



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH PENAMBAHAN TEPUNG KULIT UDANG PADA
MEDIUM PERTUMBUHAN TERHADAP KEMAMPUAN
Metarhizium majus UICC 295 MENGINFEKSI
LARVA *Oryctes rhinoceros* Linnaeus**

SKRIPSI

**NUR AMALINA KHODIJAH
0806453264**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH PENAMBAHAN TEPUNG KULIT UDANG 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

**NUR AMALINA KHODIJAH
0806453264**

**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 : Nur Amalina Khodijah

NPM : 0806453264

Tanda tangan : 


Tanggal : 25 Juni 2012

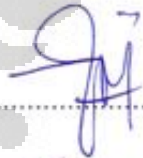
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Nur Amalina Khodijah
NPM : 0806453264
Program Studi : S1 Biologi
Judul Skripsi : Pengaruh Penambahan Tepung Kulit Udang 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 Octari, Ph.D. (.....) 

Penguji I : Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D. (.....) 

Penguji II : Dr. rer. nat. Yasman, S.Si., M.Sc. (.....) 

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 25 Juni 2012

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'alamin, segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala anugerah, rahmat, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian hingga akhir penulisan skripsi. Saya menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ariyanti Oetari, Ph.D. selaku pembimbing atas segala bimbingan, motivasi, perhatian dan kesabaran, serta sumbangan pikiran selama penelitian hingga tersusunnya skripsi.
2. *University of Indonesia Culture Collection (UICC)* yang telah membiayai penelitian.
3. Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D., Dr.rer.nat. Yasman, M.Sc., 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, Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Titi Soedjiarti, S.U. selaku Koordinator Pendidikan Departemen Biologi FMIPA UI, dan seluruh staf pengajar Departemen Biologi FMIPA UI, khususnya pengajar bidang mikrobiologi, atas perhatian dan dukungannya.
5. Dr. Susiani Purbaningsih, DEA selaku Penasihat Akademik atas nasihat, perhatian, dan dukungannya.
6. Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. dan Dra. Setiorini M. Kes. selaku koordinator seminar yang telah memberikan saran dan bimbingan kepada penulis.
7. Ahmad Supriyadi, S.Pi., Asri Martini S.Si., Pak Taryana, Pak Taryono, Mbak Aam, dan seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA UI atas semua bantuan yang diberikan.
8. Mama dan Papa atas do'a, kasih sayang, pengertian, pengorbanan, serta dukungan moril dan materil yang selalu diberikan.

9. Saudara-saudaraku tersayang, Mas Ilman, Kak Isti, Iqo, Aldi, dan keponakanku, Naia, atas segala do'a, dukungan, dan semangat yang diberikan kepada penulis.
10. Cinthya Karlina, Dhian Chitra Ayu, Oktarina Sumandari, dan Grand Septia Yama selaku teman seperjuangan yang selalu bersama dalam suka maupun duka selama masa penelitian dan penulisan skripsi ini.
11. Bapak Sutopo dan seluruh karyawan Gubuk Makan Mang Engking yang telah membantu menyediakan limbah kulit udang, Bapak Endi dan Bapak Sangsang yang telah menyediakan larva yang digunakan dalam penelitian, serta Bapak Yaya dan keluarga fotokopi Cenat-Cenut yang telah membantu penulis selama penyelesaian skripsi.
12. Teman-teman di Laboratorium Mikrobiologi, DIVAS (Dhila, Savitry, Hanum, dan Seyla), DEMON (Dessy, Edvan, Michelle, Usman, dan Alvin), CITRUS (Rizki, Nova, Rusli, dan Sentot), NADIN (Hanna dan Muhabidin), Kak Doni, Kak Bama, Kak Galuh, Kak Reza, Kak Niar, Kak Dafina, Kak Irvan, Mbak Reno, Mbak Dalia, Mbak Murni, dan Bu Retno yang telah banyak membantu dan memberi masukan dalam menyelesaikan penelitian.
13. Sahabat-sahabat terdekatku, Pepe, Agung, Ria, Andini, Hanna, Made, Sartika, Nusa, Uq, Ferry atas do'a, semangat, dukungan, dan perhatian yang telah diberikan.
14. Teman-teman Biologi khususnya BIOSENTRIS yang tidak bisa disebutkan satu persatu, atas pertemanan yang tak akan terlupakan, serta adik-adik ZYGOMORPHIC dan BIOGENESIS.
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, 2 Juli 2012

Penulis

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

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

Nama : Nur Amalina Khodijah
NPM : 0806453264
Program Studi : S1
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

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

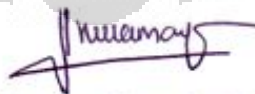
Pengaruh Penambahan Tepung Kulit Udang pada Medium Pertumbuhan terhadap Kemampuan *Metarhizium majus* UICC 295 Menginfeksi Larva *Oryctes rhinoceros* Linnaeus

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 25 Juni 2012

Yang menyatakan



(Nur Amalina Khodijah)

ABSTRAK

Nama : Nur Amalina Khodijah
Program Studi : Biologi
Judul : Pengaruh Penambahan Tepung Kulit Udang pada Medium
Pertumbuhan terhadap Kemampuan *Metarhizium majus*
UICC 295 Menginfeksi Larva *Oryctes rhinoceros*
Linnaeus

Metarhizium majus UICC 295 adalah kapang entomopatogen. Penelitian bertujuan menguji kemampuan *M. majus* UICC 295 pada medium *Sabouraud Dextrose with Yeast Extract Agar* (SDYA) dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) dalam menginfeksi larva *Oryctes rhinoceros* serta mengetahui pengaruh preservasi metode *freezing* pada suhu -80°C menggunakan protektan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan sukrosa 5% (b/v). *Metarhizium majus* UICC 295 pada SDYA mampu membunuh larva 3,33%--100% dalam 7--11 hari dan dengan penambahan tepung kulit udang 10% membunuh larva 6,67%--40% dalam waktu 12--30 hari. *Metarhizium majus* UICC 295 pada medium SDYA tetap memiliki viabilitas setelah dipreservasi pada suhu -80°C menggunakan gliserol 10% dan gliserol 10% dengan penambahan sukrosa 5%. *Metarhizium majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan kulit udang 10% kehilangan viabilitasnya setelah dipreservasi pada suhu -80°C . *Metarhizium majus* UICC 295 pada kadaver larva *O. rhinoceros* tetap memiliki viabilitas setelah dipreservasi pada suhu -80°C .

Kata kunci: fungi entomopatogen, kulit udang, *Metarhizium majus*, *Oryctes rhinoceros*, preservasi, viabilitas.

xv + 88 halaman; 19 gambar; 7 tabel; 26 lampiran
Daftar Acuan : 62 (1976--2012)

ABSTRACT

Name : Nur Amalina Khodijah
Study Program : Biology
Title : The Effect of Shrimp 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 pathogenicity of *M. majus* UICC 295 from Sabouraud Dextrose Agar with Yeast Extract (SDAY) medium added with 10% (w/v) shrimp shell powder to infect *Oryctes rhinoceros* larvae, and to determine the effect of preservation with freezing method at -80° C with 10% (v/v) glycerol and 10% (v/v) glycerol with addition of 5% (w/v) sucrose as protectants. Application of *M. majus* UICC 295 from SDYA caused 3.33%--100% larval mortality within 7--11 days, whereas addition of 10% shrimp shell powder caused 6.67%--40% larval mortality within 12--30 days. *Metarhizium majus* UICC 295 from SDYA was viable after being preserved at -80° C with 10% glycerol and 10% glycerol with addition of 5% sucrose as cryoprotectant, *M. majus* UICC 295 from SDYA with addition of 10% shrimp shell powder lost its viability after being preserved at -80° C with both cryoprotectants. *Metarhizium majus* UICC 295 on *O. rhinoceros* cadaver was viable after being preserved at -80° C.

Keywords: Entomopathogenic fungus, *Metarhizium majus*, *Oryctes rhinoceros*, preservation, shrimp shell, viability.

xv + 88 pages; 19 pictures; 7 tables; 26 attachments
Bibliography : 62 (1976--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 Kapang <i>Metarhizium majus</i>	7
2.3 Kumbang Badak (<i>Oryctes rhinoceros</i>).....	10
2.4 Medium dengan Penambahan Kulit Udang.....	13
2.5 Aplikasi Kapang pada Serangga.....	15
2.6 Preservasi Kapang.....	15
3. METODOLOGI PENELITIAN.....	18
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	18
3.2 Alat dan Bahan.....	18
3.2.1 Alat.....	18
3.2.2 Bahan.....	19
3.2.2.1 Mikroorganisme.....	19
3.2.2.2 Larva <i>Oryctes rhinoceros</i>	19
3.2.2.3 Medium.....	19
3.2.2.4 Limbah Kulit Udang.....	19
3.2.2.5 Bahan Kimia.....	19
3.2.2.6 Bahan Habis Pakai.....	20
3.3 Cara Kerja.....	20
3.3.1 Pembuatan Medium <i>Sabouraud Dextrose with Yeast Extract</i> Agar (SDYA).....	20
3.3.2 Pembuatan Tepung Kulit Udang.....	21
3.3.3 Pembuatan Medium SDYA dengan Penambahan Tepung Kulit Udang.....	21
3.3.4 Pemeliharaan dan Penyimpanan Isolat Kapang.....	21
3.3.5 Pengamatan Morfologi Kapang.....	22
3.3.6 Enumerasi Konidia/Hifa Kapang.....	22
3.3.7 Persiapan Larva untuk Pengujian.....	24
3.3.8 Pembuatan Larutan Triton X-100 0,05% Steril.....	24

3.3.9	Pengujian Konidia/Hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada Larva <i>O. rhinoceros</i> dengan Metode Kontak Langsung.....	24
3.3.10	Preservasi kapang <i>M. majus</i> UICC 295 dan kadaver larva <i>O. rhinoceros</i> pada suhu -80° C.....	26
3.3.11	Pengujian viabilitas <i>M. majus</i> UICC 295 dan <i>M. majus</i> UICC 295 pada kadaver larva <i>O. rhinoceros</i> setelah preservasi pada suhu -80° C	27
3.3.12	Pengolahan dan Analisis Data.....	28
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
4.1	Pengaruh Penambahan Tepung Kulit Udang pada Medium Pertumbuhan terhadap Karakter Morfologi <i>M. majus</i> UICC 295.....	29
4.2	Pengujian Suspensi Konidia/Hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada Larva <i>O. rhinoceros</i>	39
4.3	Preservasi Konidia/Hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada Suhu -80° C.....	49
5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	59
	DAFTAR REFERENSI.....	60
	LAMPIRAN.....	66

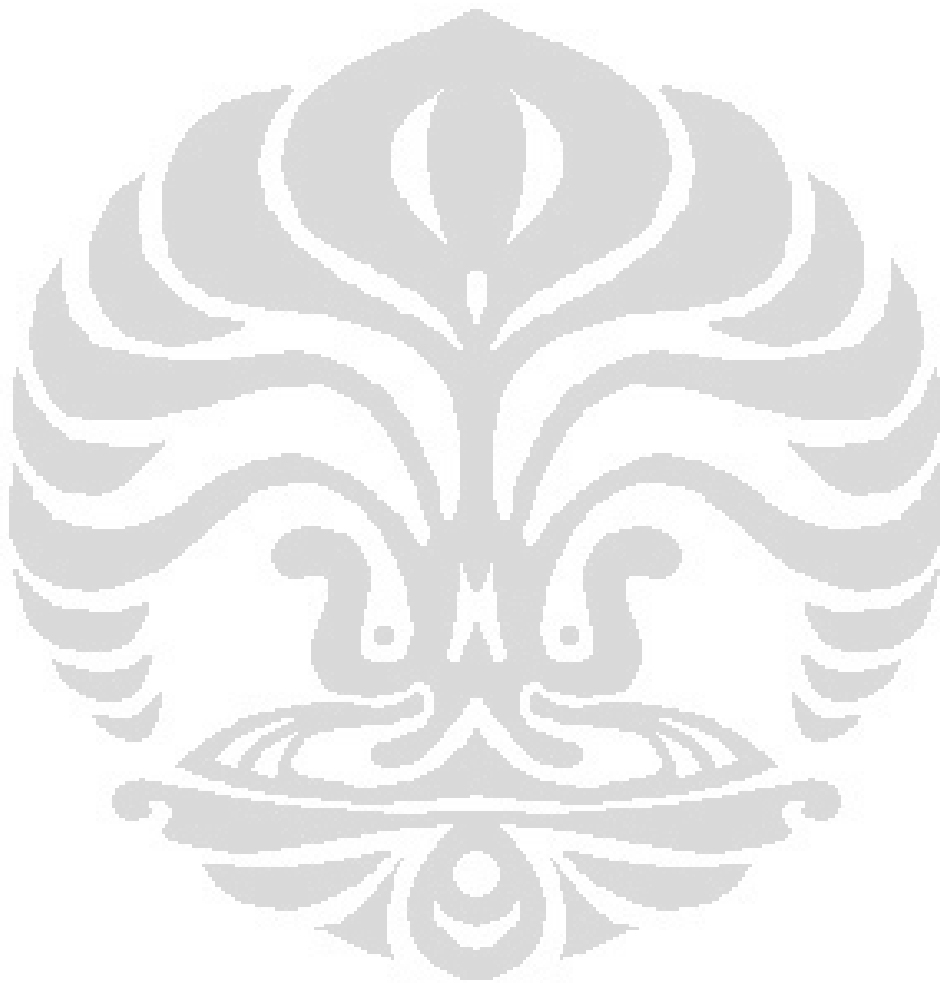
DAFTAR TABEL

Tabel 4.1.1.	Hasil pengamatan morfologi koloni <i>M. majus</i> UICC 295 dalam medium SDYA (umur 18 hari) dan dalam medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) (umur 10 hari) pada suhu 28° C dengan kondisi gelap	33
Tabel 4.1.2.	Diameter koloni rata-rata <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) umur 10 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap.....	36
Tabel 4.1.3.	Ukuran hifa dan konidia <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA umur 21 hari dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) umur 10 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap.....	38
Tabel 4.2.1.	Hasil enumerasi konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 dalam medium SDYA umur 23 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap menggunakan metode TPC	41
Tabel 4.2.2.	Hasil enumerasi <i>M. majus</i> UICC 295 dalam medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) umur 23 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap menggunakan metode TPC.....	41
Tabel 4.2.3.	Hasil enumerasi konidia <i>M. majus</i> UICC 295 umur 25 hari dalam medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) pada suhu 28° C dengan kondisi gelap menggunakan hemositometer.....	42
Tabel 4.2.4	Jumlah larva mati dan persentase kematian larva per hari selama 30 hari pengamatan.....	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.2.1.	Cordyceps brittlebankisoides.....	8
Gambar 2.2.2.	Metarhizium majus.....	9
Gambar 2.3.	Oryctes rhinoceros.....	11
Gambar 2.4.	Struktur eksoskeleton Crustacea.....	14
Gambar 4.1.1	Hasil pembuatan tepung kulit udang untuk medium pertumbuhan <i>M. majus</i> UICC 295.....	30
Gambar 4.1.2.	Koloni <i>M. majus</i> UICC 295 umur 10 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap.....	34
Gambar 4.1.3.	Hifa dan Konidia <i>M. majus</i> UICC 295 pada suhu 28° C dengan kondisi gelap menggunakan pewarna <i>lactophenol cotton blue</i>	35
Gambar 4.1.4.	Grafik persentase kenaikan diameter koloni rata-rata <i>M. majus</i> UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) dibandingkan dengan kontrol umur 10 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap.....	36
Gambar 4.1.5.	Grafik ukuran hifa dan konidia <i>M. majus</i> UICC 295 pada SDYA umur 21 hari dan pada SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) umur 14 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap.....	39
Gambar 4.2.1.	Grafik perbandingan berat rata-rata larva kontrol dan perlakuan selama 30 hari pengamatan.....	44
Gambar 4.2.2.	Bercak cokelat kehitaman (melanin) pada tubuh larva.....	44
Gambar 4.2.3.	Larva mati terinfeksi <i>M. majus</i> UICC 295.....	47
Gambar 4.2.4.	Grafik kematian larva perlakuan dengan aplikasi suspensi konidia/larva <i>M. majus</i> UICC 295 selama 30 hari pengamatan.....	48
Gambar 4.3.1.	Grafik presentase viabilitas <i>M. majus</i> UICC 295 dari medium SDYA setelah dipreservasi pada suhu -80° C selama 30 hari.....	49
Gambar 4.3.2.	Grafik persentase <i>M. majus</i> UICC 295 dari medium SDYA dengan penambahan kulit udang 10% setelah dipreservasi pada suhu -80° C selama 30 hari di dalam akuades.....	50
Gambar 4.3.3.	Hifa dan konidia <i>M. majus</i> UICC 295 dari kadaver larva <i>O. rhinoceros</i> pada medium SDYA pada suhu 28° C dengan kondisi gelap menggunakan pewarna <i>lactophenol cotton blue</i>	54
Gambar 4.3.4.	Hifa dan konidia <i>M. majus</i> UICC 295 dari kadaver larva <i>O. rhinoceros</i> pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) suhu 28° C dengan kondisi gelap menggunakan pewarna <i>lactophenol cotton blue</i>	55
Gambar 4.3.5.	Hasil pengujian viabilitas <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA setelah dipreservasi selama satu hari dengan kadaver larva pada suhu -80° C.....	56

