6): 301--309.
- Murjito, N. 2010. Penggunaan metode *freezing* (-4°C) dan metode *liquid-drying* untuk preservasi strain-strain khamir *Basidiomycota* koleksi *University of Indonesia Culture Collection* (UICC). Skripsi Sarjana Departemen Biologi FMIPA-UI, Depok: xv + 60 hlm.
- Mustafa, U. & G. Kaur. 2009. Effects of carbon and nitrogen sources and ratio on the germination, growth, and sporulation characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates. *African Journal of Agricultural Research* **3**(10): 922--930.
- Nakasone, K.K., S.W. Peterson, & S-C. Jong. 2004. Preservation and distribution of fungal cultures. Dalam: Mueller, G.M., G.F. Bills, & M.S. Foster. *Biodiversity of fungi*. Elsevier Academic Press, USA: xviii + 777 hlm.
- Nayar, K.K., T.N. Ananthkrishnan & B.V. David. 1976. *General and applied entomology*. Tata McGraw-Hill, New Delhi: xii + 589 hlm.

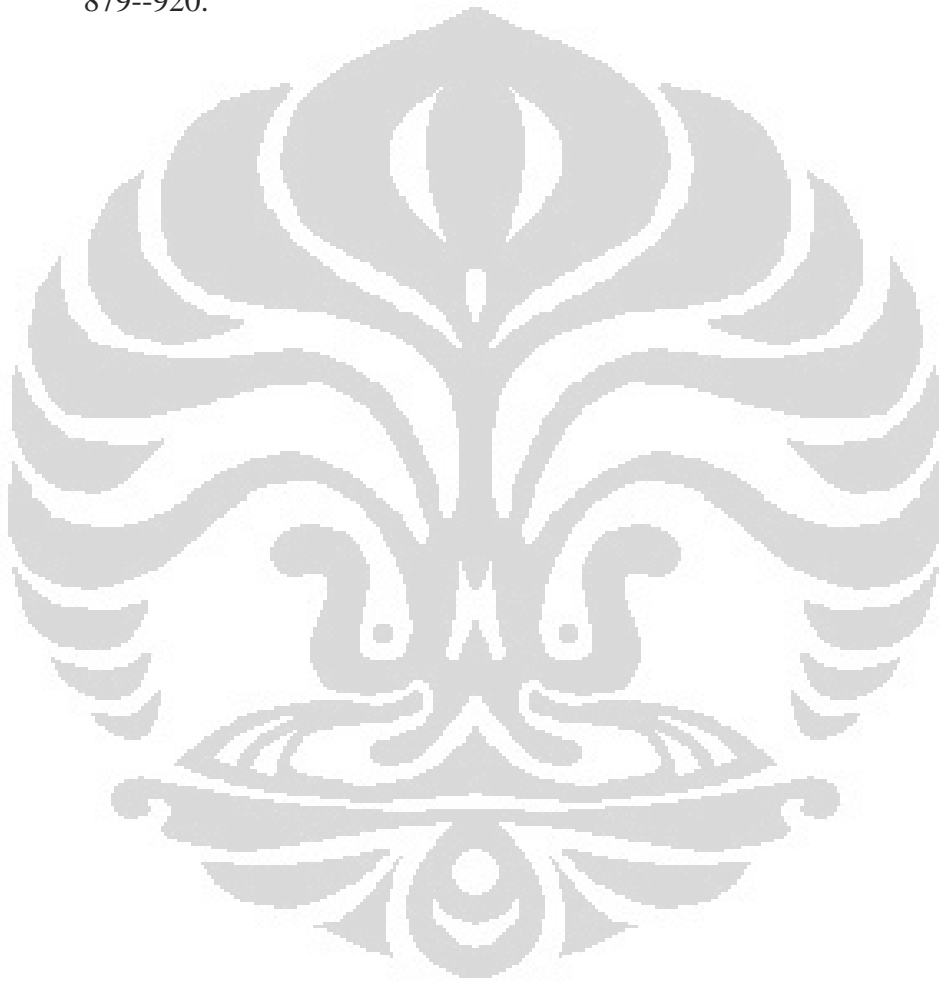
- Nishi, O., K. Iiyama, C. Yasunaga-Aoki, & S. Shimizu. 2010. Incongruence between EF-1 α phylogeny and morphology of *Metarhizium majus* and *Metarhizium guizhouense* in Japan. *Entomotechnology* **34**: 19--23.
- Niswari, A.P. 2004. Studi morfometrik kerang hijau (*Perna viridis* L.) di perairan Cilincing, Jakarta Utara. Skripsi Sarjana Departemen Ilmu dan Teknologi Kelautan FPIK-IPB, Bogor: vii + 86 hlm.
- Okaraonye, C.C. & J.C. Ikewuchi. 2009. Nutritional potential of *Oryctes rhinoceros* larva. *Pakistan Journal of Nutrition* **8**(1): 35--38.
- Permana, H. 2006. Optimalisasi pemanfaatan cangkang kerang hijau (*Perna viridis* L) dalam pembuatan kerupuk. Skripsi Sarjana Program Studi Teknologi Hasil Perikanan FPIK -IPB, Bogor: xiii + 102 hlm.
- Pracaya. 2008. *Pengendalian hama & penyakit tanaman secara organik*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta: 308 hlm.
- Pracaya. 2009. *Hama & penyakit tanaman (edisi revisi)*. Penebar Swadaya, Depok: iv + 428 hlm.
- Prayogo, Y., W. Tengkano, & Marwoto. 2005. Prospek cendawan entomopatogen *Metarhizium anisopliae* untuk mengendalikan ulat grayak *Spodoptera litura* pada kedelai. *Jurnal Litbang Pertanian* **24**(1): 19--26.
- Prayogo, Y. 2006. Upaya mempertahankan keefektifan cendawan entomopatogen untuk mengendalikan hama tanaman pangan. *Jurnal Litbang Pertanian* **25**(2): 47--54.
- Purnamasari, G. 2011. Pembuatan formula *Metarhizium majus* UICC 295 menggunakan media pembawa substrat jagung (*Zea mays*) dan pengujian formula terhadap larva *Oryctes rhinoceros*. Skripsi Sarjana Departemen Biologi FMIPA-UI, Depok: xv + 79 hlm.
- Putra, R.P. 2009. Isolasi dan pengujian kemampuan *Metarhizium majus* (Johnst.) Bisch., Rehner dan Humber sebagai kapang entomopatogen dengan metode kontak langsung pada larva *Oryctes rhinoceros* Linn. Skripsi Sarjana Departemen Biologi FMIPA-UI, Depok: xii + 125 hlm.
- Rosadi, D.A. 2011. Pembuatan dan pengujian formula *Metarhizium majus* UICC 295 dengan media pembawa substrat kentang (*Solanum tuberosum*) dalam