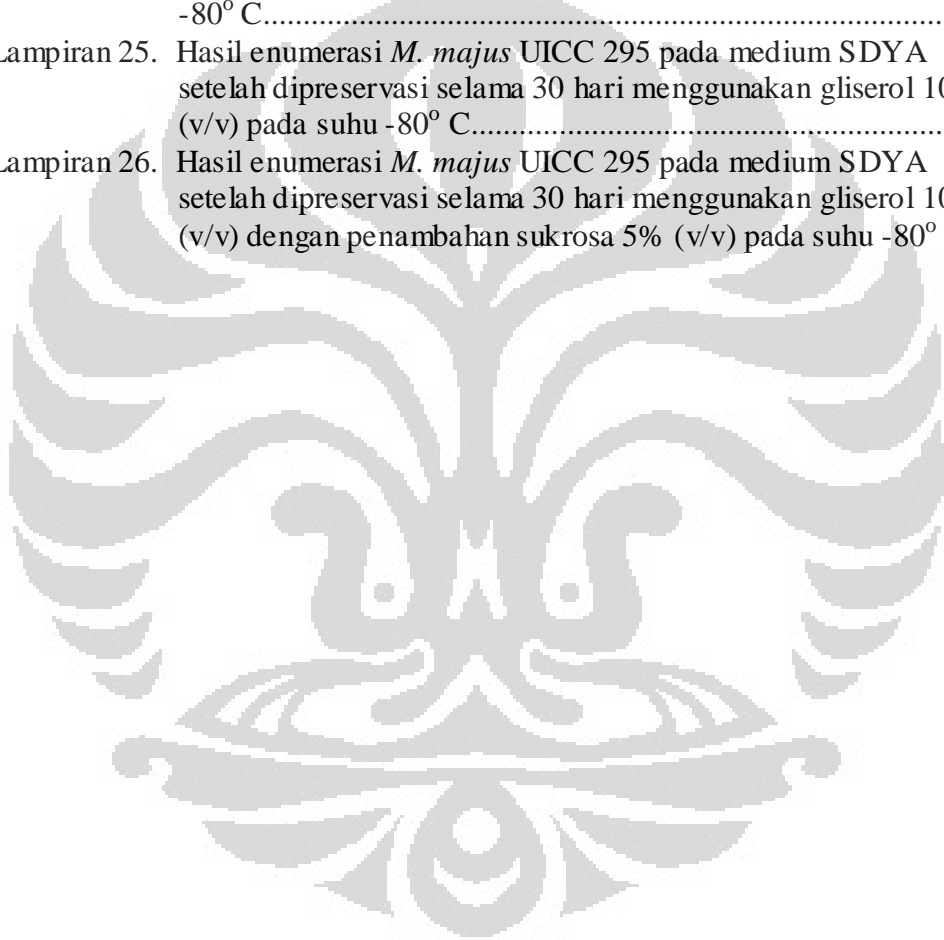
Gambar 4.3.6. Hasil pengujian viabilitas *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) setelah dipreservasi selama satu hari dengan kadaver larva pada suhu -80° C..... 57



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Skema Kerja Penelitian.....	66
Lampiran 2.	Standar Warna Faber Castell.....	67
Lampiran 3.	Skema Kerja Pembuatan Medium SDYA dengan Penambahan Kulit Udang 10%.....	68
Lampiran 4.	Skema Kerja Pemurnian dan Pembuatan <i>Stock Culture</i> dan <i>Working Culture</i> Kapang <i>M. majus</i> UICC 295.....	68
Lampiran 5.	Skema Kerja Pengamatan Morfologi Kapang <i>M. majus</i> UICC 295.....	69
Lampiran 6.	Skema kerja enumerasi konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295.....	69
Lampiran 7.	Skema kerja aplikasi konidia/kapang <i>M. majus</i> UICC 295 pada larva <i>O. rhinoceros</i> dengan aplikasi kontak langsung.....	70
Lampiran 8.	Skema kerja preservasi <i>M. majus</i> UICC 295 pada suhu -80° C...	70
Lampiran 9.	Preservasi <i>M. majus</i> UICC 295 dari kadaver larva <i>O. rhinoceros</i> pada suhu -80° C.....	71
Lampiran 10.	Hasil pengukuran konidia dan hifa <i>M. majus</i> UICC 295 dalam medium SDYA umur 21 hari pada suhu 28° C.....	72
Lampiran 11.	Hasil pengukuran konidia dan hifa <i>M. majus</i> UICC 295 dalam medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5% (b/v) umur 14 hari pada suhu 28° C.....	73
Lampiran 12.	Hasil pengukuran konidia dan hifa <i>M. majus</i> UICC 295 dalam medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) umur 14 hari pada suhu 28° C.....	74
Lampiran 13.	Hasil pengukuran konidia dan hifa <i>M. majus</i> UICC 295 dalam medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 15% (b/v) umur 14 hari pada suhu 28° C.....	75
Lampiran 14.	Hasil uji ANOVA panjang konidia <i>M. majus</i> UICC 295 dalam medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang.....	76
Lampiran 15.	Hasil uji ANOVA lebar konidia <i>M. majus</i> UICC 295 dalam medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang.....	76
Lampiran 16.	Hasil uji ANOVA lebar hifa <i>M. majus</i> UICC 295 dalam medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang.....	76
Lampiran 17.	Hasil uji Tukey lebar hifa <i>M. majus</i> UICC 295 dalam medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang.....	77
Lampiran 18.	Jumlah larva yang mati, kelembaban relatif, dan suhu ruang selama 15 hari pengamatan pada pengujian suspensi konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 dalam medium SDYA.....	78
Lampiran 19.	Jumlah larva mati, kelembaban relatif, dan suhu ruang selama 30 hari pengamatan pada pengujian suspensi konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 dalam SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v).....	79
Lampiran 20.	Berat larva yang masih hidup pada kelompok kontrol (g).....	80

Lampiran 21. Berat larva yang masih hidup setelah aplikasi pada pengujian suspensi konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 dalam medium SDYA (g).....	81
Lampiran 22. Berat larva yang masih hidup setelah aplikasi pada pengujian suspensi konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 dalam medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) (g)...	82
Lampiran 23. Hasil enumerasi <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA setelah dipreservasi selama 30 hari menggunakan akuades pada suhu -80° C.....	83
Lampiran 24. Hasil enumerasi <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) setelah dipreservasi selama 30 hari menggunakan akuades pada suhu -80° C.....	84
Lampiran 25. 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.....	86
Lampiran 26. Hasil enumerasi <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA setelah dipreservasi selama 30 hari menggunakan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan sukrosa 5% (v/v) pada suhu -80° C...	87



BAB 1

PENDAHULUAN

Kapang entomopatogen merupakan kapang yang dapat menginfeksi dan menyebabkan kematian pada serangga (Inglis dkk. 2001: 25--26). Kapang entomopatogen digunakan sebagai agen pengendali serangga hama yang ramah lingkungan dan hanya menyebabkan kematian bagi serangga hama target (Hajek & Delalibera 2010: 147). Beberapa contoh kapang entomopatogen antara lain *Beauveria* Vuillemin, *Entomophthora* Fresenius, *Hirsutella* Patouillard, *Metarhizium* Sorokin, *Nomuraea* Maublanc, dan *Verticillium* Nees (Gullan & Cranston 2010: 430).

Metarhizium merupakan salah satu kapang entomopatogen yang umumnya diisolasi dari tanah (Bischoff dkk. 2009: 512). *Metarhizium* dapat menginfeksi serangga dari ordo *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Homoptera*, *Hemiptera*, dan *Isoptera*. *Metarhizium* menginfeksi serangga dengan melekatkan konidia pada permukaan kutikula inang. Konidia kemudian bergerminasi dan berpenetrasi ke dalam integumen inang dengan membentuk *appressorium* (*germ tube*) (Prayogo dkk. 2005: 20--21). *Metarhizium* kemudian menghasilkan destruksin yang mengakibatkan kematian pada serangga. Setelah serangga inang mengalami kematian, *Metarhizium* muncul ke permukaan tubuh serangga melalui lipatan antarsegmen dan menghasilkan konidia (Bidochka & Small 2005: 30).

Metarhizium majus (Johnst.) J.F. Bisch., Rehner & Humber merupakan salah satu jenis kapang entomopatogen dari genus *Metarhizium* yang sebelumnya dikenal sebagai varian dari *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin, yaitu varian *majus* atau *major*. *Metarhizium majus* memiliki perbedaan dengan *M. anisopliae* berdasarkan morfologi dan analisis filogenetik (Bischoff dkk. 2009: 512, 520, & 525). *Metarhizium anisopliae* dapat tumbuh baik pada suhu 25--30° C dengan kelembaban relatif 60--70° C dan tidak dapat tumbuh dengan baik pada suhu inkubasi 20° C atau di atas 35° C (Bugeme dkk. 2008: 276 & 283). *Metarhizium anisopliae* var. *majus* (Johnst.) Tulloch telah diketahui dapat menginfeksi dan menyebabkan kematian pada larva kumbang badak (*Oryctes rhinoceros* Linnaeus) (Capinera 2008: 2355).

Oryctes rhinoceros Linnaeus (*Coleoptera: Dynastidae*) merupakan serangga hama utama yang menyerang tanaman kelapa sawit (Gopal dkk. 2002: 417). Kelapa sawit merupakan produk pertanian utama kedua di Indonesia setelah padi. Luas lahan perkebunan kelapa sawit mencapai hampir lima juta hektar pada tahun 2007. Indonesia menjadi salah satu eksportir utama minyak sawit, dengan total produksi minyak sawit pada tahun 2008 mencapai lebih dari 18 juta ton (World Growth 2011: 4--5). Serangan hama *O. rhinoceros* terhadap kelapa sawit dapat mengakibatkan penurunan produksi buah sampai 69% dan mematikan tanaman muda hingga 25% (Siregar 2010: 4).

Oryctes rhinoceros memiliki kemampuan merusak yang tinggi, tersebar luas, dan populasinya tinggi sepanjang tahun (Sambiran & Hosang 2007: 2). *Oryctes rhinoceros* dikenal juga sebagai kumbang badak atau kumbang wangwung. Kumbang badak mengebor pucuk tanaman dan merusak bagian daun muda yang belum membuka, sehingga ketika daun terbuka akan terlihat bekas potongan berbentuk segitiga atau huruf V (Pracaya 2009: 193 & 194). Serangan kumbang badak tersebut menghambat pertumbuhan dan jika sampai menyerang titik tumbuh dapat menyebabkan kematian tanaman (Siregar 2010: 3).

Kapang entomopatogen menghasilkan enzim protease, kitinase, dan lipase ketika melakukan penetrasi ke dalam tubuh serangga (Capinera 2008: 2355-2356). Enzim-enzim tersebut berperan penting dalam proses degradasi kutikula (Barreto dkk. 2004: 102). Penambahan substrat yang mengandung kitin pada medium pertumbuhan kapang entomopatogen dapat mengaktifkan enzim kitinase yang dihasilkan oleh kapang tersebut (Herlinda dkk. 2010: 76--77). Kitin didegradasi oleh kapang dengan enzim kitinase dan digunakan sebagai sumber karbon dan nitrogen bagi pertumbuhan kapang tersebut (Matsumoto 2006: 297). Salah satu sumber kitin yang umum digunakan adalah limbah kulit udang (Suresh & Chandrasekaran 1998: 655).

Limbah kulit udang digunakan sebagai sumber utama penghasil kitin karena jumlahnya yang melimpah (Matsumoto 2006: 290). Limbah udang yang dihasilkan dapat mencapai 30--40% dari berat udang utuh (Prasetyaningrum dkk. 2007: 40). Kulit udang tersusun atas protein sebesar 39,7%, kitin sebesar 23,08%, lipid 5,054%, dan mineral CaCO_3 sebesar 21,13% (Suresh & Chandrasekaran

1998: 656). Kitin merupakan polisakarida yang tersusun atas 1,4 N-asetil-D-glukosamin dan banyak tersebar di alam sebagai unsur pokok dari serangga dan cangkang *Crustacea* (Matsumoto 2006: 290, 296--297).

Berdasarkan Sambiran dan Hosang (2007: 4), pengujian kemampuan kapang *M. anisopliae* dalam menginfeksi *O. rhinoceros* dapat diaplikasikan dengan metode kontak langsung. Desyanti dkk. (2007: 75) menyatakan bahwa aplikasi menggunakan metode kontak langsung dapat membuat konidia kapang *M. anisopliae* langsung melekat pada kutikula serangga dan berpenetrasi melalui bagian antar ruas tubuh atau melalui celah alami pada tubuh serangga seperti spirakel.

Fungi perlu dipreservasi untuk menjaga kestabilan karakter morfologi, fisiologi, dan genetika fungi. Metode preservasi fungi secara umum terbagi menjadi dua berdasarkan waktu penyimpanan fungi, yaitu preservasi jangka pendek dan preservasi jangka panjang. Preservasi jangka pendek dilakukan menggunakan metode *continuous growth*, yaitu dengan menyimpan biakan pada suhu 5--20° C dan melakukan pemindahan biakan secara berkala ke dalam medium baru. Preservasi jangka panjang dapat dilakukan menggunakan metode *freezing*. Metode preservasi jangka panjang mampu menjaga kestabilan karakter fungi lebih baik dibandingkan dengan metode preservasi jangka pendek. Metode *freezing* dilakukan dengan menyimpan biakan pada suhu -80° C yang dapat digunakan untuk mempreservasi biakan hingga lima tahun (Nakasone dkk. 2004: 37--38).

Biakan yang dipreservasi menggunakan metode *freezing* dapat mengalami kerusakan akibat pembentukan kristal pada cairan intraseluler dan ekstraseluler. Oleh karena itu, pada biakan yang akan dipreservasi perlu digunakan *cryoprotectant* (Doelle 1994: 60). *Cryoprotectant* merupakan suatu senyawa yang digunakan untuk melindungi dan mencegah sel dari kerusakan selama proses *freezing* (Chian & Quinn 2010: 31). Gliserol merupakan *cryoprotectant* yang berfungsi untuk melindungi bagian dalam sel. Konsentrasi gliserol yang umum digunakan adalah 10%. Selain bagian dalam sel, terdapat bahan yang digunakan untuk melindungi bagian luar sel, seperti sukrosa, laktosa, glukosa, mannitol, sorbitol, dan dekstran (Nakasone dkk. 2004: 37--38, & 41).

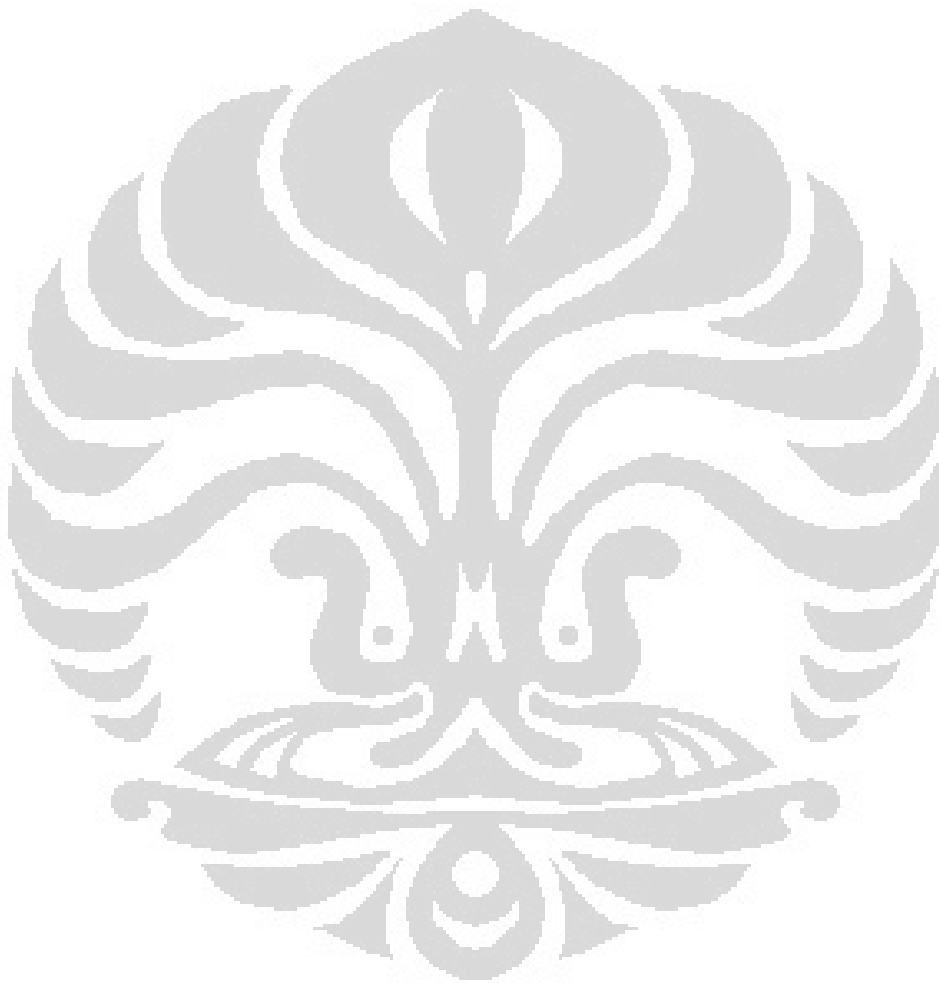
Sukrosa 5% diketahui lebih efektif untuk digunakan sebagai protektan bagi *Lactococcus lactis* dibandingkan dengan gliserol 10% pada suhu -70°C (Hubalek 2003: 211).

Preservasi fungi entomopatogen dapat dilakukan bersama dengan inang fungi tersebut. Jaringan inang digunakan oleh fungi sebagai substrat alami kapang. Hal tersebut dibuktikan pada preservasi fungi *Neozygites fresenii* (Nowak.) Remaud., & Keller yang merupakan fungi patogen terhadap kutu daun. Konidia *N. fresenii* tetap viabel (dapat hidup) setelah dipreservasi bersama dengan kadaver kutu daun (Nakasone dkk. 2004: 40).

Metarhizium majus UICC 295 pada medium SDYA telah terbukti mampu membunuh larva kumbang badak (*O. rhinoceros*) 100% dalam waktu 14 hari setelah aplikasi (Rosadi 2011: 28). Selain itu, limbah kulit udang telah diketahui dapat digunakan sebagai substrat pada medium pertumbuhan kapang entomopatogen (Suresh dan Chandrasekaran 1998: 655). Akan tetapi, belum dilakukan pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan dalam medium SDYA dengan penambahan substrat kulit udang. Belum dilakukan pula pengujian *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan substrat kulit udang dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros*. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan substrat kulit udang, serta pengujian kapang tersebut terhadap larva *O. rhinoceros* untuk melihat kemampuannya. Preservasi menggunakan gliserol 10% dan gliserol 10% dengan sukrosa 5% pada suhu -80°C terhadap kapang *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA yang diberi penambahan substrat kulit udang juga belum dilakukan, sehingga perlu dilakukan preservasi *M. majus* UICC 295 menggunakan gliserol 10% dan gliserol 10% dengan sukrosa 5% pada suhu -80°C .

Hipotesis penelitian adalah *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang memiliki kemampuan dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros*. Selain itu, preservasi *M. majus* UICC 295 menggunakan gliserol 10% dan gliserol 10% dengan sukrosa 5% pada suhu -80°C dapat mempertahankan viabilitas kapang.

Hasil yang diharapkan dari penelitian ini adalah limbah kitin seperti kulit udang dapat dimanfaatkan sebagai substrat pada medium pertumbuhan, sehingga diperoleh medium alternatif bagi kapang *M. majus* UICC 295 yang memiliki kemampuan dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros*. Penggunaan *M. majus* UICC 295 diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai bioinsektisida yang ramah lingkungan dan aman bagi manusia. Selain itu, diharapkan dapat diperoleh metode preservasi yang mampu menjaga viabilitas kapang *M. majus* UICC 295.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 KAPANG ENTOMOPATOGEN

Fungi adalah mikroorganisme eukariotik, tumbuh sebagai sel tunggal (uniseluler) atau multiseluler, memperoleh nutrisi dengan absorpsi, dan melakukan reproduksi seksual dan aseksual (Webster & Weber 2007: 1--2 & 23). Fungi dapat bersifat saprofit atau parasit. Sebagai organisme saprofit, fungi memperoleh nutrisi dari bahan-bahan organik yang berasal dari organisme mati. Fungi parasit menyerap bahan organik dari organisme hidup atau inangnya. Fungi juga dapat berperan sebagai simbiosis, yaitu dapat bersimbiosis dengan organisme lain (Kusnadi dkk. 2003: 201--202).

Berdasarkan ada tidaknya alat reproduksi seksual, fungi dikelompokkan menjadi dua, yaitu anamorf dan teleomorf. Anamorf merupakan fungi yang belum ditemukan alat reproduksi seksualnya, sedangkan teleomorf merupakan fungi yang telah ditemukan alat reproduksi seksualnya (Webster & Weber 2007: 32). Askospora merupakan spora seksual fungi dari filum *Ascomycota*. Askospora dihasilkan di dalam askus. Basidiospora merupakan spora seksual fungi dari filum *Basidiomycota*. Basidiospora terbentuk pada bagian luar basidium dan duduk pada sterigma (Gandjar dkk. 2006: 50 & 52).

Berdasarkan penampakkannya, fungi dikelompokkan menjadi kapang (*moulds* atau *molds*), khamir (*yeasts*), dan cendawan (*mushrooms*) (Gandjar dkk. 2006: 72). Kapang merupakan fungi multiseluler berbentuk koloni yang dibangun oleh suatu struktur dasar yang disebut hifa (Kusnadi dkk. 2003: 206). Hifa merupakan suatu struktur berbentuk tabung menyerupai seuntai benang panjang yang terbentuk dari pertumbuhan spora atau konidia. Kumpulan hifa bercabang-cabang membentuk suatu jala yang disebut miselium (Gandjar dkk. 2006: 10--11).

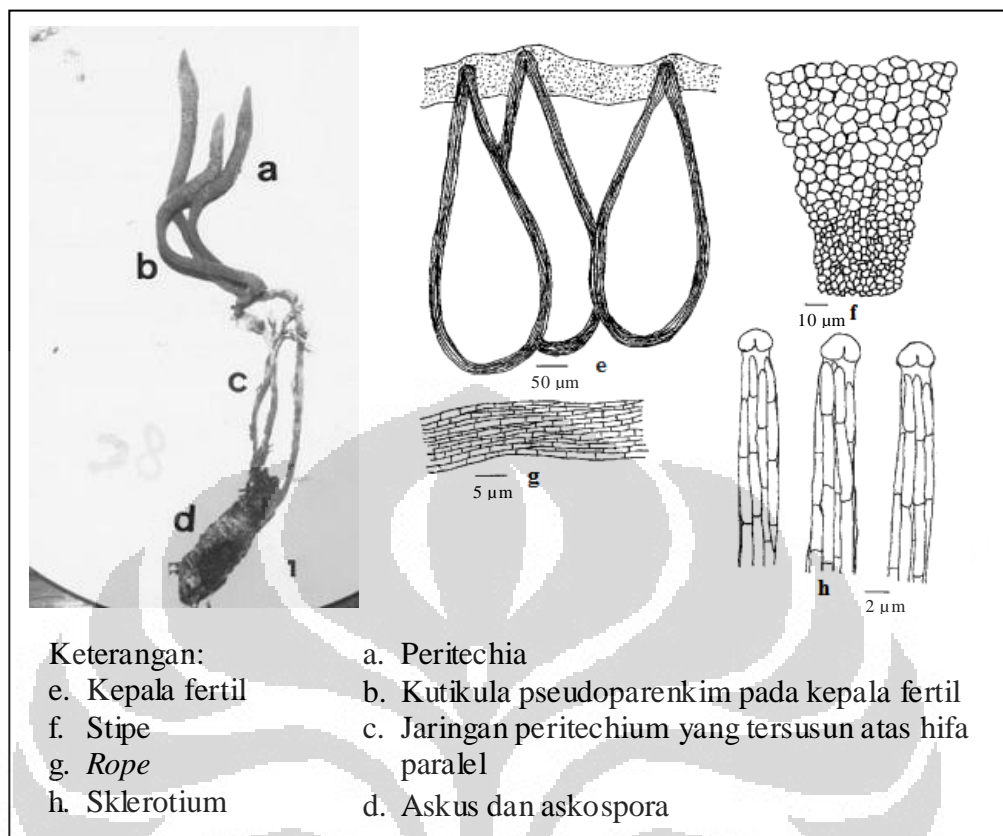
Kapang entomopatogen adalah kapang yang menginfeksi dan menyebabkan kematian pada serangga (Bidochka & Small 2005: 29--30). Contoh kapang entomopatogen antara lain *Beauveria*, *Entomophthora*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, dan *Verticillium* (Gullan & Cranston 2010: 430). Kapang

entomopatogen merupakan salah satu contoh *microbial insecticide*. *Microbial insecticide* merupakan suatu bahan untuk membunuh serangga yang berasal dari mikroorganisme hidup (virus, bakteri, fungi, protozoa, atau nematoda) atau dari toksin yang dihasilkan oleh organisme tersebut. *Microbial insecticide* memiliki kelebihan karena tidak berbahaya bagi manusia, lingkungan, dan serangga atau hewan non-target (Weinzierl & Henn 1991: 1).

Kapang entomopatogen menginfeksi serangga dengan melekatkan konidia pada kutikula serangga (Gullan & Cranston 2010: 430). Konidia tersebut bergerminasi dan membentuk *germ tube*. *Germ tube* berdiferensiasi membentuk *appressorium* dan berpenetrasi ke dalam tubuh serangga. Ketika menembus kutikula serangga, kapang memproduksi enzim-enzim hidrolitik seperti protease, kitinase, dan lipase yang berperan dalam proses degradasi kutikula (Capinera 2008: 2355--2356). Kapang tersebut kemudian membentuk hifa pada tubuh serangga yang mengakibatkan terganggunya fungsi tubuh serangga atau melepaskan toksin yang menyebabkan kematian secara cepat pada serangga (Gullan & Cranston 2010: 430).

2.2 KAPANG *Metarhizium majus*

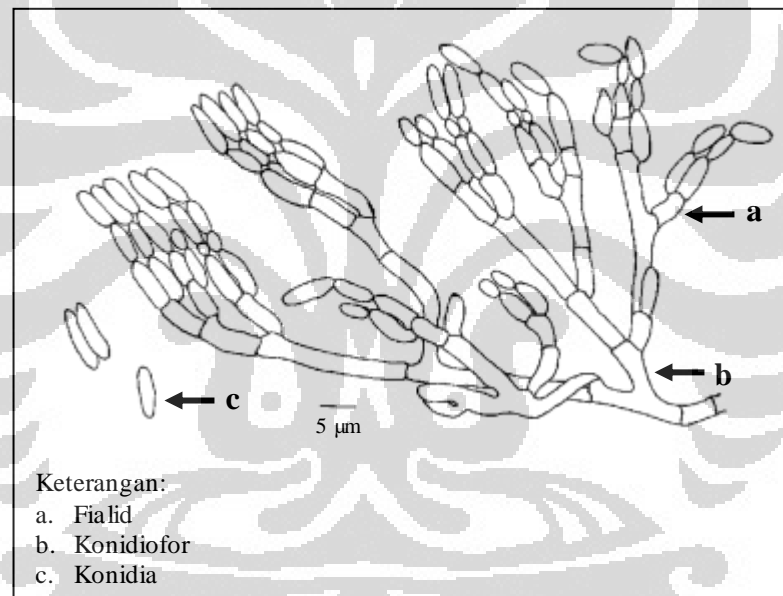
Metarhizium adalah salah satu genus dari kapang entomopatogen anamorf (Bischoff dkk. 2009: 512). *Metarhizium anisopliae* var. *majus* merupakan anamorf dari *Cordyceps brittlebankisoides* Liu, Liang, Whalley, Yao & Liu dan merupakan spesies dari filum *Ascomycota*. *Cordyceps brittlebankisoides* memiliki askus dengan panjang 188--313 μm dan lebar 3--3,2 μm . Askospora tidak berwarna (hialin) dan memiliki panjang 180--300 μm serta lebar 0,94 μm . *Cordyceps brittlebankisoides* ditemukan pada tubuh larva kumbang (*Coleoptera: Scarabaeidae*). Askospora, sklerotia, dan stroma *Cordyceps brittlebankisoides* yang ditumbuhkan dalam medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) pada suhu 23° C selama 14 hari menghasilkan individu kapang yang merupakan anamorf dari *C. brittlebankisoides*, yaitu *M. anisopliae* var. *majus*. Hal tersebut didasarkan pada kesamaan bentuk filialid dan ukuran konidia dengan *M. anisopliae* var. *majus* (Liu dkk. 2001: 179--180).



Gambar 2.2.1. *Cordyceps brittlebankisoides*
[Sumber: Liu dkk. 2001: 180.]

Metarhizium majus memiliki perbedaan dengan *M. anisopliae* berdasarkan morfologi dan analisis filogenetik. *Metarhizium majus* memiliki ukuran konidia lebih besar dibandingkan dengan *M. anisopliae*. *Metarhizium majus* memiliki konidia dengan ukuran (8,5--14,5) x (2,5--5,0) µm, sedangkan *M. anisopliae* memiliki konidia dengan ukuran (5,0--7,0) x (2,0--3,5) µm. Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa *M. majus* berbeda *clade* dengan *M. anisopliae*. Konidia yang dimiliki oleh *Metarhizium majus* berukuran paling besar dibandingkan dengan spesies dari genus *Metarhizium* lainnya, yaitu *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *M. brunneum* Petch., *M. lepidiotae* (Driver & Milner) Bisch., Rehner & Humber, *M. pinghaense* Chen & Guo, *M. robertsii* Bisch., Rehner & Humber, *M. guizhouense* Chen & Guo, *M. acridum* (Driver & Milner) Bisch., Rehner & Humber, dan *M. globosum* Bisch., Rehner & Humber (Bischoff dkk. 2009: 525).

Bischoff dkk. (2009: 516 & 525) menyatakan bahwa koloni *M. majus* berwarna hijau *olive* dan memiliki konidia dengan panjang 8,5--14,5 μm dan lebar 2,5--5 μm . Berdasarkan Rosadi (2011: 26--27), kapang *M. majus* UICC 295 yang berumur 18 hari dalam medium *Sabouraud Dextrose with Yeast Extract Agar* (SDYA) pada suhu 22--25° C memiliki karakter morfologi massa konidia kapang berwarna hijau *olive*, miselium berwarna putih, sebalik koloni tidak berwarna (hialin), tekstur granular, memiliki *growing zone*, dan *exudate drops* yang berwarna kuning kecokelatan, tidak memiliki zonasi, dan tidak memiliki *radial furrow*. Hifa *M. majus* UICC 295 berseptum dan bercabang dengan lebar 1,49--2,47 μm , dan konidia berbentuk silindris dengan panjang 8,26--11,13 μm serta lebar 2,42--3,37 μm .



Gambar 2.2.2. *Metarhizium majus*

[Sumber: Liu dkk. 2001: 181.]

Metarhizium menginfeksi serangga melalui kutikula dan masuk ke dalam *hemocoel* serangga. *Metarhizium* kemudian membentuk blastokonidia yang berbentuk seperti sel khamir dan menghasilkan toksin untuk membunuh serangga. Toksin tersebut merupakan destruksin (Capinera 2008: 2356). Destruksin merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kapang *Metarhizium* (Skrobek dkk. 2008: 362). Destruksin memiliki struktur heksadepsipeptida siklik yang terdiri dari asam α -hidroksil dan residu asam amino, yaitu prolin, isoleusin,

valin, alanin, dan β -alanin. Berdasarkan perbedaan gugus metilnya, destruksin dibedakan menjadi destruksin A, B, B2, C, dan E. Destruksin merupakan toksin neuromuskular yang dapat menginduksi depolarisasi membran otot dengan membuka kanal Ca^{2+} pada otot serangga. Hal tersebut mengakibatkan kelumpuhan pada otot serangga dan kemudian menyebabkan kematian (Male dkk. 2009: 1447--1448).