- membunuh larva *Oryctes rhinoceros*. Skripsi Sarjana Departemen Biologi FMIPA-UI, Depok: xiii + 61 hlm.
- Safavi, S.A., F.A. Shah, A.K. Pakdel, G.R. Rasoulilian, A.R. Bandani & T.M. Butt. 2007. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology* **270**: 116--123.
- Sambiran, W.J. & M.L.A. Hosang. 2007. Patogenisitas *Metarhizium anisopliae* dari beberapa media air kelapa terhadap *Oryctes rhinoceros* L. *Buletin Palma* **32**: 1--11.
- Samson, R.A., H.C. Evans, & J-P. Latgé. 1988. *Atlas of entomopathogenic fungi*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: xi + 187 hlm.
- Sindhu, R., G.N. Suprabha & S. Shashidhar. 2009. Optimization of process parameters for the production of α -amylase from *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) under solid state fermentation. *African Journal of Microbiology Research* **3**(9): 498--503.
- Smith, D. & A.H.S. Onions. 1994. *The preservation and maintenance of living fungi*. 2nd ed. Cab International, UK: vii+122 hlm.
- Soltani, R. 2010. The rhinoceros beetle in Tunisia: current challenge and future management perspectives. *Tunisian Journal of Plant Protection* **5**(2): 179--194.
- Tzean, S. S., L.S. Hsieh & W.J. Wu. 1997. *Atlas of entomopathogenic fungi from Taiwan*. Council of Agriculture, Taipei: vii + 214 hlm.
- Uzunova-Doneva & Donev. 2005. Anabiosis and conservation of microorganisms. *Journal of Culture Collections* **4**: 17--28.
- Vilmos, P. & E. Kurucz. 1998. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters* **62**: 59--66.
- Walker, G.M., & N.A. White. 2005. Introduction to fungal physiology. Dalam: Kavanagh, K. 2005. *Fungi: biology and applications*. John Wiley & Sons, Ltd., England: xii + 267 hlm.
- Wang, C., Z. Duan, & R.J. St. Leger. 2008. MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryotic Cell* **7**(2): 302--309.

Webster, J. & R.W.S. Weber. 2007. *Introduction to fungi*. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge: xix + 841 hlm.

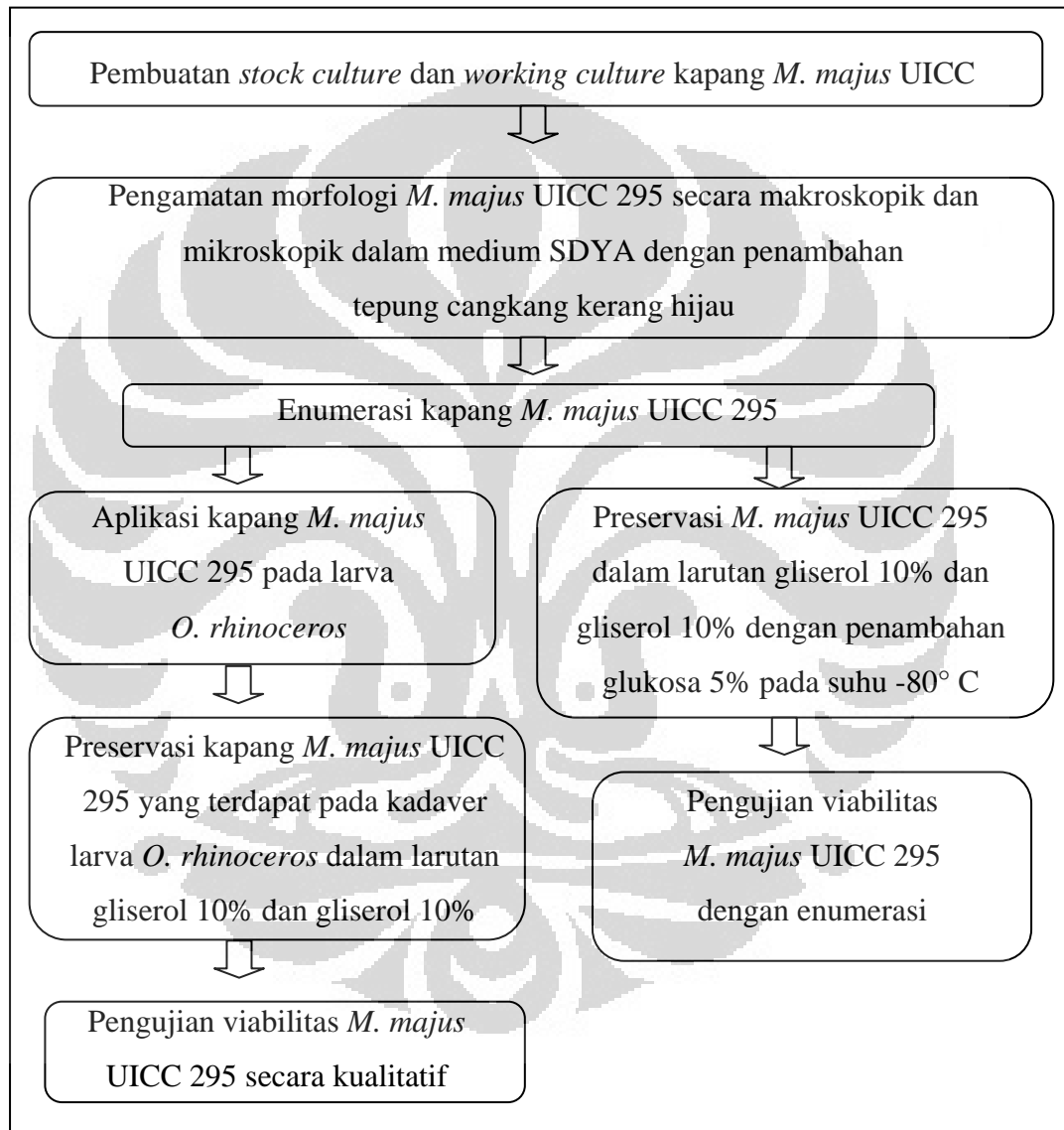
Widiyanti, N.L.P.M. & S. Muyadihardja. 2004. Uji toksisitas jamur *Metarhizium anisopliae* terhadap larva nyamuk *Aedes Aegypti*. *Media Litbang Kesehatan* **14**(3): 25--30.

Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology* **17**(9): 879--920.