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

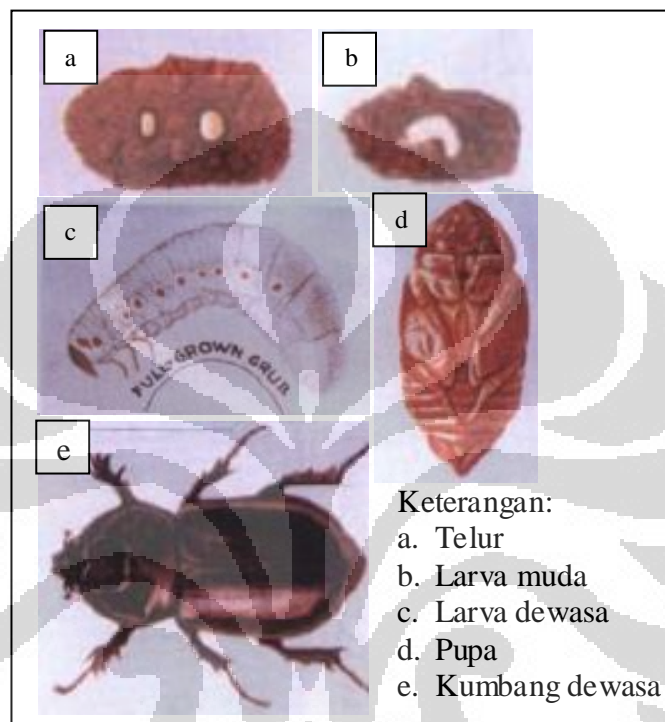
Kingdom : *Eumycota*
 Filum : *Ascomycota*
 Kelas : *Sordariomycetes*
 Ordo : *Hypocreales*
 Suku : *Clavicipitaceae*
 Marga : *Metarhizium*
 Jenis : *Metarhizium majus* (Jonhst) Bisch., Rehner & Humber

2.3 KUMBANG BADAK (*Oryctes rhinoceros*)

Oryctes rhinoceros Linn. (*Coleoptera: Dynastidae*) merupakan salah satu hama yang banyak menimbulkan kerugian pada tanaman kelapa karena memiliki kemampuan merusak yang tinggi, tersebar luas, dan populasinya tinggi sepanjang tahun (Sambiran & Hosang 2007: 2). Kumbang badak dewasa menggerek ke dalam batang dan memakan daun kelapa yang masih terlipat, sehingga mengakibatkan anak daun terlihat seperti digunting menyerupai bentuk kipas setelah daun tersebut membuka (Hochberg & Waage 1991: 515). Apabila titik tumbuh yang terserang, maka pohon kelapa akan mati karena tidak dapat menghasilkan daun (Departemen Pertanian 1993: 4).

Oryctes rhinoceros dewasa berwarna cokelat tua mengilap dengan panjang mencapai 5--6 cm. Kumbang badak betina bertelur di tempat sampah, dedaunan yang telah membusuk, pupuk kandang, serta batang kelapa yang lapuk. Telur *Oryctes rhinoceros* berwarna putih dengan diameter kurang lebih 3 mm. Telur akan menetas setelah 12 hari dan menjadi larva. Larva yang telah menetas

berwarna putih dengan kepala berwarna cokelat sampai cokelat tua dan panjang larva bisa mencapai 10 cm. Periode larva berlangsung sekitar 2--6 bulan, dan kemudian larva akan membentuk pupa. Periode pupa berlangsung selama 2--4 minggu. Warna pupa putih kekuningan dengan panjang 5--9 cm. Pupa kemudian menjadi kumbang dewasa yang dapat berumur 2--7 bulan (Pracaya 2009: 194).



Gambar 2.3. *Oryctes rhinoceros*

[Sumber: Zaid dkk. 2006: 41]

Larva *O. rhinoceros* yang terinfeksi kapang *M. majus* UICC 295 menunjukkan gejala awal perubahan warna menjadi kusam, gerakan larva menjadi lamban, dan timbul bercak cokelat kehitaman. Setelah larva mati, tubuh larva akan mengeras (Rosadi 2011: 31). Prayogo dkk. (2005: 21) menyatakan bahwa semua jaringan dan cairan tubuh pada serangga habis digunakan oleh kapang, sehingga serangga mati dengan tubuh yang mengeras seperti mumi.

Berdasarkan Prayogo dkk. (2005: 23), larva kumbang badak instar I paling rentan terhadap infeksi dari kapang *M. anisopliae*. Hal tersebut disebabkan oleh lapisan integumen larva masih sangat tipis, sehingga kapang mudah untuk melakukan penetrasi. Sambiran dan Hosang (2007: 9) melaporkan bahwa larva *O. rhinoceros* instar I mencapai kematian 100% pada hari ke-10 setelah aplikasi,

hari ke-11 pada larva instar II, dan hari ke-14 pada larva instar III, sedangkan kematian imago *O. rhinoceros* mencapai 61,7--76,7% pada hari ke-20 setelah aplikasi.

Serangga melakukan mekanisme pertahanan tubuh terhadap infeksi kapang. Mekanisme yang dilakukan adalah fagositosis, pembentukan nodul, dan enkapsulasi. Mekanisme tersebut melibatkan hemosit, yaitu sel yang berfungsi untuk memberikan perlindungan terhadap tubuh serangga dari serangan parasit, patogen, dan partikel asing. Fagositosis merupakan mekanisme pertahanan serangga dengan melibatkan hemosit untuk menelan partikel asing. Pembentukan nodul dilakukan apabila *hemocoel* serangga diserang oleh partikel asing yang berjumlah sangat banyak. Nodul merupakan kumpulan hemosit yang memerangkap partikel asing, kemudian nodul akan dikeluarkan dari hemolimfa. Enkapsulasi dilakukan pada partikel asing berukuran besar dan tidak dapat didegradasi melalui mekanisme fagositosis. Enkapsulasi melibatkan banyak hemosit berbentuk pipih yang menyelubungi partikel asing berukuran besar (Capinera 2008: 1937, 1943 & 1946).

Seckbach dan Grube (2010: 301) melaporkan bahwa salah satu mekanisme pertahanan serangga terhadap serangan kapang adalah melanisasi. Melanisasi merupakan proses pengerasan kutikula dan perubahan warna menjadi gelap pada kutikula serangga. Enzim yang berperan dalam proses melanisasi adalah enzim profenol oksidase. Melanin yang terbentuk pada kutikula serangga menghambat aktivitas enzim kitinase yang dihasilkan oleh kapang entomopatogen.

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

Kingdom	: <i>Animalia</i>
Filum	: <i>Arthropoda</i>
Kelas	: <i>Insecta</i>
Ordo	: <i>Coleoptera</i>
Suku	: <i>Dynastidae</i>
Marga	: <i>Oryctes</i>
Jenis	: <i>Oryctes rhinoceros</i> Linnaeus

2.4 MEDIUM DENGAN PENAMBAHAN KULIT UDANG

Mikroorganisme memerlukan medium yang mengandung nutrisi-nutrisi penting dan sesuai untuk pertumbuhan mikroorganisme tersebut. Setiap medium pertumbuhan mikroorganisme mengandung komponen-komponen dasar, yaitu air, karbon (C), glukosa, nitrogen (N), mineral, dan *growth factors* (asam amino atau vitamin) (Benson 2001: 76--77).

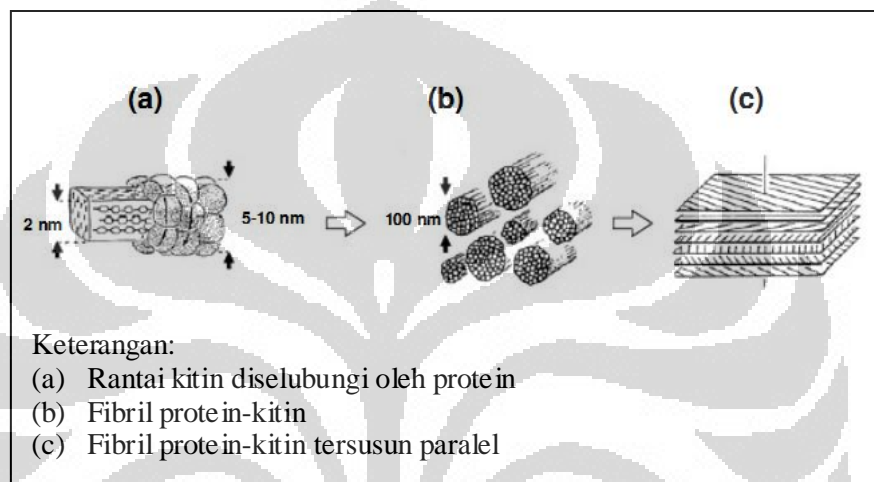
Medium *Sabouraud Dextrose with Yeast Extract Agar* (SDYA) merupakan medium pertumbuhan kapang *M. majus*. Medium SDYA terdiri atas pepton, glukosa, *yeast extract*, dan agar (Bischoff dkk. 2009: 514). Pepton merupakan protein yang dihidrolisis dan berperan sebagai sumber karbon dan nitrogen. Glukosa berperan sebagai sumber karbon. *Yeast extract* berperan sebagai sumber karbon dan nitrogen yang berasal dari asam amino, serta berperan sebagai sumber vitamin. Agar digunakan sebagai *solidifying agent* pada medium (Atlas 2004: 2--5).

Medium pertumbuhan kapang dapat dimodifikasi atau diberi penambahan substrat untuk memperoleh enzim tertentu yang dihasilkan oleh kapang seperti enzim kitinase (Florido dkk. 2009: 356). Penambahan substrat yang mengandung kitin dapat mengaktifkan enzim kitinase pada kapang (Herlinda dkk. 2010: 76--77). Enzim kitinase yang dihasilkan oleh kapang entomopatogen berperan dalam proses degradasi kutikula inang. Selain enzim kitinase, enzim yang dihasilkan kapang ketika penetrasi ke dalam tubuh serangga adalah protease dan lipase (Capinera 2008: 2355--2356).

Kulit udang merupakan salah satu substrat yang umum digunakan untuk memproduksi enzim kitinase (Florido dkk. 2009: 356). Limbah kulit udang digunakan sebagai sumber utama produksi kitin karena jumlahnya yang melimpah. Kulit udang tersusun atas protein sebesar 39,7%, kitin sebesar 23,08%, lipid 5,054%, dan mineral CaCO_3 sebesar 21,13% pada berat kering (Suresh & Chandrasekaran 1998: 656).

Kitin merupakan polisakarida yang tersusun atas 1,4 N-asetil-D-glukosamin. Kitin digunakan oleh mikroorganisme sebagai sumber karbon dan nitrogen bagi pertumbuhannya (Matsumoto 2006: 290, 293, 296, & 297). Karbon

berperan sebagai sumber energi dan akan berikatan dengan unsur lain seperti nitrogen untuk membentuk senyawa penyusun dinding sel kapang (Walker & White 2005: 12). Kitin yang terdapat pada eksoskeleton *Crustacea* tersusun menjadi rantai panjang, diselubungi oleh protein, dan membentuk fibril. Fibril-fibril protein-kitin tersebut tersusun secara paralel dan membentuk kutikula (Einbu 2007: 16). Mineral dalam bentuk kalsit atau kalsium karbonat berada di dalam matriks kitin-protein (Chen *dkk.* 2008: 587--588).



Gambar 2.4. Struktur eksoskeleton *Crustacea*
 [Sumber: Einbu 2007: 16]

Suresh dan Chandrasekaran (1998: 657--659) menggunakan limbah kulit udang sebagai substrat pada medium pertumbuhan *Beauveria bassiana* untuk memperoleh enzim kitinase yang dihasilkan oleh kapang tersebut. Produksi enzim kitinase dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu kandungan air pada medium, suhu inkubasi, pH, ukuran partikel substrat, dan waktu inkubasi. Hasil penelitian menunjukkan produksi kitinase tertinggi (248 unit/gram berat kering) dihasilkan oleh *B. bassiana* yang ditumbuhkan pada medium dengan perbandingan limbah udang dan air sebesar 5:1 dengan ukuran partikel substrat sebesar 425--600 μm , dan pada hari kelima setelah inkubasi pada suhu 27^o C dan pH 9,5.

Taksonomi udang yang digunakan berdasarkan Thorp dan Covich (2010: 942) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Animalia</i>
Filum	: <i>Arthropoda</i>
Kelas	: <i>Crustacea</i>
Ordo	: <i>Decapoda</i>
Suku	: <i>Palaemonidae</i>
Marga	: <i>Macrobrachium</i>
Jenis	: <i>Macrobrachium rosenbergii</i> De Man

2.5 APLIKASI KAPANG PADA SERANGGA

Sambiran dan Hosang (2007: 3) menyatakan bahwa aplikasi menggunakan metode kontak langsung dapat dilakukan untuk menguji kemampuan kapang *M. anisopliae* dalam menginfeksi *O. rhinoceros*. Aplikasi kontak langsung yang digunakan adalah dengan mencelupkan larva dan imago *O. rhinoceros* ke dalam suspensi konidia. Desyanti dkk. (2007: 69) juga menggunakan metode kontak langsung dengan mencelupkan rayap tanah *Coptotermes gestroi* ke dalam suspensi konidia *Metarhizium anisopliae* selama empat detik.

Putra (2009: 46) menggunakan metode kontak langsung untuk menguji kemampuan kapang *M. majus* UICC 295 dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros*. Larva *O. rhinoceros* dapat mencapai kematian 100% pada hari ke-18 setelah aplikasi. Desyanti dkk. (2007: 75) menyatakan bahwa aplikasi menggunakan metode kontak langsung dapat membuat konidia kapang langsung melekat pada kutikula serangga dan berpenetrasi melalui bagian antar ruas tubuh atau melalui celah alami pada tubuh serangga seperti spirakel. Hal tersebut merupakan faktor keberhasilan aplikasi menggunakan metode kontak langsung.

2.6 PRESERVASI KAPANG

Preservasi jangka pendek dilakukan dengan metode *continuous growth*, yaitu dengan menyimpan biakan pada suhu 5--20° C dan melakukan pemindahan biakan secara berkala ke dalam medium baru. Preservasi jangka panjang dapat

dilakukan menggunakan metode *freezing*. Metode preservasi jangka panjang mampu menjaga kestabilan karakter fungi lebih baik dibandingkan dengan metode preservasi jangka pendek. Metode *freezing* dilakukan dengan menyimpan biakan pada suhu -80°C yang dapat digunakan untuk mempreservasi biakan hingga waktu lima tahun (Nakasone dkk. 2004: 37--38).

Preservasi fungi merupakan suatu kegiatan pemeliharaan yang dilakukan untuk menjaga kestabilan karakter morfologi, fisiologi, dan genetika fungi. Secara umum preservasi dibagi menjadi dua, yaitu preservasi jangka pendek dan preservasi jangka panjang. Contoh metode preservasi jangka pendek adalah metode *continuous growth*, yaitu penyimpanan biakan dalam medium agar pada suhu $5\text{--}20^{\circ}\text{C}$ dan biakan dipindahkan secara berkala ke dalam medium baru. Preservasi jangka pendek digunakan untuk penyimpanan biakan hingga waktu satu tahun. Metode preservasi jangka pendek memiliki keuntungan karena mudah dilakukan, murah, dan dapat digunakan untuk berbagai jenis fungi. Akan tetapi, metode preservasi jangka pendek memiliki kekurangan, yaitu biakan dapat terkontaminasi oleh mikroorganisme lain, sehingga biakan harus diperiksa secara rutin. Selain itu, karakter morfologi dan fisiologi fungi dapat berubah, sehingga dapat menyebabkan kemampuan fungi dalam bersporulasi atau menginfeksi inang akan berkurang (Nakasone dkk. 2004: 38).

Preservasi jangka panjang dapat digunakan untuk menyimpan biakan selama bertahun-tahun. Beberapa contoh metode preservasi jangka panjang adalah *oil overlay*, *silica gel*, *liquid nitrogen*, dan *freezing*. Metode *freezing* dilakukan dengan menyimpan biakan pada suhu -20°C dan -80°C . Penyimpanan pada suhu -80°C dapat digunakan untuk mempreservasi biakan hingga waktu lima tahun. Metode *freezing* baik untuk diaplikasikan pada fungi. Fungi yang ditumbuhkan pada berbagai substrat seperti biji-bijian, agar, dan tumbuhan dapat dipreservasi menggunakan metode *freezing*. Biakan yang akan dipreservasi dengan metode *freezing* dimasukkan ke dalam *cryotube* yang mengandung gliserol 10% dalam air (Nakasone dkk. 2004: 37--38, & 41).

Preservasi fungi menggunakan metode *freezing* mampu menurunkan kecepatan metabolisme fungi. Akan tetapi, sel hidup yang dipreservasi menggunakan metode *freezing* dapat mengalami kerusakan. Hal tersebut

disebabkan oleh pembentukan kristal pada cairan intraseluler dan ekstraseluler pada suhu rendah. Oleh karena itu, digunakan *cryoprotectant* untuk melindungi sel yang dipreservasi (Doelle 1994: 60). *Cryoprotectant* terdiri atas dua tipe, yaitu *penetrating agent* dan *non-penetrating agent*. *Penetrating agent* merupakan bahan pelindung yang dapat masuk melalui membran sel dan melindungi bagian intraseluler serta ekstraseluler, seperti gliserol dan *dimethyl sulfoxide* (DMSO) (Nakasone dkk. 2004: 41). *Penetrating agent* dapat berikatan dengan air di dalam sel untuk mencegah dehidrasi sel yang berlebihan dan dapat menstimulasi pembentukan kristal es yang halus, sehingga tidak merusak membran sel (Hubalek 2003: 218). Konsentrasi gliserol yang umum digunakan adalah 5--10% (Doelle 1994: 60). *Non-penetrating agent* merupakan bahan pelindung yang berfungsi untuk melindungi sel pada bagian luar membran dengan meningkatkan kekentalan larutan untuk mencegah pembentukan kristal es (Hubalek 2003: 220). *Non-penetrating agent* juga berperan dalam proses *thawing* untuk mencegah *osmotic shock*. *Osmotic shock* terjadi ketika tekanan osmotik pada bagian intraseluler lebih tinggi dibandingkan dengan bagian ekstraseluler. Perbedaan tekanan osmotik dapat mengakibatkan dehidrasi pada sel (Chian & Quinn 2010: 28). Bahan yang digunakan sebagai *non-penetrating* antara lain sukrosa, laktosa, glukosa, mannitol, sorbitol, dan dekstran (Nakasone dkk. 2004: 41).

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

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

3.2 ALAT DAN BAHAN

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah kompor listrik [Sanyo], pemanas air [SHARP], autoklaf [Hirayama], oven [Heraeus], timbangan digital [AND EW-300 G], timbangan analitik [Sartorius], lemari pendingin [GASSIO], *transfer box*, mikroskop [Euromex], mikroskop trinokular [Carl ZEISS], jangka sorong digital [Digital Caliper], vorteks [Maxi Mix II Type 37600], blender [PHILIPS], ayakan 600 mesh, mangkuk plastik kotak berukuran 14,5 cm x 9,5 cm x 6 cm dengan tutup, *tips*, mikropipet [Gilson], *waterbath* [GRANT -Y6], *deep freezer* [Sanyo], *cryotube* [BIOLOGIX], hemositometer [Improved-Neubauer], erlenmeyer, gelas *beaker*, gelas ukur, pipet tetes, batang pengaduk, cawan petri, tabung reaksi, jarum tanam tajam, botol alkohol, pembakar spiritus, spatula, *object glass*, dan *cover glass*.

3.2.2 Bahan

3.2.2.1 Mikroorganisme

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

3.2.2.2 Larva *Oryctes rhinoceros*

Larva *Oryctes rhinoceros* yang digunakan diperoleh dari Desa Rajagaluh, Kabupaten Majalengka, Jawa Barat. Larva diidentifikasi oleh Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong.

3.2.2.3 Medium

Medium yang digunakan untuk pemurnian, pertumbuhan, dan pemeliharaan adalah *Sabouraud Dextrose with Yeast Extract Agar* (SDYA) dan SDYA dengan penambahan kulit udang.

3.2.2.4 Limbah kulit udang

Limbah kulit udang yang digunakan sebagai substrat merupakan udang galah yang diperoleh dari limbah Gubuk Makan Mang Engking, Universitas Indonesia, Depok.

3.2.2.5 Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah dekstrosa [Conda], *yeast extract* [BD], pepton [Merck], agar [Britania], antibiotik tetrasiklin [Kimia Farma],

kloramfenikol [Wako], gliserol p.a. 92,1% [Merck], triton X-100 [BDH], alkohol 70% teknis, etanol p.a. 96%, *lactophenol cotton blue*, dan aseton teknis.

3.2.2.6 Bahan habis pakai

Bahan habis pakai yang digunakan adalah kertas *yellow pages*, plastik tahan panas, tisu gulung, masker, dan karet gelang.

3.3 CARA KERJA

Skema kerja dapat dilihat pada Lampiran 1.

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

Pembuatan medium SDYA berdasarkan Desyanti dkk. (2007: 69) dilakukan dengan melarutkan dekstrosa sebanyak 10 g, *yeast extract* 2,5 g, pepton 2,5 g, dan agar 20 g ke dalam akuades steril hingga mencapai volume total satu liter. Medium kemudian dipanaskan hingga larut. Medium ditambahkan antibiotik kloramfenikol sebanyak 200 mg yang dilarutkan dalam satu ml etanol 96% p.a. Medium disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium kemudian dituang secara aseptis ke dalam cawan petri dengan volume masing-masing 20 ml, kemudian dibiarkan mengeras.

Pembuatan medium SDYA miring dilakukan dengan melarutkan dekstrosa sebanyak 10 g, *yeast extract* 2,5 g, pepton 2,5 g, dan agar 20 g ke dalam akuades steril hingga mencapai volume total satu liter. Medium dipanaskan hingga mendidih. Medium kemudian ditambahkan antibiotik kloramfenikol sebanyak 200 mg yang dilarutkan dalam satu ml etanol 96% p.a. Medium dipindahkan ke dalam tabung reaksi dengan volume masing-masing 6 ml. Medium kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium steril dalam tabung reaksi diletakkan pada papan yang dimiringkan dan dibiarkan mengeras.

3.3.2 Pembuatan tepung kulit udang

Pembuatan tepung kulit udang berdasarkan Suresh dan Chandrasekaran (1998: 656) dilakukan dengan mengeringkan kulit udang menggunakan oven 50° C selama tiga jam atau hingga diperoleh berat yang stabil. Kulit udang kering kemudian dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan 600 µm.

3.3.3 Pembuatan medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang

Pembuatan medium dengan penambahan tepung kulit udang dilakukan berdasarkan Suresh dan Chandrasekaran (1998: 656). Medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5% (b/v) dibuat dengan melarutkan dektrosa 9,5 g, pepton 2,375 g, *yeast extract* 2,375 g, agar 19 g, dan tepung kulit udang sebanyak 50 g ke dalam akuades hingga volume total satu liter. Medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) dibuat dengan melarutkan dektrosa 9 g, pepton 2,25 g, *yeast extract* 2,25 g, agar 18 g, dan tepung kulit udang sebanyak 100 g dalam akuades hingga volume total satu liter. Medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 15% (b/v) dibuat dengan melarutkan dektrosa 8,5 g, pepton 2,125 g, *yeast extract* 2,125 g, agar 17 g, dan tepung kulit udang sebanyak 150 g dalam akuades hingga volume total satu liter. Medium kemudian dipanaskan hingga mendidih. Medium didinginkan kemudian ditambahkan 200 mg/L kloramfenikol yang telah dilarutkan dalam satu ml etanol 96% p.a. Medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C, tekanan dua atm selama 15 menit. Medium kemudian dituang ke dalam cawan petri steril dengan volume masing-masing 20 ml.

3.3.4 Pemeliharaan dan penyimpanan isolat kapang

Pemeliharaan dan penyimpanan kapang dilakukan berdasarkan Hogg (2005: 89). Koloni kapang disimpan dan dipelihara di dalam medium SDYA

miring sebagai *stock culture* dan *working culture*. *Stock culture* dan *working culture* dibuat dengan menggosokkan isolat kapang secara vertikal dari bagian bawah hingga atas medium. *Stock culture* yang telah tumbuh disimpan di dalam lemari pendingin dengan suhu 4° C, sedangkan *working culture* disimpan pada suhu 22--25° C dengan kondisi gelap. *Working culture* kemudian digunakan dalam pengerjaan penelitian.

3.3.5 Pengamatan morfologi kapang

Pengamatan morfologi kapang dilakukan secara makroskopik dan mikroskopik berdasarkan Tzean dkk. (1997: 150). Kapang ditumbuhkan menggunakan metode *stab* pada tiga titik dalam medium SDYA dan SDYA dengan penambahan kulit udang. Hal-hal yang diamati pada pengamatan morfologi kapang secara makroskopik adalah warna koloni, warna sebalik koloni, tekstur koloni, *radial furrow*, zonasi, *exudate drops*, dan *growing zone*. Warna koloni diamati berdasarkan standar warna Faber Castell (Lampiran 2). Diameter koloni diukur pada tiga koloni yang tumbuh dan diambil rata-rata dari tiga kali pengukuran.

Hal-hal yang diamati pada pengamatan morfologi kapang secara mikroskopik adalah tipe hifa, ukuran hifa, bentuk konidia, dan ukuran konidia. Pengukuran hifa dan konidia dilakukan berdasarkan waktu koloni kapang untuk bersporulasi penuh. Pengukuran hifa dan konidia kapang dilakukan dengan membuat preparat dari biakan. Biakan yang diletakkan pada gelas objek ditetaskan *lactophenol cotton blue* dan diamati pada mikroskop trinokular dengan perbesaran 400x.

3.3.6 Enumerasi konidia/hifa kapang

Enumerasi konidia kapang menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) berdasarkan Madigan dkk. (2012: 129). Biakan kapang yang telah bersporulasi penuh pada medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan kulit udang dalam tabung reaksi dibuat suspensi dengan menambahkan 5 ml

akuades steril. Biakan dikerik menggunakan jarum tanam bulat (ose) kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks. Suspensi diencerkan dengan akuades steril hingga pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , dan 10^{-6} . Sebanyak 0,1 ml suspensi konidia dari masing-masing pengenceran diambil menggunakan mikropipet. Suspensi tersebut disebarkan pada permukaan medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang dalam cawan petri dengan tiga pengulangan pada masing-masing pengenceran. Suspensi diratakan pada medium menggunakan spatel *Drygalski*. Biakan diinkubasi selama tujuh hari pada suhu 28° C pada kondisi gelap.

Penghitungan koloni dilakukan setiap hari hingga hari ke-7. Berdasarkan Hogg (2005: 93), koloni yang dapat dihitung adalah koloni pada medium yang berjumlah 30--300 koloni. Jumlah CFU/ml sampel dihitung berdasarkan Gandjar dkk. (1992: 40) dengan rumus:

$$\text{Jumlah CFU/ml} = \frac{\text{Jumlah rata-rata koloni}}{\text{volume pengenceran} \times \text{faktor pengenceran}}$$

Penghitungan jumlah konidia menggunakan hemositometer dilakukan berdasarkan Herlinda dkk. (2006: 71). Biakan kapang yang telah bersporulasi penuh pada medium SDYA miring dan medium SDYA miring dengan penambahan tepung cangkang kepiting dibuat suspensi dengan menambahkan lima ml akuades dan dikerik menggunakan jarum tanam bulat (ose). Suspensi kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks. Satu ml suspensi diambil menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam hemositometer. Jumlah konidia kapang dihitung secara langsung menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10 x 40. Jumlah konidia/ml dihitung berdasarkan Herlinda dkk. (2006:71) dengan rumus:

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

Keterangan: Jumlah kotak = 5 kotak besar x 16 kotak kecil
 0,25 = Faktor koreksi penggunaan kotak sampel skala kecil pada hemositometer

3.3.7 Persiapan larva untuk pengujian

Larva *Oryctes rhinoceros* beserta pakan ditempatkan di dalam mangkuk plastik berdiameter alas 9 cm dan tinggi 6,3 cm dengan tutup yang diberi lubang sebagai tempat pertukaran udara. Larva dipelihara di dalam ruangan dengan kondisi gelap, suhu berkisar 27--28° C, dan kelembaban 74--91%. Pakan diberikan setiap tiga hari, yaitu sebanyak 10 g pakan larva.

Larva dikelompokkan berdasarkan berat awal tubuh larva agar pada masing-masing kelompok memiliki berat yang seragam. Larva dikelompokkan menjadi 6 kelompok perlakuan (3 kelompok perlakuan diinokulasikan *M. majus* UICC 295 dari medium SDYA dan 3 kelompok perlakuan lain diinokulasikan *M. majus* UICC 295 dari medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v)) serta 3 kelompok kontrol. Setiap kelompok terdiri atas 10 ekor larva dengan berat yang hampir seragam.

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

Sebanyak 50 µl triton X-100 (98--100%) ditambahkan akuades hingga volume mencapai 100 ml, kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks. Larutan triton X-100 0,05% tersebut kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi, masing-masing sebanyak 5 ml. Larutan tersebut kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

3.3.9 Pengujian konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada larva *O. rhinoceros* dengan metode kontak langsung

Kapang *M. majus* UICC 295 yang akan diuji pada larva *O. rhinoceros* ditanam pada medium miring SDYA dan medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v). Kapang diinokulasikan sebanyak 15 gores pada permukaan medium dan diinkubasi hingga bersporulasi penuh. Biakan kemudian dibuat suspensi dengan menambahkan 5 ml triton X-100 0,05% steril, kemudian

dikerik menggunakan jarum tanam bulat (ose) dan dihomogenkan dengan vorteks. Sebanyak 1 ml suspensi diambil menggunakan mikropipet dan diinokulasikan pada permukaan tubuh larva. Tiga kelompok larva dengan jumlah masing-masing sepuluh ekor larva pada masing-masing kelompok diaplikasikan dengan suspensi kapang *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v). Tiga kelompok larva lain dengan jumlah masing-masing sepuluh ekor larva pada masing-masing kelompok diaplikasikan dengan suspensi kapang *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA. Tiga kelompok larva lain dengan jumlah masing-masing sepuluh ekor larva diinokulasikan dengan 1 ml larutan triton X-100 0,05% steril dan dijadikan sebagai kontrol. Perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali berturut-turut selama tiga hari.

Parameter yang dihitung adalah jumlah larva yang mati dan berat larva yang masih hidup setelah perlakuan selama 15 hari. Penghitungan jumlah larva yang mati dilakukan setiap hari, sedangkan penghitungan berat larva dilakukan setiap tiga hari. Parameter lingkungan yang diukur adalah kelembaban dan suhu ruang. Kemampuan kapang *M. majus* UICC 295 dalam membunuh larva *O. rhinoceros* akan terlihat bila terdapat larva yang mengalami kematian setelah diaplikasikan oleh suspensi kapang tersebut.

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 larva yang diperoleh kemudian dikoreksi menggunakan rumus Abbotts's berdasarkan Hasyim dkk. (2005: 119), yaitu:

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

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

Pembuatan larutan gliserol 10% (v/v) dilakukan berdasarkan Murjito (2010: 22). Pembuatan larutan gliserol 10% (v/v) dilakukan dengan memasukkan 10,86 ml larutan gliserol 92,1% (v/v) dan ditambahkan akuades hingga volume mencapai 100 ml. Larutan dipindahkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml. Larutan tersebut kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Pembuatan larutan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan sukrosa 5% (b/v) dilakukan berdasarkan Murjito (2010: 22). Sebanyak 21,7 ml gliserol 92,1% (v/v) ditambahkan akuades hingga volume 100 ml, sehingga diperoleh larutan *stock* gliserol 20% (v/v). Sebanyak 10 g sukrosa ditambahkan akuades hingga volume mencapai 100 ml, sehingga diperoleh larutan *stock* sukrosa 10% (v/v). Larutan tersebut disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Kedua larutan kemudian dicampur ke dalam erlenmeyer hingga diperoleh volume total 200 ml.

Kapang *M. majus* UICC 295 diinokulasi dengan metode *streak* sebanyak 15 gores pada medium miring SDYA dengan penambahan kulit udang. Kapang *M. majus* UICC 295 disimpan pada suhu $22\text{--}25^{\circ}\text{C}$ dengan kondisi gelap hingga bersporulasi penuh. Preservasi dilakukan dengan menambahkan masing-masing 5 ml larutan gliserol 10% dan gliserol 10% dengan penambahan sukrosa 5% ke dalam biakan kapang *M. majus* UICC 295. Biakan kapang dikerik menggunakan jarum tanam bulat (ose). Sebanyak 1 ml suspensi dimasukkan ke dalam *cryotube* dan diinkubasi dalam lemari pendingin pada suhu 4°C selama satu jam, kemudian diinkubasi selama 30 hari dalam *deep freezer* dengan suhu -80°C .