LAMPIRAN

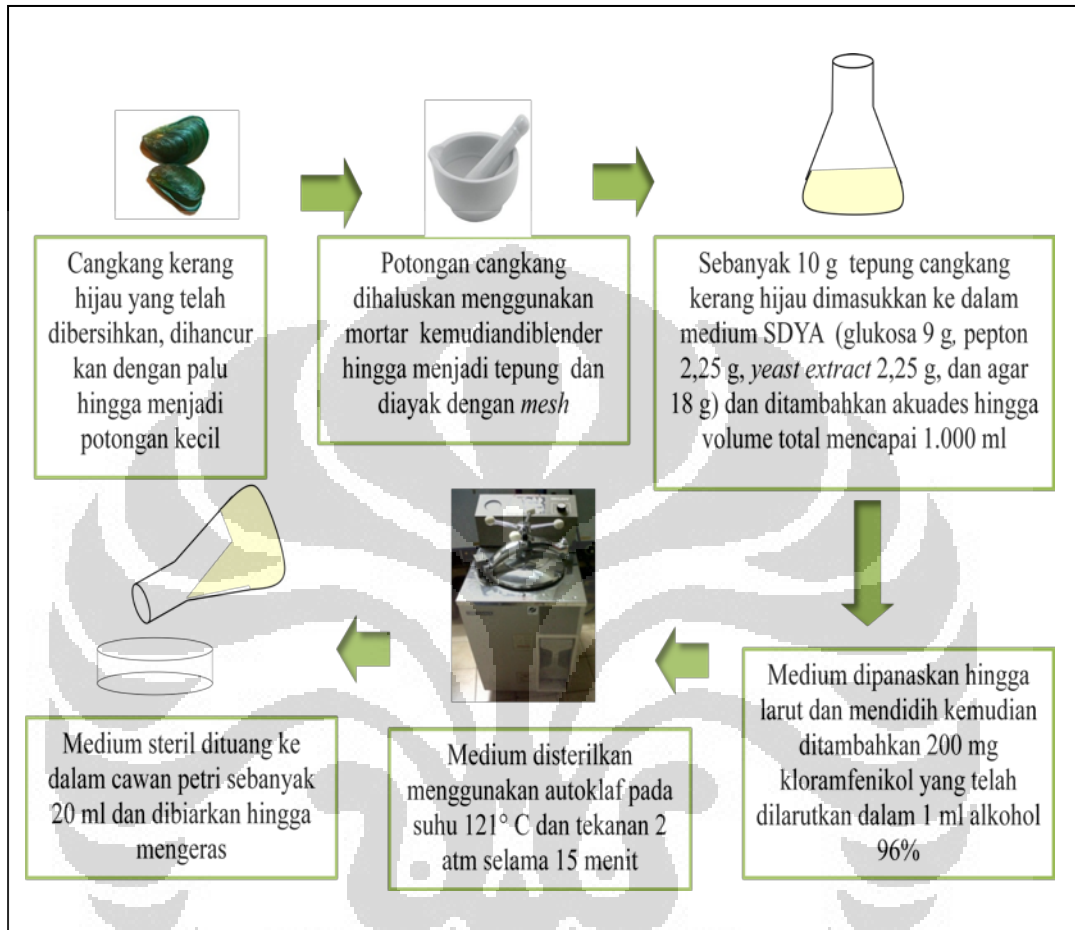
Lampiran 1 Skema kerja penelitian



Lampiran 2
 Standar warna Faber Castell
 [Sumber: Digital 2008:1].

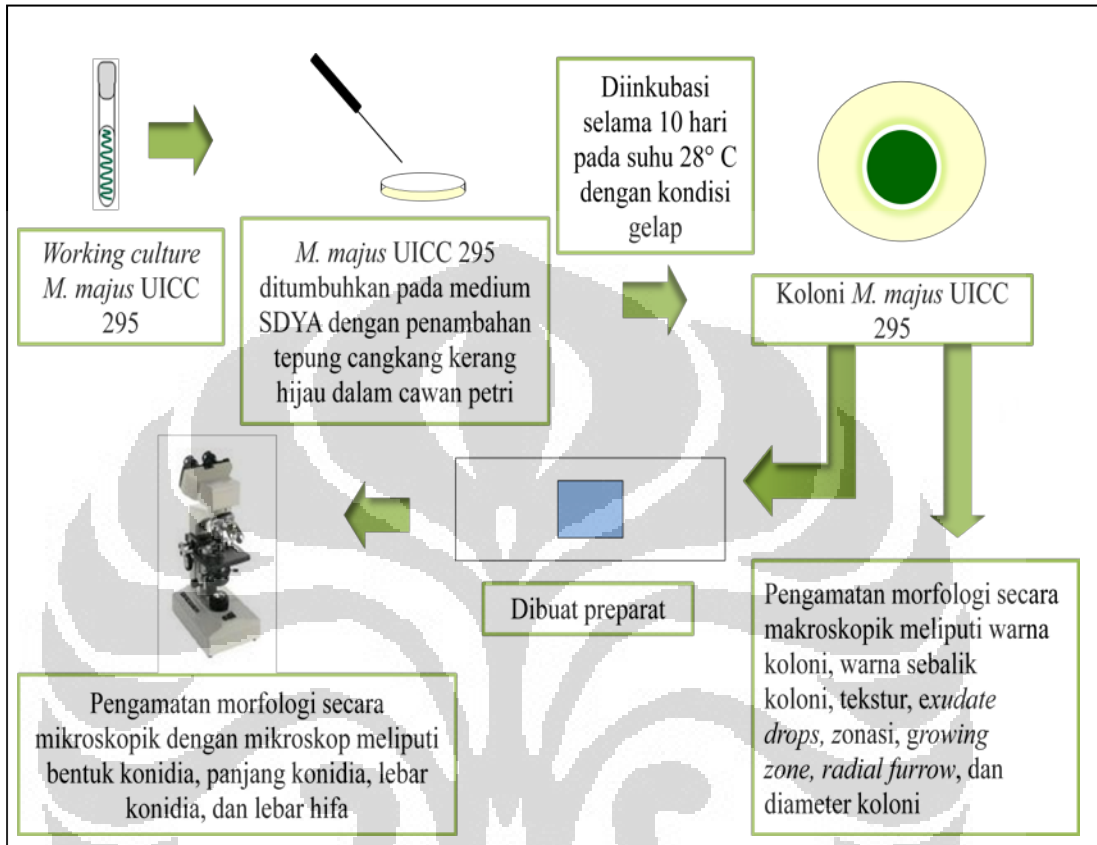
101	white	166	grass green
103	ivory	171	light green
102	cream	170	apple green
104	zinc yellow	168	moss green
105	lemon cadmium	167	sap green
106	light chrome	158	sea green
107	lemon	159	Hooker's green
108	canary yellow	165	juniper green
109	orange yellow	172	grey green
111	tangerine	174	cedar green
113	light orange	173	olive green
115	dark orange	175	dark sepia
117	vermillion	177	sepia light
118	scarlet lake	176	van Dyck brown
121	pale geranium lake	178	nougat
126	dark carmine	180	raw umber
127	light carmine	179	bistre
123	fuchsia	182	brown ochre
133	wine red	183	gold ochre
125	dark magenta	185	light ochre
142	madder	184	ochre
128	rose madder lake	186	terracotta
129	pink madder lake	191	Pompeian red
119	light magenta	188	sanguine
134	magenta	187	burnt ochre
135	red violet	189	cinnamon
136	dark violet	190	Venetian red
138	violet	192	Indian red
139	light violet	193	burnt carmine
140	light ultramarine	169	caput mortuum
160	manganese violet	194	purple
137	blue violet	124	rose carmine
141	Delft blue	130	dark flesh
157	dark indigo	131	medium flesh
144	light cobalt blue	132	light flesh
120	ultramarine	270	warm grey I
143	deep cobalt	271	warm grey II
146	sky blue	272	warm grey III
147	light blue	273	warm grey IV
145	light phthalo blue	274	warm grey V
152	dark phthalo blue	275	warm grey VI
110	zinc blue	230	cold grey I
151	Prussian blue	231	cold grey II
149	oriental blue	232	cold grey III
155	night green	233	cold grey IV
153	peacock blue	234	cold grey V
154	aquamarine	235	cold grey VI
156	blue green	181	Payne's grey
161	viridian	199	black
163	emerald green	099	soft black
162	true green	250	gold
112	leaf green	251	silver
		252	copper

Lampiran 3
Cara kerja pembuatan medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v)



Lampiran 4

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



Lampiran 5
 Hasil pengukuran konidia dan hifa *M. majus* UICC 295 dalam
 medium SDYA umur 21 hari dengan suhu inkubasi
 28° C dan kondisi gelap

Ulangan ke-	Konidia		Lebar hifa (μm)
	Panjang (μm)	Lebar (μm)	
1	23,32	5,69	2,80
2	21,14	6,19	2,91
3	23,07	6,39	2,06
4	26,44	6,26	1,90
5	26,15	6,17	2,48
6	22,40	6,05	2,06
7	24,73	5,24	2,30
8	22,84	7,49	2,91
9	19,32	5,98	1,90
10	25,80	7,14	1,90
11	24,10	5,54	1,95
12	23,43	5,61	2,06
13	26,10	6,00	2,30
14	26,17	5,08	2,48
15	23,55	6,05	2,35
16	24,84	6,92	2,91
17	21,56	5,89	2,35
18	25,06	5,36	1,84
19	19,90	4,60	2,60
20	25,22	7,16	2,80
Kisaran \pm	19,32--26,44	4,60--7,49	1,84--2,91
SD	$\pm 2,10$	$\pm 0,73$	$\pm 0,37$
Rata-rata \pm			
SD	$23,75 \pm 2,10$	$6,04 \pm 0,73$	$2,34 \pm 0,37$

Keterangan:
 SD = Standar Deviasi

Lampiran 6
 Hasil pengukuran konidia dan hifa *M. majus* UICC 295 pada
 medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang
 hijau 5% (b/v) umur 14 hari dengan suhu inkubasi
 28° C dan kondisi gelap

Ulangan ke-	Konidia		Lebar hifa (μm)
	Panjang (μm)	Lebar (μm)	
1	20,83	4,74	2,91
2	22,55	5,69	2,68
3	22,10	5,97	2,60
4	23,57	5,75	2,91
5	22,12	5,60	3,68
6	22,71	5,54	2,30
7	23,88	5,38	2,30
8	24,29	5,61	2,30
9	24,12	4,98	2,60
10	23,50	5,38	2,68
11	23,56	5,72	3,25
12	23,86	5,14	2,30
13	23,11	5,06	2,80
14	23,99	5,93	3,09
15	22,84	5,60	1,95
16	20,91	5,54	2,76
17	23,46	5,16	2,30
18	21,27	4,34	2,68
19	23,57	5,60	2,48
20	23,92	5,54	2,76
Kisaran \pm SD	20,83--24,29 \pm 1,06	4,34--5,97 \pm 0,40	1,95--3,68 \pm 0,39
Rata-rata \pm SD	23,01 \pm 1,06	5,41 \pm 0,40	2,67 \pm 0,39

Keterangan:
 SD = Standar Deviasi

Lampiran 7
 Hasil pengukuran konidia dan hifa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) umur 14 hari dengan suhu inkubasi 28° C dan kondisi gelap

Ulangan ke-	Konidia		Lebar hifa (µm)
	Panjang (µm)	Lebar (µm)	
1	24,08	5,76	5,24
2	25,86	5,51	4,24
3	26,70	6,14	5,76
4	25,80	6,59	4,24
5	25,71	6,05	3,59
6	24,27	6,39	3,96
7	23,60	5,76	3,79
8	24,75	6,51	4,62
9	24,08	5,54	4,17
10	24,13	5,14	3,96
11	25,71	5,20	3,59
12	24,57	6,54	4,34
13	24,89	5,14	3,25
14	24,63	4,60	4,36
15	24,13	5,82	4,80
16	23,68	5,98	4,17
17	25,32	5,08	3,71
18	24,53	6,00	4,53
19	24,75	6,51	3,90
20	24,69	6,41	4,24
Kisaran ± SD	23,60--26,70 ± 0,81	4,60--6,59 ± 0, 58	3,25--5,76 ± 0,58
Rata-rata ± SD	24,79 ± 0,81	5,83 ± 0, 58	4,22 ± 0,58

Keterangan:
 SD = Standar Deviasi

Lampiran 8
 Hasil pengukuran konidia dan hifa *M. majus* UICC 295 pada medium
 SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau
 15% (b/v) umur 14 hari dengan suhu inkubasi 28° C
 dan kondisi gelap

Ulangan ke-	Konidia		Lebar hifa (µm)
	Panjang (µm)	Lebar (µm)	
1	23,94	5,06	3,22
2	23,00	5,52	4,24
3	22,38	4,80	3,79
4	21,56	4,89	3,71
5	24,34	5,36	4,53
6	20,56	4,24	3,25
7	23,57	4,95	3,32
8	20,95	5,82	4,11
9	20,98	4,80	3,09
10	22,97	4,98	2,68
11	23,75	5,36	4,24
12	23,37	5,24	3,22
13	22,65	5,69	4,74
14	22,66	5,06	3,53
15	20,70	4,59	3,93
16	24,21	5,54	4,14
17	23,58	4,52	3,71
18	23,57	5,38	4,62
19	23,50	4,89	4,24
20	22,92	5,82	2,80
Kisaran	20,56--24,34	4,24--5,82	2,68--4,74
± SD	± 1,19	± 0,43	± 0,60
Rata-rata ± SD	22,76 ± 1,19	5,13 ± 0,43	3,76 ± 0,60

Keterangan:
 SD = Standar Deviasi

Lampiran 9
 Hasil uji ANOVA panjang konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau

SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau (b/v)	Panjang rata-rata (μm)	SD	Nilai P
0% (Kontrol)	23,75	1,06	0,000
5%	23,01	1,06	
10%	24,79	0,81	
15%	22,76	1,19	

Keterangan :
 SD = Standar deviasi
 Nilai P lebih kecil dari 0,05 menunjukkan terdapat perbedaan

Lampiran 10
 Hasil uji Tukey panjang konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau

Perlakuan	Perbedaan rata-rata	Nilai P
Kontrol (0%)	5%	0.78050
	10%	-1.03700
	15%	0.99900
5%	Kontrol	-.78050
	10%	-1.81750*
	15%	0.21850
10%	Kontrol	1.03700
	5%	1.81750*
	15%	2.03600*
15%	Kontrol	-0.99900
	5%	-0.21850
	10%	-2.03600*

Keterangan :
 Nilai P lebih kecil dari 0,05 menunjukkan terdapat perbedaan secara nyata

Lampiran 11
 Hasil uji ANOVA lebar konidia *M. majus* UICC 295 pada
 medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan
 tepung cangkang kerang hijau

SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau (b/v)	Lebar rata- rata (μm)	SD	Nilai P
0% (Kontrol)	6,04	0,73	0,000
5%	5,41	0,40	
10%	5,83	0,58	
15%	5,13	0,43	

Keterangan :
 SD = Standar deviasi
 Nilai P lebih kecil dari 0,05 menunjukkan terdapat perbedaan

Lampiran 12
 Hasil uji Tukey lebar konidia *M. majus* UICC 295 pada medium
 SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung
 cangkang kerang hijau

Perlakuan	Perbedaan rata-rata	Nilai P
Kontrol (0%)	5% 0.62700*	0.003
	10% 0.20700	0.642
	15% 0.91500*	0.000
5%	Kontrol -0.62700*	0.003
	10% -0.42000	0.087
	15% 0.28800	0.363
10%	Kontrol -0.20700	0.642
	5% 0.42000	0.087
	15% 0.70800*	0.001
15%	Kontrol -0.91500*	0.000
	5% -0.28800	0.363
	10% -0.70800*	0.001

Keterangan :
 Nilai P lebih kecil dari 0,05 menunjukkan terdapat perbedaan secara nyata

Lampiran 13
 Hasil uji ANOVA lebar hifa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau

SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau (b/v)	Lebar rata-rata (μm)	SD	Nilai P
0% (Kontrol)	2,34	0,37	0,000
5%	2,67	0,39	
10%	4,22	0,58	
15%	3,76	0,60	

Keterangan :
 SD = Standar deviasi
 Nilai P lebih kecil dari 0,05 menunjukkan terdapat perbedaan

Lampiran 14
 Hasil uji Tukey lebar hifa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau

Perlakuan	Perbedaan rata-rata	Nilai P
Kontrol (0%)	5%	-0.3275
	10%	-1.8770*
	15%	-1.3920*
5%	Kontrol	0.3275
	10%	-1.5495*
	15%	-1.0645*
10%	Kontrol	1.8770*
	5%	1.5495*
	15%	0.4850*
15%	Kontrol	1.3920*
	5%	1.0645*
	10%	-0.4850*