Preservasi *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva *Oryctes rhinoceros* dilakukan dengan memasukkan potongan jaringan larva *O. rhinoceros* yang mati karena terinfeksi *M. majus* UICC 295 masing-masing ke dalam *cryotube* yang berisi gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan sukrosa 5% (b/v) sebanyak 5 ml. *Cryotube* diinkubasi dalam lemari pendingin pada suhu 4°C

selama satu jam, kemudian diinkubasi selama 24 jam di dalam *deep freezer* dengan suhu -80°C .

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

Pengujian viabilitas konidia kapang *M. majus* UICC 295 setelah preservasi dilakukan berdasarkan Madigan dkk. (2012: 129). Enumerasi dilakukan pada hari ke-0 preservasi sebagai penghitungan jumlah konidia awal, serta pada hari ke-1, ke-14, dan ke-30 setelah preservasi. Proses *thawing* biakan *M. majus* UICC 295 yang telah dipreservasi dilakukan dengan meletakkan *cryotube* berisi biakan pada *waterbath* dengan suhu 37°C selama satu menit hingga larutan protektan mencair.

Enumerasi dilakukan pada suspensi tanpa pengenceran serta pada suspensi yang diencerkan dengan pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5} . Sebanyak 0,1 ml konidia/hifa kapang dari setiap protektan masing-masing disebarkan pada permukaan medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% dalam cawan petri, kemudian diratakan menggunakan spatel *Drygalski*. Biakan diinkubasi selama tujuh hari pada suhu 28°C pada kondisi gelap.

Penghitungan koloni dilakukan setiap hari hingga hari ke-7. Berdasarkan Hogg (2005: 93), koloni yang dapat dihitung adalah koloni pada medium yang berjumlah 30--300 koloni. Jumlah CFU/ml sampel dihitung berdasarkan Gandjar dkk. (1992: 40) dengan rumus:

$$\text{Jumlah CFU/ml} = \frac{\text{Jumlah rata-rata koloni}}{\text{volume pengenceran} \times \text{faktor pengenceran}}$$

Pengujian viabilitas *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva *O. rhinoceros* dilakukan dengan meletakkan potongan jaringan larva di atas permukaan medium SDYA dan diinkubasi selama tujuh hari pada suhu 28°C dengan kondisi gelap. Pengujian viabilitas dilakukan pada hari ke-0 preservasi sebagai pengujian viabilitas awal, serta pada hari ke-1 setelah preservasi. Proses

thawing kadaver larva *O. rhinoceros* yang telah dipreservasi dilakukan dengan meletakkan *cryotube* berisi potongan tubuh larva pada *waterbath* dengan suhu 37° C selama satu menit hingga larutan protektan mencair. Morfologi kapang *M. majus* UICC 295 diamati secara mikroskopik untuk melihat konidia dan hifa kapang tersebut.

3.3.12 Pengolahan dan analisis data

Data yang diperoleh disusun dalam bentuk tabel dan gambar. Data yang diperoleh meliputi data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif meliputi data pengamatan morfologi secara makroskopik kapang *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung kulit udang, serta data pengamatan viabilitas *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva *O. rhinoceros* setelah preservasi. Data kuantitatif meliputi data pengamatan morfologi secara mikroskopik kapang *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA, data pengamatan morfologi secara mikroskopik kapang *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang, data hasil enumerasi konidia kapang *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA, data hasil enumerasi konidia kapang *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang, jumlah larva yang mati, berat larva yang masih hidup setelah aplikasi, dan hasil enumerasi konidia kapang *M. majus* UICC 295 setelah preservasi pada larutan gliserol 10% (v/v) serta pada larutan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan sukrosa 5% (b/v).

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 PENGARUH PENAMBAHAN TEPUNG KULIT UDANG PADA MEDIUM PERTUMBUHAN TERHADAP KARAKTER MORFOLOGI *Metarhizium majus* UICC 295

Metarhizium majus UICC 295 ditumbuhkan pada medium SDYA (*Sabouraud Dextrose with Yeast Extract Agar*) yang diberi penambahan tepung kulit udang. Tepung kulit udang berasal dari kulit udang yang dikeringkan dan dihaluskan menjadi partikel-partikel kecil (Gambar 4.1.1). Kulit udang yang digunakan merupakan limbah rumah makan yang kemudian dimanfaatkan sebagai medium bagi *M. majus* UICC 295. *Metarhizium majus* UICC 295 dapat tumbuh pada SDYA dengan penambahan tepung kulit udang. Hal tersebut menunjukkan bahwa medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang dapat menjadi medium pertumbuhan alternatif bagi *M. majus* UICC 295. Selain itu, penggunaan kulit udang pada medium pertumbuhan *M. majus* UICC 295 dapat menjadi salah satu solusi pemanfaatan limbah kulit udang di rumah makan.

Partikel tepung kulit udang yang digunakan dalam penelitian berukuran 600 μm . Ukuran partikel tepung kulit udang yang semakin kecil akan memperbesar luas permukaan partikel yang dapat didegradasi oleh kapang dengan menghasilkan enzim hidrolitik, sehingga semakin besar hasil penguraian substrat tersebut yang dapat digunakan untuk pertumbuhan kapang. Berdasarkan Suresh dan Chandrasekaran (1998: 658), ukuran partikel tepung kulit udang memengaruhi kemampuan kapang *Beauveria bassiana* dalam menggunakan substrat. Hal tersebut dilihat dari produksi enzim kitinase yang dihasilkan oleh kapang *B. bassiana*. *Beauveria bassiana* yang ditumbuhkan pada medium dengan penambahan tepung kulit udang berukuran 425--600 μm menghasilkan produksi enzim kitinase tertinggi dibandingkan ketika diberi penambahan tepung kulit udang dengan partikel yang berukuran lebih besar (1000--1400 μm).

Medium SDYA merupakan medium artifisial yang terdiri atas pepton, glukosa, *yeast extract*, dan agar. Tepung kulit udang tersusun atas protein, kitin, lipid, dan mineral CaCO_3 . Kitin yang terdapat pada kulit udang membentuk suatu rantai panjang dan berikatan dengan protein membentuk matriks kitin-protein. Pepton berperan sebagai sumber karbon dan nitrogen, glukosa berperan sebagai sumber karbon, dan *yeast extract* berperan sebagai sumber asam amino. Karbon dan nitrogen merupakan makronutrien dan dimetabolisme oleh kapang untuk sintesis karbohidrat, protein, lipid, dan asam nukleat. Senyawa-senyawa tersebut digunakan untuk membentuk struktur dinding sel kapang. Hifa dan konidia yang terbentuk, serta penambahan ukuran koloni kapang memperlihatkan adanya pertumbuhan pada kapang. Berdasarkan Walker dan White (2011: 12), karbon akan berikatan dengan unsur-unsur lain, seperti hidrogen, oksigen, dan nitrogen untuk membentuk senyawa penyusun dinding sel kapang, yaitu glukukan dan kitin. Deacon (2006: 101) menyatakan bahwa nitrogen merupakan unsur penting dalam pembentukan fialid. Fialid akan membentuk konidia jika terdapat nitrogen dan glukosa di dalam medium.



Gambar 4.1.1. Hasil pembuatan tepung kulit udang untuk medium pertumbuhan *M. majus* UICC 295

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Faktor lingkungan seperti pH, suhu inkubasi, kelembaban, dan radiasi sinar matahari berpengaruh terhadap pertumbuhan kapang *M. majus* UICC 295. Medium SDYA memiliki pH 6, sedangkan medium SDYA dengan penambahan

tepung kulit udang memiliki pH 8. *Metarhizium majus* UICC 295 diinkubasi pada ruang inkubasi dengan suhu 28° C dan kelembaban 64%. pH medium, suhu, dan kelembaban tersebut merupakan kondisi lingkungan yang mendukung pertumbuhan *M. majus* UICC 295. *Metarhizium majus* UICC 295 diinkubasi pada kondisi gelap. Hal tersebut disebabkan *M. majus* UICC 295 tidak dapat tumbuh baik ketika diinkubasi pada kondisi terang (terkena cahaya matahari). Matsumoto (2006: 297) menyatakan bahwa *M. anisopliae* dapat tumbuh pada lingkungan dengan kisaran pH 2,5--10,5. Berdasarkan Bugeme dkk. (2008: 276 & 283), *M. anisopliae* dapat tumbuh baik pada suhu 25--30° C dengan kelembaban relatif 60--70%. Kapang tersebut tidak tumbuh baik pada suhu inkubasi 20° C atau di atas 35° C. Berdasarkan Leland (2001:6), sinar ultraviolet yang berasal dari cahaya matahari menyebabkan kerusakan protein dan asam nukleat akibat radiasi ultraviolet yang berdampak pada kerusakan DNA. Kerusakan pada DNA menyebabkan terganggunya proses replikasi DNA. Hal tersebut menyebabkan germinasi konidia *Metarhizium* spp. menjadi terhambat atau konidia tidak dapat bergerminasi.

Deskripsi koloni dilakukan terhadap *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium *Sabouraud Dextrose with Yeast Extract Agar* (SDYA) dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang. Deskripsi koloni *M. majus* UICC 295 berumur 18 hari pada medium SDYA dengan suhu inkubasi 28° C pada kondisi gelap adalah sebagai berikut, koloni berwarna *olive green* (berdasarkan standar warna Faber Castell), sebalik koloni tidak berwarna atau hialin, bertekstur granular, menghasilkan *exudate drops* berwarna kuning kecokelatan, memiliki zonasi, *radial furrow*, dan *growing zone* (Tabel 4.1.1 dan Gambar 4.1.2). Deskripsi koloni juga dilakukan pada *M. majus* UICC 295 berumur sepuluh hari yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) pada suhu 28° C dengan kondisi gelap. Hasil pengamatan koloni menunjukkan kapang memiliki warna koloni *sea green* (berdasarkan standar warna Faber Castell) dan sebalik koloni tidak berwarna atau hialin. Koloni kapang bertekstur *granular*, menghasilkan *exudate drops* berwarna kuning kecokelatan, serta memiliki *growing zone* dan *radial furrow*. Zonasi dimiliki oleh *M. majus* UICC 295 pada

medium SDYA dengan penambahan kulit udang 10% (b/v) dan 15% (b/v), sedangkan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan kulit udang 5% (b/v) tidak memiliki zonasi (Tabel 4.1.1).

Metarhizium majus UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) menghasilkan konidia yang lebih rapat dibandingkan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA (Gambar 4.1.2). Selain itu, *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang mencapai *full sporulation* lebih cepat 11 hari dibandingkan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian tepung kulit udang pada medium SDYA menghasilkan pertumbuhan yang lebih baik pada *M. majus* UICC 295.

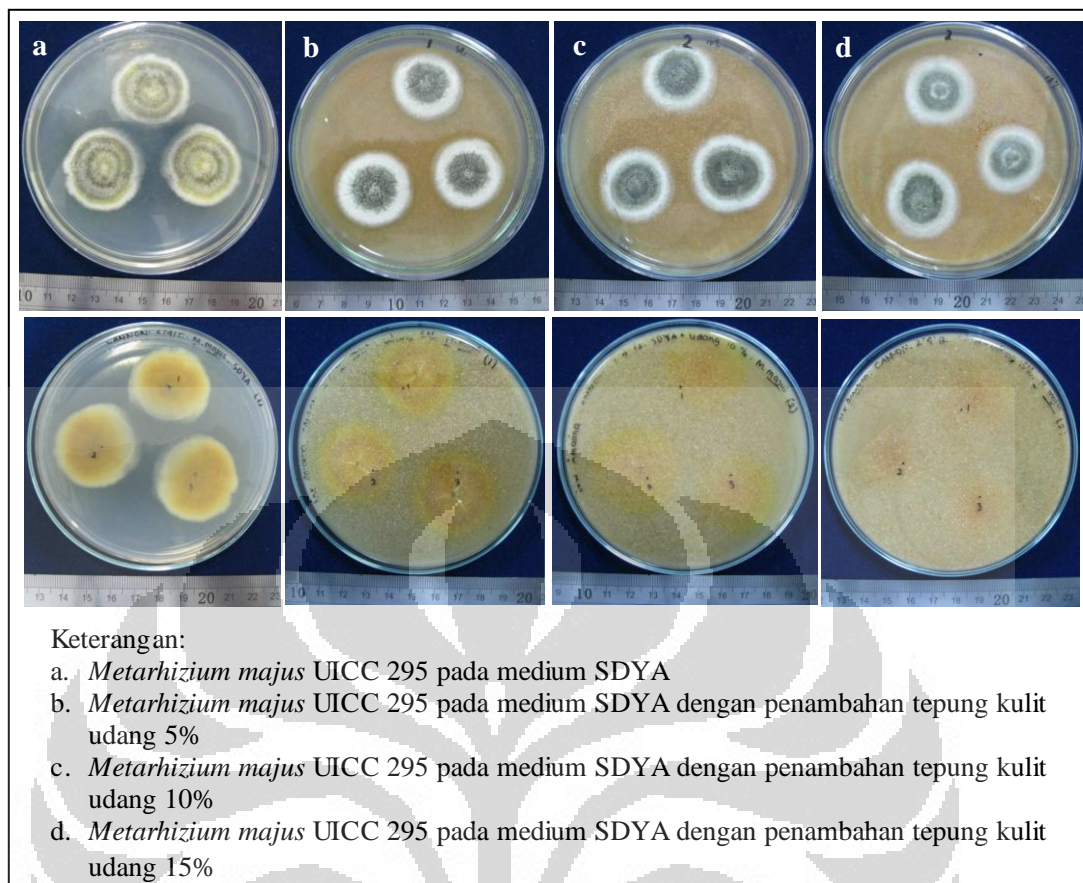
Metarhizium majus UICC 295 diduga mampu menggunakan tepung kulit udang sebagai sumber nutrisi tambahan bagi pertumbuhannya. Tepung kulit udang mengandung lipid, mineral CaCO_3 , dan kitin yang terikat di dalam selubung protein. Senyawa-senyawa tersebut digunakan oleh kapang sebagai sumber karbon dan nitrogen. Karbon dan nitrogen digunakan oleh kapang sebagai komponen pembentuk struktur dinding sel. Sumber karbon dan nitrogen tambahan yang terdapat pada tepung kulit udang diduga dapat meningkatkan jumlah konidia kapang *M. majus* UICC 295, sehingga menghasilkan koloni dengan konidia yang lebih rapat. Selain itu, karbon dan nitrogen tambahan pada medium pertumbuhan *M. majus* UICC 295 diduga menyebabkan kapang lebih cepat mencapai *full sporulation*. Sun dan Liu (2006: 298--301) menyatakan bahwa sumber karbon yang terdapat pada medium memengaruhi germinasi, pertumbuhan hifa, dan sporulasi kapang. *Metarhizium anisopliae* mampu tumbuh baik (germinasi spora 94,4--100%) pada medium dengan penambahan sumber karbon (glukosa, manosa, fruktosa, trehalosa, atau kitin). Berdasarkan Li dan Holdom (1995: 256--259), penambahan sumber karbon atau nitrogen ke dalam medium pertumbuhan dapat menghasilkan konidia *M. anisopliae* lebih banyak dibandingkan pada medium tanpa penambahan sumber karbon atau nitrogen. Penambahan sumber karbon (glukosa, fruktosa, maltosa, sukrosa, atau manosa) sebanyak 2% (b/v) ke dalam medium yang mengandung dekstrosa 2% (b/v), pepton 0,5% (b/v), dan agar 1,5% (b/v) menghasilkan konidia *M. anisopliae* lebih

banyak ($1,79\text{--}3,89 \times 10^7$ konidia/koloni) dibandingkan pada medium tanpa penambahan sumber karbon ($1,48 \times 10^6$ konidia/koloni). Selain itu, *M. anisopliae* pada medium yang mengandung pepton sebagai sumber nitrogen dapat menghasilkan $5,84 \times 10^7$ konidia/koloni, sedangkan pada medium tanpa pemberin pepton *M. anisopliae* tidak dapat menghasilkan konidia.

Hasil pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 secara mikroskopik pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) menunjukkan bahwa *M. majus* UICC 295 pada seluruh medium memiliki konidia berbentuk silindris dan hifa yang bercabang (Gambar 4.1.3). Hasil pengamatan sesuai dengan deskripsi *M. majus* oleh Tzean dkk. (1997: 150), Bischoff dkk. (2009: 516), dan Rosadi (2011: 26). Bischoff dkk. (2009: 516) menyatakan *M. majus* memiliki konidia berwarna *olive green* dan berbentuk silindris. Rosadi (2011: 26) menyatakan bahwa *M. majus* UICC 295 berumur sepuluh hari dalam medium SDYA pada suhu $22\text{--}25^\circ\text{C}$ dengan kondisi gelap memiliki massa konidia berwarna *olive green*, miselium berwarna putih, sebalik koloni tidak berwarna (hialin), bertekstur granular, dan memiliki *growing zone* serta *exudate drops* yang berwarna kuning kecokelatan. Tzean dkk. (1997: 150) menyatakan bahwa *M. anisopliae* var. *majus* pada medium SDYA memiliki hifa bercabang dan berseptata.

Tabel 4.1.1. Hasil pengamatan morfologi koloni *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA (umur 18 hari) dan dalam medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) (umur 10 hari) pada suhu 28°C dengan kondisi gelap

Medium	Warna	Sebalik koloni	Tekstur	<i>Exudate drops</i>	Zonasi	<i>Radial furrow</i>	<i>Growing zone</i>
SDYA	<i>Olive green</i>	Hialin	<i>Granular</i>	Ada	Ada	Ada	Ada
SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5%	<i>Sea green</i>	Hialin	<i>Granular</i>	Ada	Tidak ada	Ada	Ada
SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10%	<i>Sea green</i>	Hialin	<i>Granular</i>	Ada	Ada	Ada	Ada
SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 15%	<i>Sea green</i>	Hialin	<i>Granular</i>	Ada	Ada	Ada	Ada

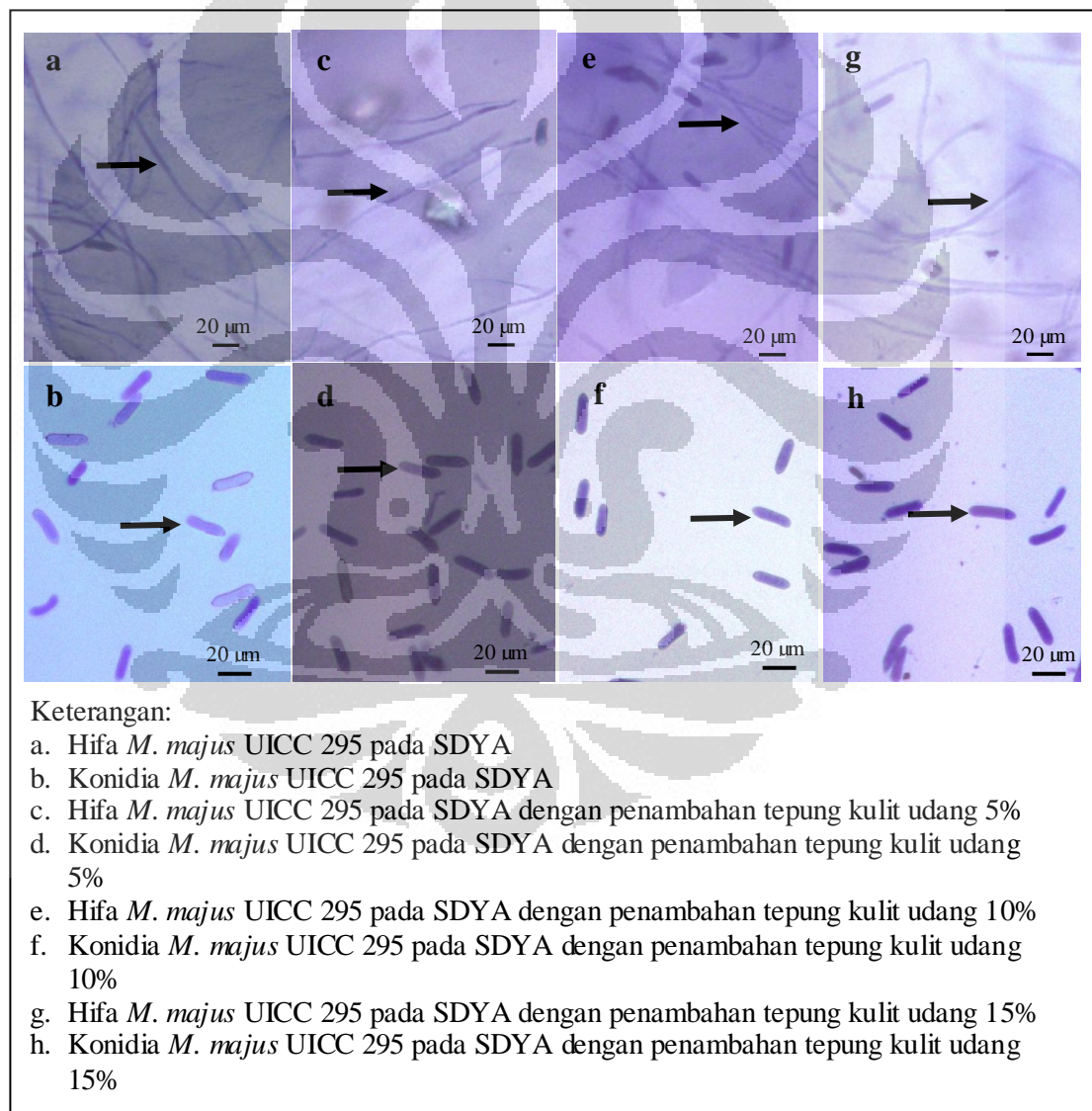


Gambar 4.1.2. Koloni *M. majus* UICC 295 umur 10 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Hasil pengukuran diameter menunjukkan bahwa ukuran diameter koloni tertinggi dimiliki oleh *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) (2,42 cm) dan ukuran diameter terendah dimiliki oleh *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA (2,08 cm) (Tabel 4.1.2). Diameter koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) mengalami kenaikan sebesar 16,35% dibandingkan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA (Gambar 4.1.4). Secara keseluruhan, diameter koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang pada berbagai konsentrasi tidak berbeda secara signifikan dibandingkan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA. Peningkatan ukuran diameter koloni yang tidak signifikan diduga disebabkan tepung kulit udang pada medium SDYA tidak dapat digunakan dengan baik oleh *M. majus* UICC 295 sebagai nutrisi tambahan bagi pertumbuhan kapang. Kitin

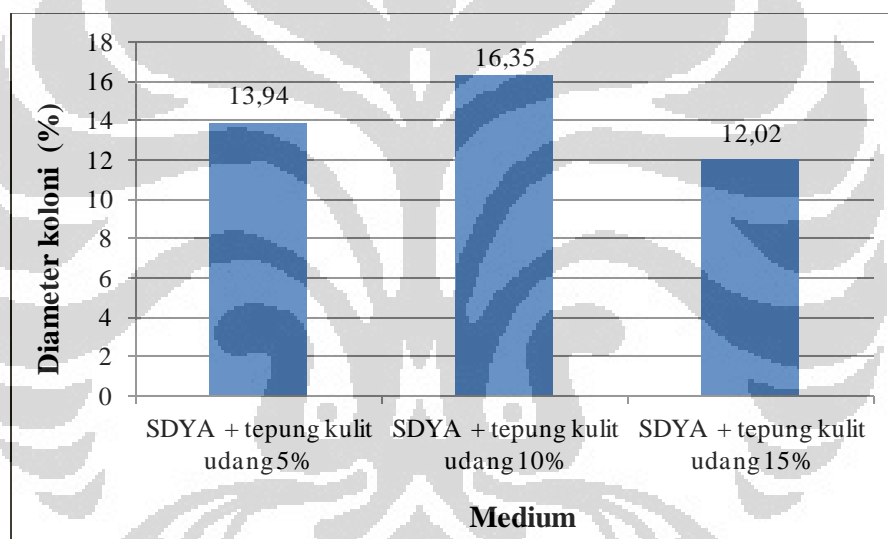
yang terdapat pada kulit udang diduga masih terikat di dalam selubung protein, sehingga kitin tersebut sulit untuk didegradasi oleh kapang dan dimanfaatkan sebagai sumber karbon dan nitrogen tambahan. Berdasarkan Mustafa dan Kaur (2009: 926 & 929), rasio karbon dan nitrogen pada medium pertumbuhan memengaruhi ukuran diameter koloni *M. anisopliae*. *Metarhizium anisopliae* yang ditumbuhkan pada medium SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) dengan rasio karbon dan nitrogen 35: 1 mengalami peningkatan ukuran diameter koloni lebih besar (0,35 mm per hari) dibandingkan dengan diameter koloni *M. anisopliae* pada medium dengan rasio glukosa dan pepton 10:1.



Gambar 4.1.3. Hifa dan konidia *M. majus* UICC 295 pada suhu 28° C dengan kondisi gelap menggunakan pewarna *lactophenol cotton blue* [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Tabel 4.1.2. Diameter koloni rata-rata *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) umur 10 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap

Medium	Diameter rata-rata (cm)	Persentase kenaikan diameter koloni rata-rata (dibandingkan dengan SDYA) (%)
SDYA	2,08	
SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5%	2,37	13,94
SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10%	2,42	16,35
SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 15%	2,33	12,02



Gambar 4.1.4. Grafik persentase kenaikan diameter koloni rata-rata *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) dibandingkan dengan kontrol umur 10 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Hasil pengukuran hifa dan konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA menunjukkan bahwa lebar hifa *M. majus* UICC 295 sesuai dengan deskripsi Tzean dkk. (1997: 150) (Tabel 4.1.3). Akan tetapi, konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA berukuran lebih besar dibandingkan dengan ukuran konidia pada deskripsi Bischoff dkk. (2009: 525). Perbedaan ukuran tersebut diduga disebabkan oleh perbedaan umur pada *M. majus* UICC 295 ketika

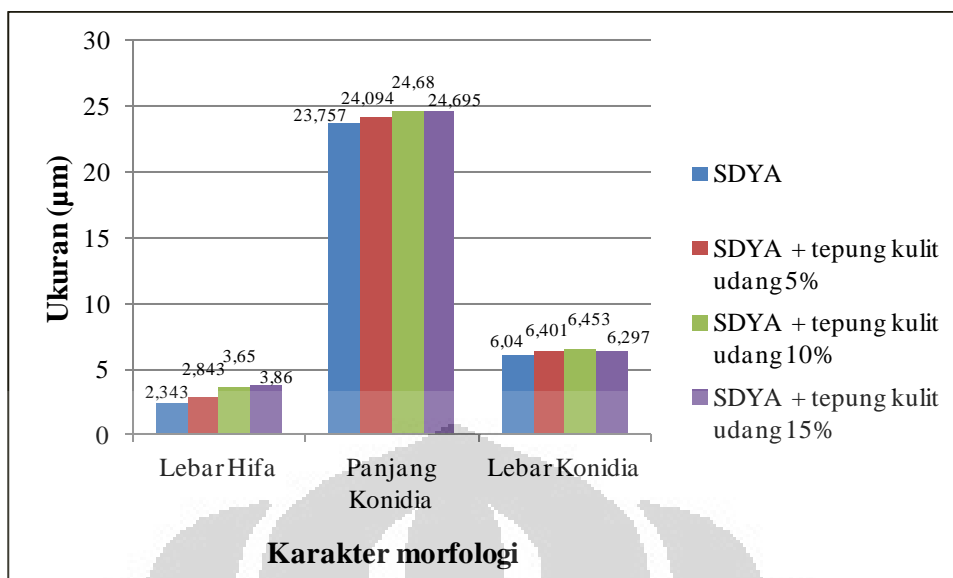
dilakukan pengukuran konidia. Pengukuran dilakukan pada *M. majus* UICC 295 yang berumur 21 hari. Tzean dkk. (1997: 150) menyatakan bahwa *M. anisopliae* var. *majus* pada medium SDYA memiliki hifa dengan lebar 1,8--4,0 μm . Bischoff dkk. (2009: 525) menyatakan bahwa *M. majus* berumur 14 hari pada medium SDYA memiliki konidia berbentuk silindris dengan ukuran panjang 8,5--14,5 μm dan lebar 2,5--5 μm .

Berdasarkan hasil pengamatan, *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang memiliki ukuran hifa dan konidia lebih besar dibandingkan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA (Gambar 4.1.5). Akan tetapi, berdasarkan hasil uji ANOVA tidak terdapat perbedaan antara ukuran konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang (Lampiran 14 dan Lampiran 15). Perbedaan hanya terdapat pada lebar hifa antara *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang (Lampiran 16). Hasil uji statistik Tukey berbeda nyata antara lebar hifa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan lebar hifa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v). Akan tetapi, lebar hifa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) tidak berbeda nyata dengan lebar hifa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 15% (b/v) (Lampiran 17). Peningkatan ukuran diameter koloni, ukuran hifa, dan ukuran konidia *M. majus* UICC 295 menunjukkan terjadinya peningkatan pertumbuhan pada kapang tersebut. Peningkatan pertumbuhan *M. majus* UICC 295 diduga disebabkan oleh pemberian nutrisi tambahan ke dalam medium SDYA yang berasal dari tepung kulit udang. Nutrien yang terkandung di dalam tepung kulit udang adalah lipid, mineral CaCO_3 , dan kitin yang terikat di dalam selubung protein. Medium SDYA mengandung sumber karbohidrat, lipid, protein, dan asam nukleat yang terdapat dalam bentuk glukosa, pepton, dan *yeast extract*. Senyawa-senyawa tersebut berperan sebagai sumber karbon dan nitrogen. Karbon dan nitrogen diperlukan oleh sel kapang dalam proses metabolisme, serta digunakan sebagai komponen pembentuk struktur dinding sel kapang. Medium dengan kandungan nutrisi yang

lengkap akan menghasilkan pertumbuhan kapang yang lebih baik. Hal tersebut dibuktikan oleh *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 15% (b/v) menghasilkan hifa dan konidia lebih besar dibandingkan pada medium dengan penambahan kulit udang 5% (b/v) dan 10% (b/v) maupun pada medium SDYA tanpa penambahan tepung kulit udang. Berdasarkan Walker dan White (2011: 12, 21--22), karbon yang berada di dalam medium akan berikatan dengan unsur-unsur lain seperti hidrogen, oksigen, dan nitrogen membentuk senyawa polimer protein, karbohidrat, lipid, asam nukleat, kitin, dan glukukan. Nitrogen akan diasimilasi menjadi asam amino, kemudian asam amino berpolimerisasi menjadi protein. Senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa penyusun dinding sel (glukan dan kitin) serta pembentuk organel-organel sel kapang.

Tabel 4.1.3. Ukuran hifa dan konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA umur 21 hari dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) umur 14 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap

Medium	Lebar Hifa (μm)	Panjang Konidia (μm)	Lebar Konidia (μm)
SDYA	1,84--2,91	19,32--26,44	4,60--7,49
SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5%	2,30--3,59	21,44--26,51	5,08--7,86
SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10%	2,68--4,74	22,18--27,24	5,54--7,27
SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 15%	2,76--4,55	21,44--26,77	4,95--6,92



Gambar 4.1.5. Grafik ukuran hifa dan konidia *M. majus* UICC 295 pada SDYA umur 21 hari dan pada SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) umur 14 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Berdasarkan hasil pengamatan, tepung kulit udang dengan konsentrasi 10% (b/v) merupakan konsentrasi yang paling mendukung pertumbuhan *M. majus* UICC 295. Hal tersebut dilihat dari konidia dan hifa *M. majus* UICC 295 yang berukuran lebih besar pada medium tersebut. Oleh karena itu, digunakan penambahan tepung kulit udang dengan konsentrasi 10% (b/v) ke dalam medium SDYA sebagai medium pertumbuhan *M. majus* UICC 295 yang digunakan dalam aplikasi kapang untuk menginfeksi larva *O. rhinoceros* dan untuk preservasi pada suhu -80° C.

4.2 PENGUJIAN SUSPENSI KONIDIA/HIFA *Metarhizium majus* UICC 295 PADA LARVA *Oryctes rhinoceros*

Konidia/hifa *M. majus* UICC 295 dihitung menggunakan hemositometer dan menggunakan metode *total plate count* (TPC). Penghitungan dilakukan sebelum aplikasi *M. majus* UICC 295 pada larva *O. rhinoceros*. Perhitungan konidia menggunakan hemositometer dilakukan untuk mengetahui jumlah konidia *M. majus* UICC 295 dalam satu ml suspensi dan untuk mempersiapkan inokulum

yang akan digunakan untuk aplikasi terhadap larva. Setelah jumlah konidia diketahui, maka dapat ditentukan jumlah konidia yang sama untuk aplikasi terhadap larva *O. rhinoceros*. Perhitungan menggunakan metode TPC dilakukan untuk mengetahui jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 yang dapat hidup (viabel). Hasil perhitungan jumlah konidia *M. majus* UICC 295 berumur 23 hari pada medium SDYA menggunakan hemositometer adalah $8,7 \times 10^6$ konidia/ml dan jumlah konidia pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) adalah $2,7 \times 10^7$ konidia/ml. Hasil enumerasi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 dengan metode TPC menunjukkan bahwa jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 berumur 23 hari pada medium SDYA adalah $6,3 \times 10^6$ CFU/ml (Tabel 4.2.1), sedangkan jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 berumur 23 hari pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) adalah $2,5 \times 10^6$ CFU/ml (Tabel 4.2.2). Hasil enumerasi dengan metode TPC menunjukkan bahwa *M. majus* UICC 295 memiliki viabilitas lebih tinggi ketika ditumbuhkan pada medium SDYA dibandingkan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v). Jumlah konidia/hifa kapang *M. majus* UICC 295 yang diaplikasikan pada larva *O. rhinoceros* dapat menentukan keberhasilan infeksi kapang pada serangga. Konidia/hifa kapang sebanyak 10^7 CFU/ml diharapkan mampu menginfeksi larva dengan cepat. Berdasarkan Abdullah (2009: 49), *M. majus* UICC 295 dengan jumlah konidia/hifa 10^6 CFU/ml telah mampu membunuh larva *O. rhinoceros* 100% dalam 14 hari.