Keterangan :
 Nilai P lebih kecil dari 0,05 menunjukkan terdapat perbedaan secara nyata

Lampiran 15

Hasil enumerasi kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (w/v) dan pada medium SDYA berumur 23 hari dengan suhu inkubasi 28° C dan kondisi gelap

Pengen- -ceran	Pengul- -angan	Medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v)			Medium SDYA		
		Σ koloni pada hari ke-5	Σ CFU (CFU/ ml)	Σ CFU rata-rata (CFU/ml) ± SD	Σ koloni pada hari ke-6	Σ CFU (CFU/ ml)	Σ CFU rata-rata (CFU/ml) ± SD
10 ⁻³	1	102			55		
	2	120	1,12 x 10 ⁶		56	6,20 x 10 ⁶	
	3	116			75		
10 ⁻⁴	1	33			10		
	2	42	3,5 x 10 ⁶		5	7,00 x 10 ⁶	
	3	31		2,64 ± 1,32 x 10 ⁶	6		6,62 ± 0,40 x 10 ⁶
10 ⁻⁵	1	4			1		
	2	2	3,3 x 10 ⁶		0	6,67 x 10 ⁶	
	3	4			1		
10 ⁻⁶	1	-			-		
	2	-			-		
	3	-			-		

Keterangan:

CFU = Colony Forming Unit

SD = Standar Deviasi

Lampiran 16

Hasil hemositometer konidia kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (w/v) dan pada medium SDYA berumur 23 hari dengan suhu inkubasi 28° C dan kondisi gelap

Pengu- langan	Medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v)			Medium SDYA		
	Σ konidia/kotak	Rata- rata	Σ konidia/ml	Σ konidia/kotak	Rata- rata	Σ konidia/ml
1	54			35		
	43			25		
	71	257		45	186	
	48			44		
	41		1,23 x 10 ⁷	37		
	53			33		8,7 x 10 ⁶
2	51			39		
	40	236		31	162	
	43			28		
	49			31		

Lampiran 17

Hasil perhitungan jumlah larva *O. rhinoceros* yang mati setelah aplikasi kontak langsung dengan konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) selama pengamatan 15 hari

Hari ke-	Jumlah larva <i>O. rhinoceros</i> mati			Larva mati per hari	Kelembapan Relatif (%)	Suhu Ruang (° C)	
	KK	Kelompok Perlakuan					
		Ulangan 1	Ulangan 2				Ulangan 3
0		Aplikasi dilakukan				90	27,8
1	-	-	-	-	-	91	27,6
2	-	-	-	-	-	90	27,8
3	-	-	-	-	-	91	27,6
4	-	-	-	-	-	80	28,2
5	-	-	-	-	-	78	28,4
6	-	-	-	-	-	88	28,2
7	-	-	2	-	2	74	28,1
8	-	-	1	-	1	90	28,2
9	-	5	4	4	13	88	28,0
10	-	5	2	4	11	88	27,5
11	-	-	-	1	1	88	28,1
12	-	-	1	1	2	90	27,2
13	-	-	-	-	-	90	27,1
14	-	-	-	-	-	88	27,6
15	-	-	-	-	-	88	27,4
Total		10	10	10	30		
		Rata-rata ± SD				87 ± 5,04	27,8 ± 0,38

Keterangan:
SD = Standar Deviasi

Lampiran 18
 Hasil perhitungan jumlah larva *O. rhinoceros* yang mati setelah aplikasi kontak langsung dengan konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA selama pengamatan 15 hari

Hari ke-	Jumlah larva <i>O. rhinoceros</i> mati			Larva mati per hari	Kelembapan Relatif (%)	Suhu Ruang (° C)	
	KK	Kelompok Perlakuan					
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3				
0	Aplikasi dilakukan				90	27,8	
1	-	-	-	-	91	27,6	
2	-	-	-	-	90	27,8	
3	-	-	-	-	91	27,6	
4	-	-	-	-	80	28,2	
5	-	-	-	-	78	28,4	
6	-	-	-	-	88	28,2	
7	-	-	1	-	74	28,1	
8	-	2	1	5	8	90	28,2
9	-	5	4	1	10	88	28,0
10	-	2	1	1	4	88	27,5
11	-	1	3	3	7	88	28,1
12	-	-	-	-	-	90	27,2
13	-	-	-	-	-	90	27,1
14	-	-	-	-	-	88	27,6
15	-	-	-	-	-	88	27,4
Total		10	10	10	30		
Rata-rata ± SD						87 ± 5,04	27,8 ± 0,38

Keterangan:
 SD = Standar Deviasi

Lampiran 19
 Hasil perhitungan berat larva *O. rhinoceros* kontrol selama
 pengamatan 15 hari (g)

Kode Larva	Aplikasi dilakukan Hari ke-0	Penimbangan ke-				
		1 Hari ke-3	2 Hari ke-6	3 Hari ke-9	4 Hari ke-12	5 Hari ke-15
1	7,85	7,90	8,11	8,22	7,80	7,79
2	7,80	7,91	7,94	7,84	7,70	7,49
3	7,71	7,61	7,51	7,55	7,30	7,36
4	7,66	7,73	7,78	7,87	7,30	7,20
5	7,63	7,65	7,64	7,74	7,90	7,63
6	7,48	7,50	7,59	7,16	6,90	6,76
7	7,40	7,31	7,50	7,04	7,61	7,57
8	7,10	7,15	7,84	7,50	7,67	7,61
9	7,09	7,18	7,03	7,00	7,13	7,24
10	6,99	6,87	6,55	6,83	6,60	6,76
Rata-rata ± SD	7,41 ± 0,31	7,48 ± 0,34	7,54 ± 0,45	7,47 ± 0,45	7,39 ± 0,42	7,34 ± 0,35
11	6,98	7,05	7,02	6,70	6,60	6,60
12	6,93	7,13	7,72	6,98	7,10	7,11
13	6,91	6,87	6,94	6,82	6,80	6,50
14	6,89	6,91	6,90	6,72	6,30	5,99
15	6,83	6,80	6,70	6,03	6,51	6,57
16	6,81	6,78	6,93	7,18	6,90	6,59
17	6,64	6,89	6,96	6,63	6,60	6,41
18	6,47	6,51	6,42	6,49	6,20	6,09
19	6,31	6,28	6,24	6,06	6,30	6,16
20	6,19	6,20	6,14	6,46	6,20	5,95
Rata-rata ± SD	6,69 ± 0,28	6,74 ± 0,31	6,79 ± 0,45	6,60 ± 0,36	6,55 ± 0,30	6,39 ± 0,35
21	5,86	5,85	5,85	5,96	5,50	5,57
22	5,76	5,80	6,30	5,78	6,10	5,88
23	5,70	5,76	5,64	5,78	5,50	5,56
24	5,66	5,79	5,98	6,19	6,10	5,94
25	5,64	5,69	5,78	5,92	5,70	5,29
26	5,44	5,50	5,49	5,81	5,70	5,38
27	5,40	5,31	5,25	5,37	5,20	4,85
28	5,39	5,48	5,45	5,49	5,30	5,07
29	5,16	5,25	5,07	5,42	5,20	4,92
30	5,02	5,03	4,60	4,75	4,20	4,22
Rata-rata ± SD	5,50 ± 0,26	5,54 ± 0,27	5,54 ± 0,48	5,64 ± 0,40	5,45 ± 0,54	5,26 ± 0,52

Keterangan:
 SD = Standar Deviasi

Lampiran 20

Hasil perhitungan berat larva *O. rhinoceros* yang masih hidup setelah diaplikasi *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) selama pengamatan 15 hari (g)

Kode Larva	Aplikasi dilakukan	Penimbangan ke-				
		1	2	3	4	5
		Hari ke-				
	0	3	6	9	12	15
1	10,43	10,01	9,72	9,25	-	-
2	10,42	10,78	11,1	-	-	-
3	10,41	9,89	8,10	6,87	-	-
4	10,41	10,56	10,71	9,30	-	-
5	10,34	10,45	10,96	-	-	-
6	10,31	10,43	10,47	8,62	-	-
7	10,31	9,98	9,65	9,15	-	-
8	10,30	10,29	10,26	-	-	-
9	10,29	10,34	10,45	-	-	-
10	10,23	10,16	10,03	-	-	-
Rata-rata ± SD	10,34 ± 0,06	10,28 ± 0,28	10,14 ± 0,86	8,63 ± 1,02		
11	10,18	9,89	8,78	-	-	-
12	10,17	10,35	10,48	-	-	-
13	10,14	10,23	10,51	9,76	-	-
14	10,14	10,01	9,48	9,70	-	-
15	10,12	9,56	8,01	-	-	-
16	10,12	9,93	9,76	8,11	-	-
17	10,04	8,96	7,75	-	-	-
18	10,03	8,65	7,08	-	-	-
19	10,00	9,87	9,25	-	-	-
20	9,91	9,89	9,88	-	-	-
Rata-rata ± SD	10,08 ± 0,08	9,73 ± 0,53	9,09 ± 1,16	9,19 ± 0,93		
21	9,87	9,82	9,72	8,81	-	-
22	9,86	9,87	9,87	-	-	-
23	9,85	9,93	9,96	-	-	-
24	9,83	9,51	9,13	8,15	-	-
25	9,78	9,41	9,22	9,44	-	-
26	9,77	8,62	7,59	6,57	-	-
27	9,68	9,71	9,82	7,93	-	-
28	9,66	9,78	9,99	7,40	-	-
29	9,65	9,61	9,54	-	-	-
30	9,61	9,73	10,24	-	-	-
Rata-rata ± SD	9,75 ± 0,09	9,59 ± 0,37	9,50 ± 0,75	8,05 ± 1,01		

Keterangan:

- = Larva Mati

SD = Standar Deviasi

Lampiran 21
 Hasil perhitungan berat larva *O. rhinoceros* yang masih hidup setelah diaplikasi
M. majus UICC 295 pada medium SDYA selama pengamatan
 15 hari (g)

Kode Larva	Aplikasi dilakukan	Penimbangan ke-				
		1	2	3	4	5
	Hari ke-					
	0	3	6	9	12	15
1	9,49	9,63	9,91	-	-	-
2	9,43	9,22	9,31	8,19	-	-
3	9,39	9,28	8,43	-	-	-
4	9,36	9,54	9,82	-	-	-
5	9,35	9,46	9,59	-	-	-
6	9,31	9,27	9,14	6,69	-	-
7	9,21	8,88	8,63	6,44	-	-
8	9,04	8,70	8,63	7,37	-	-
9	8,96	8,60	7,14	6,38	-	-
10	8,94	8,82	8,72	6,87	-	-
Rata-rata ± SD	9,24 ± 0,20	9,14 ± 0,36	8,93 ± 0,82	6,99 ± 0,68		
11	8,91	8,92	8,98	8,66	-	-
12	8,85	8,78	8,75	-	-	-
13	8,82	8,92	9,09	8,42	-	-
14	8,73	8,71	8,54	-	-	-
15	8,68	8,42	8,30	6,60	-	-
16	8,64	8,29	6,69	-	-	-
17	8,61	8,52	7,25	6,82	-	-
18	8,60	8,44	8,33	-	-	-
19	8,58	7,98	6,72	-	-	-
20	8,57	8,52	8,46	7,67	-	-
Rata-rata ± SD	8,69 ± 0,12	8,55 ± 0,29	8,11 ± 0,89	7,63 ± 0,92		
21	8,57	8,45	8,23	7,05	-	-
22	8,46	8,21	8,08	-	-	-
23	8,46	8,44	8,55	-	-	-
24	8,45	7,82	5,57	-	-	-
25	8,19	7,96	7,98	-	-	-
26	8,19	8,29	8,38	7,54	-	-
27	8,06	8,22	8,32	-	-	-
28	7,99	7,92	7,81	-	-	-
29	7,96	8,08	8,11	7,32	-	-
30	7,88	8,01	8,23	6,9	-	-
Rata-rata ± SD	8,22 ± 0,24	8,14 ± 0,21	7,92 ± 0,85	7,20 ± 0,28		

Keterangan:

- = Larva Mati
 SD = Standar Deviasi

Lampiran 22

Hasil enumerasi *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA setelah dipreservasi selama 30 hari menggunakan akuades pada suhu -80° C

Hari ke-	Pengen-ceran	Pengul-angan	Σ Koloni pada hari ke-6		Σ CFU (CFU/ml)		Σ CFU rata-rata (CFU/ml)	
			Batch		Batch		Batch	
			1	2	1	2	1	2
0	10 ⁻³	1	>300	186	-	1,67 x 10 ⁶	6,60 x 10 ⁶	3,45 x 10 ⁶
		2	>300	156				
		3	>300	161				
	10 ⁻⁴	1	56	44	6,20 x 10 ⁶	4,40 x 10 ⁶	6,60 x 10 ⁶	3,45 x 10 ⁶
		2	55	45				
		3	75	44				
	10 ⁻⁵	1	10	4	7,00 x 10 ⁶	4,30 x 10 ⁶	6,60 x 10 ⁶	3,45 x 10 ⁶
		2	5	5				
		3	6	4				
	10 ⁻⁶	1	0	0	-	-	6,60 x 10 ⁶	3,45 x 10 ⁶
		2	0	0				
		3	0	0				
1	10 ⁻³	1	>300	135	-	1,29 x 10 ⁶	3,70 x 10 ⁶	1,56 x 10 ⁶
		2	>300	112				
		3	>300	139				
	10 ⁻⁴	1	29	35	5,10 x 10 ⁶	2,40 x 10 ⁶	3,70 x 10 ⁶	1,56 x 10 ⁶
		2	41	20				
		3	84	17				
	10 ⁻⁵	1	1	1	2,30 x 10 ⁶	1,00 x 10 ⁶	3,70 x 10 ⁶	1,56 x 10 ⁶
		2	4	1				
		3	2	1				
	10 ⁻⁶	1	-	-	-	-	3,70 x 10 ⁶	1,56 x 10 ⁶
		2	-	-				
		3	-	-				

Lampiran 22
(Lanjutan)

14	Tanpa Pengenceran	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10 ⁻¹	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10 ⁻²	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10 ⁻³	1	101	98			3,39 x 10 ⁶	1,51 x 10 ⁶
		2	113	118	1,06 x 10 ⁶	1,08 x 10 ⁶		
		3	104	109				
	10 ⁻⁴	1	40	18				
		2	54	17	4,80 x 10 ⁶	1,77 x 10 ⁶		
		3	50	18				
10 ⁻⁵	1	4	2					
	2	4	2	4,30 x 10 ⁶	1,67 x 10 ⁶			
	3	5	1					
30	Tanpa Pengenceran	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10 ⁻¹	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10 ⁻²	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300			3,13 x 10 ⁶	1,20 x 10 ⁶
	10 ⁻³	1	144	101				
		2	194	100	1,57 x 10 ⁶	1,02 x 10 ⁶		
		3	133	105				
	10 ⁻⁴	1	32	11				
		2	36	15	3,50 x 10 ⁶	1,26 x 10 ⁶		
		3	37	12				
10 ⁻⁵	1	7	1					
	2	3	1	4,33 x 10 ⁶	1,33 x 10 ⁶			
	3	3	2					

Lampiran 23
 Hasil enumerasi *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA setelah dipreservasi selama 30 hari menggunakan gliserol 10% (v/v) pada suhu -80° C

Hari ke-	Pengen- ceran	Pengul- angan	Σ Koloni pada hari ke-6		Σ CFU (CFU/ml)		Σ CFU rata-rata (CFU/ml)		
			<i>Batch</i>		<i>Batch</i>		<i>Batch</i>		
			1	2	1	2	1	2	
0	10 ⁻³	1	>300	186					
		2	>300	156	-	1,67 x 10 ⁶			
		3	>300	161					
	10 ⁻⁴	1	56	44					
		2	55	45	6,20 x 10 ⁶	4,40 x 10 ⁶			
		3	75	44			6,60 x 10 ⁶	3,45 x 10 ⁶	
	10 ⁻⁵	1	10	4					
		2	5	5	7,00 x 10 ⁶	4,30 x 10 ⁶			
		3	6	4					
	10 ⁻⁶	1	0	0					
		2	0	0	-	-			
		3	0	0					
	1	Tanpa Pengen- ceran	1	>300	>300				
			2	>300	>300	-	-		
			3	>300	>300				
10 ⁻¹		1	>300	>300					
		2	>300	>300	-	-			
		3	>300	>300					
10 ⁻²		1	>300	>300					
		2	>300	>300	-	-			
		3	>300	>300			4,63 x 10 ⁶	2,78 x 10 ⁶	
10 ⁻³	1	160	121						
	2	164	134	1,52 x 10 ⁶	1,26 x 10 ⁶				
	3	131	124						
10 ⁻⁴	1	65	32						
	2	75	46	7,03 x 10 ⁶	3,76 x 10 ⁶				
	3	71	35						
10 ⁻⁵	1	8	5						
	2	2	3	5,33 x 10 ⁶	3,33 x 10 ⁶				
	3	6	2						

Lampiran 23
(Lanjutan)

14	Tanpa Pengenceran	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10 ⁻¹	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10 ⁻²	1	159	122				
		2	163	138	1,45 x 10 ⁵	1,26 x 10 ⁵		
		3	112	117				
	10 ⁻³	1	17	10				
		2	30	14	2,57 x 10 ⁵	1,47 x 10 ⁵	2,67 x 10 ⁵	2,02 x 10 ⁵
		3	30	21				
	10 ⁻⁴	1	5	4				
		2	4	3	4,00 x 10 ⁵	3,33 x 10 ⁵		
		3	3	3				
10 ⁻⁵	1	0	0					
	2	0	0	-	-			
	3	0	0					
30	Tanpa Pengenceran	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10 ⁻¹	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10 ⁻²	1	111	127				
		2	148	112	1,33 x 10 ⁵	1,20 x 10 ⁵		
		3	141	121			1,24 x 10 ⁵	1,11 x 10 ⁵
	10 ⁻³	1	7	11				
		2	17	10	1,16 x 10 ⁵	1,13 x 10 ⁵		
		3	11	13				
	10 ⁻⁴	1	-	1				
		2	-	1	-	1,00 x 10 ⁵		
		3	-	1				
10 ⁻⁵	1	-	-					
	2	-	-	-	-			
	3	-	-					

Lampiran 24

Hasil enumerasi *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA setelah dipreservasi selama 30 hari menggunakan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v) pada suhu -80° C

Hari ke-	Pengen- ceran	Pengul- angan	Σ Koloni pada hari ke-6		Σ CFU (CFU/ml)		Σ CFU rata-rata (CFU/ml)	
			<i>Batch</i>		<i>Batch</i>		<i>Batch</i>	
			1	2	1	2	1	2
0	10 ⁻³	1	>300	186				
		2	>300	156	-	1,67 x 10 ⁶		
		3	>300	161				
	10 ⁻⁴	1	56	44				
		2	55	45	6,20 x 10 ⁶	4,40 x 10 ⁶		
		3	75	44			6,60 x 10 ⁶	3,45 x 10 ⁶
	10 ⁻⁵	1	10	4				
		2	5	5	7,00 x 10 ⁶	4,30 x 10 ⁶		
		3	6	4				
	10 ⁻⁶	1	0	0				
		2	0	0	-	-		
		3	0	0				
1	Tanpa Pengen- ceran	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10 ⁻¹	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10 ⁻²	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10 ⁻³	1	90	41			5,50 x 10 ⁵	4,10 x 10 ⁵
		2	50	56	5,70 x 10 ⁵	4,90 x 10 ⁵		
		3	32	50				
10 ⁻⁴	1	8	3					
	2	3	5	5,30 x 10 ⁵	3,33 x 10 ⁵			
	3	5	2					
10 ⁻⁵	1	0	0					
	2	0	0	-	-			
	3	0	0					

Lampiran 24
(Lanjutan)

14	Tanpa Pengenceran	1	106	101				
		2	102	100	$1,03 \times 10^3$	$1,01 \times 10^3$		
		3	102	103				
	10^{-1}	1	31	26				
		2	11	24	$2,00 \times 10^3$	$2,73 \times 10^3$		
		3	18	32				
	10^{-2}	1	3	2				
		2	0	1	$2,33 \times 10^3$	$1,66 \times 10^3$		
		3	4	2				
	10^{-3}	1	0	0			$1,78 \times 10^3$	$1,80 \times 10^3$
		2	0	0	-	-		
		3	0	0				
	10^{-4}	1	0	0				
		2	0	0	-	-		
		3	0	0				
10^{-5}	1	0	0					
	2	0	0	-	-			
	3	0	0					
30	Tanpa Pengenceran	1	40	50				
		2	28	48	$3,76 \times 10^2$	$5,03 \times 10^2$		
		3	45	53				
	10^{-1}	1	6	7				
		2	3	7	$5,33 \times 10^2$	$6,67 \times 10^2$		
		3	7	6				
	10^{-2}	1	-	-				
		2	-	-				
		3	-	-			$4,54 \times 10^2$	$5,85 \times 10^2$
	10^{-3}	1	-	-				
		2	-	-				
		3	-	-				
	10^{-4}	1	-	-				
		2	-	-				
		3	-	-				
10^{-5}	1	-	-					
	2	-	-					
	3	-	-					

Lampiran 25

Hasil enumerasi *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) setelah dipreservasi selama 30 hari menggunakan akuades pada suhu -80° C

Hari ke-	Pengen- ceran	Pengul- angan	Σ Koloni pada hari ke-5		Σ CFU (CFU/ml)		Σ CFU rata-rata (CFU/ml)	
			<i>Batch</i>		<i>Batch</i>		<i>Batch</i>	
			1	2	1	2	1	2
0	10 ⁻³	1	112	101				
		2	122	105	1,20 x 10 ⁶	1,01 x 10 ⁶		
		3	128	98				
	10 ⁻⁴	1	44	21				
		2	46	24	4,60 x 10 ⁶	2,00 x 10 ⁶		
		3	49	15			2,93 x 10 ⁶	1,53 x 10 ⁶
	10 ⁻⁵	1	3	2				
		2	1	1	3,00 x 10 ⁶	1,60 x 10 ⁶		
		3	5	2				
	10 ⁻⁶	1	0	0				
		2	0	0	-	-		
		3	0	0				
1	Tanpa Pengen- ceran	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10 ⁻¹	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10 ⁻²	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
1	10 ⁻³	1	110	100			2,42 x 10 ⁶	1,43 x 10 ⁶
		2	108	99	1,07 x 10 ⁶	1,00 x 10 ⁶		
		3	104	103				
	10 ⁻⁴	1	35	17				
		2	30	15	2,86 x 10 ⁶	1,63 x 10 ⁶		
		3	21	17				
	10 ⁻⁵	1	2	2				
		2	3	1	3,33 x 10 ⁶	1,66 x 10 ⁶		
		3	5	2				

Lampiran 25
(Lanjutan)

14	Tanpa Pengenceran	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10 ⁻¹	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10 ⁻²	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
			1	128	112		2,37 x 10 ⁶	1,26 x 10 ⁶
	10 ⁻³	2	130	100	1,26 x 10 ⁶	1,05 x 10 ⁶		
		3	120	105				
		1	25	19				
	10 ⁻⁴	2	29	11	2,86 x 10 ⁶	1,40 x 10 ⁶		
		3	32	12				
1		3	1					
10 ⁻⁵	2	2	2	3,00 x 10 ⁶	1,33 x 10 ⁶			
	3	4	1					
30	Tanpa Pengenceran	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10 ⁻¹	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10 ⁻²	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
			1	100	101		2,16 x 10 ⁶	1,08 x 10 ⁶
	10 ⁻³	2	107	100	1,02 x 10 ⁶	1,00 x 10 ⁶		
		3	101	99				
		1	25	15				
	10 ⁻⁴	2	29	12	2,80 x 10 ⁶	1,26 x 10 ⁶		
		3	30	11				
1		3	1					
10 ⁻⁵	2	2	1	2,67 x 10 ⁶	1,00 x 10 ⁶			
	3	3	1					

Lampiran 26
 Hasil enumerasi *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) setelah dipreservasi selama 30 hari menggunakan gliserol 10% (v/v) pada suhu -80° C

Hari ke-	Pengen- ceran	Pengul- angan	Σ Koloni pada hari ke-5		Σ CFU (CFU/ml)		Σ CFU rata-rata (CFU/ml)		
			Batch		Batch		Batch		
			1	2	1	2	1	2	
0	10 ⁻³	1	112	101					
		2	122	105	1,20 x 10 ⁶	1,01 x 10 ⁶			
		3	128	98					
	10 ⁻⁴	1	44	21					
		2	46	24	4,60 x 10 ⁶	2,00 x 10 ⁶			
		3	49	15			2,93 x 10 ⁶	1,53 x 10 ⁶	
	10 ⁻⁵	1	3	2					
		2	1	1	3,00 x 10 ⁶	1,60 x 10 ⁶			
		3	5	2					
	10 ⁻⁶	1	0	0					
		2	0	0	-	-			
		3	0	0					
	1	Tanpa Pengen- ceran	1	57	65				
			2	78	68	6,80 x 10 ²	7,10 x 10 ²		
			3	69	80				
10 ⁻¹		1	5	6					
		2	6	10	6,67 x 10 ²	7,67 x 10 ²			
		3	9	7					
10 ⁻²		1	0	0					
		2	0	1	6,67 x 10 ²	6,67 x 10 ²			
		3	2	1					
10 ⁻³		1	0	0			6,71 x 10 ²	7,14 x 10 ²	
		2	0	0	-	-			
		3	0	0					
10 ⁻⁴		1	0	0					
		2	0	0	-	-			
		3	0	0					
10 ⁻⁵	1	0	0						
	2	0	0	-	-				
	3	0	0						

Lampiran 26
(Lanjutan)

14	Tanpa Pengenceran	1	5	6			
		2	3	3	46	36	
		3	6	2			
	10 ⁻¹	1	0	0			
		2	0	0	-	-	
		3	0	0			
	10 ⁻²	1	0	0			
		2	0	0	-	-	
		3	0	0			
			1	0	0	46	36
	10 ⁻³	1	0	0			
		2	0	0	-	-	
		3	0	0			
	10 ⁻⁴	1	0	0			
		2	0	0	-	-	
3		0	0				
10 ⁻⁵	1	0	0				
	2	0	0	-	-		
	3	0	0				
30	Tanpa Pengenceran	1	4	1			
		2	3	2	2,67	1,33	
		3	1	1			
	10 ⁻¹	1	-	-			
		2	-	-	-	-	
		3	-	-			
	10 ⁻²	1	-	-			
		2	-	-	-	-	
		3	-	-			
			1	-	-	2,67	1,33
	10 ⁻³	1	-	-			
		2	-	-	-	-	
		3	-	-			
	10 ⁻⁴	1	-	-			
		2	-	-	-	-	
3		-	-				
10 ⁻⁵	1	-	-				
	2	-	-	-	-		
	3	-	-				

Lampiran 27

Hasil enumerasi *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kerang hijau 10% (b/v) setelah dipreservasi selama 30 hari menggunakan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan glukosa 5% (v/v) pada suhu -80° C

Hari ke-	Pengen- ceran	Pengul- angan	Σ Koloni pada hari ke-5		Σ CFU (CFU/ml)		Σ CFU rata-rata (CFU/ml)	
			<i>Batch</i>		<i>Batch</i>		<i>Batch</i>	
			1	2	1	2	1	2
0	10 ⁻³	1	112	101	1,20 x 10 ⁶	1,01 x 10 ⁶	2,93 x 10 ⁶	1,53 x 10 ⁶
		2	122	105				
		3	128	98				
	10 ⁻⁴	1	44	21	4,60 x 10 ⁶	2 x 10 ⁶		
		2	46	24				
		3	49	15				
	10 ⁻⁵	1	3	2	3,00 x 10 ⁶	1,6 x 10 ⁶		
		2	1	1				
		3	5	2				
	10 ⁻⁶	1	0	0	-	-		
		2	0	0				
		3	0	0				
1	Tanpa Pengen- ceran	1	8	9	66,7	70		
		2	4	5				
		3	8	7				
	10 ⁻¹	1	1	0	66,7	66,7		
		2	0	2				
		3	1	0				
	10 ⁻²	1	0	0	-	-		
		2	0	0				
		3	0	0				
10 ⁻³	1	0	0	-	-			
	2	0	0					
	3	0	0					
10 ⁻⁴	1	0	0	-	-			
	2	0	0					
	3	0	0					
10 ⁻⁵	1	0	0	-	-			
	2	0	0					
	3	0	0					

Lampiran 27
(Lanjutan)

	Tanpa Pengenceran	1	4	3		
		2	4	1	40	20
		3	4	2		
		1	0	0		
	10 ⁻¹	2	0	0	-	-
		3	0	0		
		1	0	0		
	10 ⁻²	2	0	0	-	-
		3	0	0		
14		1	0	0		40
	10 ⁻³	2	0	0	-	-
		3	0	0		
		1	0	0		
	10 ⁻⁴	2	0	0	-	-
		3	0	0		
		1	0	0		
	10 ⁻⁵	2	0	0	-	-
		3	0	0		
	Tanpa Pengenceran	1	3	1		
		2	1	1	2,33	1,33
		3	3	2		
		1	-	-		
	10 ⁻¹	2	-	-	-	-
		3	-	-		
		1	-	-		
	10 ⁻²	2	-	-	-	-
		3	-	-		
30		1	-	-		2,33
	10 ⁻³	2	-	-	-	-
		3	-	-		
		1	-	-		
	10 ⁻⁴	2	-	-	-	-
		3	-	-		
		1	-	-		
	10 ⁻⁵	2	-	-	-	-
		3	-	-		