Aplikasi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) dilakukan sebanyak tiga kali selama tiga hari berturut-turut untuk memperbanyak jumlah konidia kapang yang berpenetrasi ke dalam tubuh larva, sehingga larva lebih cepat mengalami kematian. Jumlah larva yang mati dapat dilihat pada Lampiran 18 dan Lampiran 19. Pengujian dilakukan pada larva *O. rhinoceros* karena larva memiliki lapisan kulit yang lebih tipis dibandingkan dengan *O. rhinoceros* dewasa, sehingga *M. majus* UICC 295 diharapkan dapat lebih mudah menginfeksi larva. Prayogo dkk. (2005: 23) menyatakan bahwa larva kumbang badak

memiliki lapisan integumen yang tipis, sehingga kapang mudah untuk melakukan penetrasi.

Tabel 4.2.1. Hasil enumerasi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA umur 23 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap menggunakan metode TPC

Pengenceran	Pengulangan	Σ koloni 6 hari	Σ CFU (CFU/ml)	Σ CFU rata-rata (CFU/ml) ± SD
10 ⁻⁴	1	55	6,70 x 10 ⁶	6,63 ± 0,40 x 10 ⁶
	2	56		
	3	75		
10 ⁻⁵	1	10	7,00 x 10 ⁶	6,63 ± 0,40 x 10 ⁶
	2	5		
	3	6		
10 ⁻⁶	1	1	6,20 x 10 ⁶	
	2	0		
	3	1		

Tabel 4.2.2. Hasil enumerasi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) umur 23 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap menggunakan metode TPC

Pengenceran	Pengulangan	Σ koloni 6 hari	Σ CFU (CFU/ml)	Σ CFU rata-rata (CFU/ml) ± SD
10 ⁻³	1	152	1,42 x 10 ⁶	
	2	133		
	3	143		
10 ⁻⁴	1	26	3,1 x 10 ⁶	2,50 ± 0,94 x 10 ⁶
	2	30		
	3	37		
10 ⁻⁵	1	3	3 x 10 ⁶	
	2	2		
	3	4		

Tabel 4.2.3. Hasil enumerasi konidia *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% umur 25 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap menggunakan hemositometer

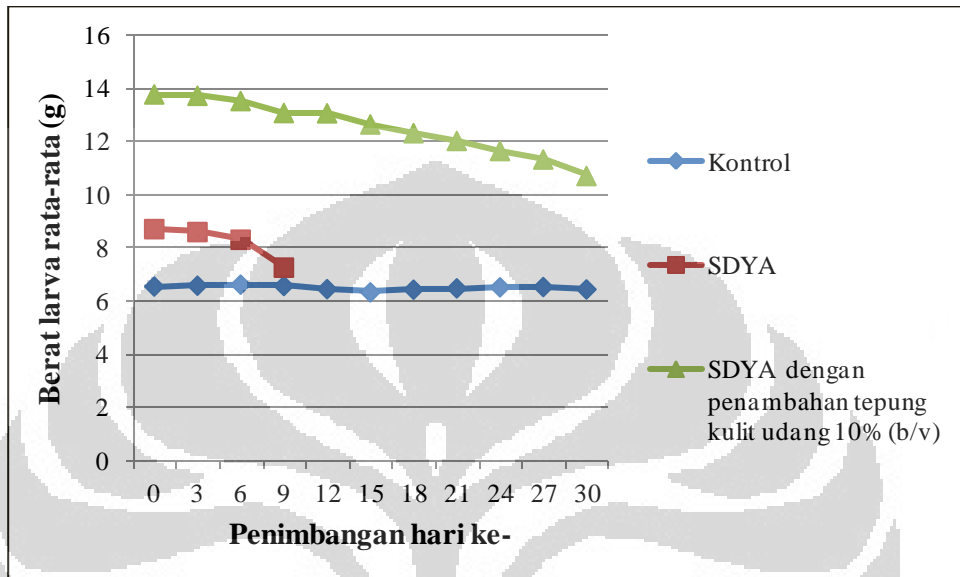
Pengulangan	Σ konidia/kotak	Jumlah	Rata-rata	Σ konidia/ml
1	96	576	553	2,7 x 10 ⁷
	107			
	144			
	108			
	121			
2	90	530	553	2,7 x 10 ⁷
	126			
	88			
	109			
	117			

Penghitungan berat badan pada larva yang masih hidup dilakukan untuk melihat pengaruh kapang terhadap berat badan larva (Lampiran 20, Lampiran 21, dan Lampiran 22). Sembilan larva dari 30 larva pada kelompok perlakuan yang diaplikasikan dengan *M. majus* UICC 295 pada SDYA mengalami kenaikan berat badan sebesar 0,12 ± 0,05 g pada hari ke-3 setelah aplikasi, sedangkan tiga larva dari 30 larva pada kelompok perlakuan yang diaplikasikan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) mengalami kenaikan berat badan sebesar 0,06 ± 0,08 g. Sebanyak 20 larva dari 30 larva pada kelompok kontrol mengalami kenaikan berat badan sebesar 0,07 ± 0,06 g. Hasil penimbangan berat larva kelompok perlakuan yang diaplikasikan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA pada hari ke-6 dan ke-9 menunjukkan penurunan berat badan hingga menjelang kematian larva. Hasil penimbangan berat larva kelompok perlakuan yang diaplikasikan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) hingga hari ke-30 juga menunjukkan penurunan berat badan (Gambar 4.2.1). Berat badan larva rata-rata pada kelompok perlakuan yang diaplikasikan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan pada kelompok perlakuan yang diaplikasikan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan

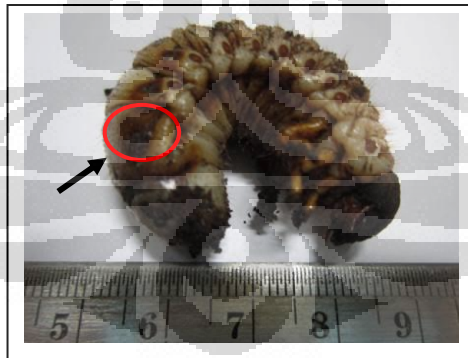
penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) secara keseluruhan mengalami penurunan. Penurunan berat badan tersebut diduga akibat larva telah diinfeksi oleh *M. majus* UICC 295. Kapang yang berhasil menginfeksi larva akan menyerap nutrien-nutrien dan cairan tubuh yang ada di dalam tubuh larva. Selain itu, diduga *M. majus* UICC 295 menghasilkan toksin, yaitu destruksin. Destruksin yang dihasilkan oleh kapang menyerang otot pada lambung bagian tengah tubuh larva. Hal tersebut menyebabkan gangguan penyerapan makanan oleh larva, sehingga larva menjadi kekurangan nutrien. Kekurangan nutrien tersebut mengakibatkan larva menjadi lemas dan gerakan larva menjadi lamban. Berdasarkan Sambiran dan Hosang (2007: 5--7), gejala larva *O. rhinoceros* telah terinfeksi *M. anisopliae* adalah aktivitas makan larva menurun dan gerakan larva menjadi lamban. Male dkk. (2009: 1447--1448) menyatakan bahwa destruksin merupakan toksin neuromuskular yang dapat menginduksi depolarisasi membran otot dengan membuka kanal Ca^{2+} pada otot serangga. Hal tersebut mengakibatkan kelumpuhan pada otot serangga dan kemudian menyebabkan kematian.

Gejala infeksi kapang pada larva juga dapat terlihat dari munculnya bercak cokelat kehitaman pada tubuh larva (Gambar 4.2.2). Berdasarkan pengamatan, bercak cokelat kehitaman pada larva kelompok perlakuan yang diaplikasikan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA pertama kali terjadi pada hari ke-5 setelah aplikasi. Pada larva kelompok perlakuan yang diaplikasikan dengan *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v), bercak cokelat kehitaman terjadi pertama kali pada hari ke-9 setelah perlakuan. Bercak cokelat kehitaman terlihat diikuti dengan perubahan warna tubuh larva menjadi kusam dan gerakan larva yang menjadi lambat. Bercak cokelat kehitaman terdapat pada bagian bawah tubuh, dekat kepala, dekat ekor, dan di antara segmen tubuh. Bercak cokelat kehitaman diduga timbul sebagai respon pertahanan tubuh serangga terhadap infeksi kapang *M. majus* UICC 295. Bercak cokelat kehitaman tersebut diduga merupakan melanin. Seckbach dan Grube (2010: 301) melaporkan bahwa melanin merupakan senyawa fenol yang dikatalisis oleh enzim profenol oksidase. Melanin tersebut berperan dalam proses enkapsulasi kapang yang masuk ke dalam tubuh

serangga. Selain itu, melanin juga berperan untuk menghambat aktivitas enzim kitinase yang dihasilkan oleh kapang entomopatogen, sehingga kapang tidak dapat berpenetrasi menembus kutikula serangga. Proses melanisasi mengakibatkan tubuh larva menjadi berwarna lebih gelap.



Gambar 4.2.1. Grafik perbandingan berat rata-rata larva kontrol dan perlakuan selama 30 hari pengamatan
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.2.2. Bercak cokelat kehitaman (melanin) pada tubuh larva
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

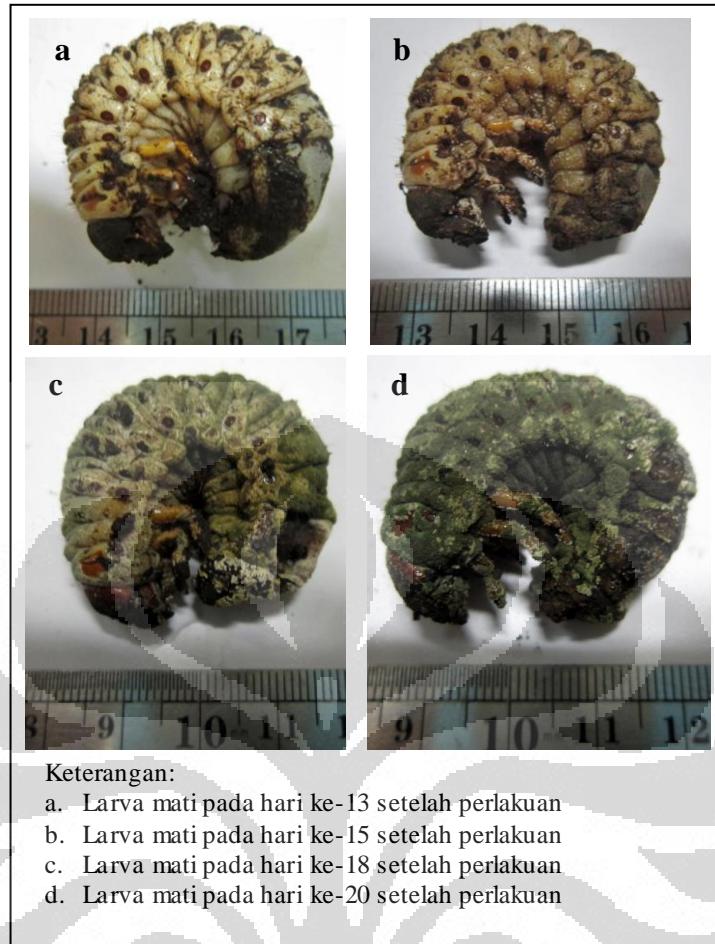
Pada hari ke-7 setelah perlakuan, mulai terjadi kematian sebesar 3,33% pada larva kelompok perlakuan yang diaplikasikan dengan *M. majus* UICC 295

pada medium SDYA, sedangkan pada larva kelompok perlakuan yang diaplikasikan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) kematian sebesar 6,67% mulai terjadi pada hari ke-12 (Tabel 4.2.4). Larva tersebut mati dengan tubuh yang mengeras. Dua hari setelah kematian, hifa kapang berwarna putih mulai terlihat pada permukaan tubuh larva. Tiga hari setelah kematian, kapang telah bersporulasi dengan konidia berwarna hijau terlihat di permukaan tubuh larva. Tujuh hari setelah kematian, seluruh permukaan tubuh larva telah tertutup oleh konidia kapang (Gambar 4.2.3). Kematian larva diduga merupakan akibat terserapnya nutrien-nutrien dan cairan tubuh larva oleh kapang. Hal tersebut mengakibatkan tubuh larva menjadi mengeras ketika mengalami kematian. Setelah larva mati, hifa kapang akan keluar menembus tubuh larva, kemudian membentuk konidia. Gultom (2010: 18) melaporkan bahwa larva *O. rhinoceros* yang terinfeksi *M. anisopliae* akan mati dengan tubuh yang mengeras dan beberapa hari setelah kematian, tubuh larva akan ditutupi oleh konidia kapang berwarna hijau.

Suhu ruang rata-rata untuk inkubasi larva adalah 27,61° C dengan kelembaban relatif ruangan rata-rata selama tiga hari aplikasi adalah 90,3%. Suhu dan kelembaban tersebut merupakan kondisi lingkungan yang diperlukan konidia *M. majus* UICC 295 untuk bergerminasi dan berpenetrasi ke dalam tubuh larva. Kondisi ruang inkubasi selama pengamatan adalah gelap dan tidak terkena cahaya matahari. Berdasarkan Bugeme dkk. (2008: 276), *M. anisopliae* dapat tumbuh baik pada suhu 25--30° C. Prayogo (2006: 49) menyatakan bahwa kelembaban di atas 90% selama 6--12 jam setelah aplikasi diperlukan kapang untuk bergerminasi dan berpenetrasi ke dalam tubuh larva.

Larva yang diinokulasikan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA mengalami kematian 3,33% pada hari ke-7 dan mencapai kematian 100% pada hari ke-11. Larva yang diinokulasikan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) mengalami kematian 6,67% pada hari ke-12 dan mencapai kematian 40% pada hari ke-30 (Tabel 4.2.4 dan Gambar 4.2.4). Larva pada kelompok kontrol tidak mengalami kematian. Kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) tidak menghasilkan kematian larva 100% selama 30 hari.

Kapang diduga tidak dapat langsung memanfaatkan kitin yang terdapat pada kulit udang secara maksimal. Kitin yang terdapat pada kulit udang diduga masih terikat pada protein dan membentuk matriks kitin-protein. *Metarhizium majus* UICC 295 terlebih dahulu harus memutus protein yang berikatan dengan kitin menggunakan enzim protease untuk membebaskan kitin. Hal tersebut mengakibatkan *M. majus* UICC 295 membutuhkan waktu lebih lama untuk dapat menghasilkan enzim kitinase yang berperan dalam degradasi kitin. Enzim kitinase tersebut diperlukan kapang untuk menginfeksi larva, yaitu pada saat degradasi kutikula larva. Waktu yang diperlukan kapang untuk memproduksi enzim kitinase memengaruhi kemampuan kapang dalam menginfeksi dan menyebabkan kematian pada larva inang. Oleh karena itu, semakin lama waktu yang diperlukan kapang untuk menghasilkan enzim kitinase akan mengakibatkan semakin lama pula waktu yang diperlukan kapang untuk dapat menyebabkan kematian larva. Berdasarkan Einbu (2007: 6), kitin yang terdapat pada kulit udang membentuk suatu rantai panjang dan berikatan dengan protein membentuk matriks kitin-protein. Matriks tersebut tersusun secara paralel membentuk lapisan eksoskeleton. Berdasarkan Leger dkk. (1986: 1515), produksi enzim kitinase diinduksi oleh keberadaan kitin yang terdapat pada medium pertumbuhan. *Metarhizium anisopliae* memproduksi enzim kitinase ketika ditumbuhkan pada medium dengan penambahan kitin koloidal dan glukosamin, sedangkan sintesis enzim tersebut tidak terjadi pada medium tanpa penambahan kitin maupun dengan penambahan polimer lain seperti pektin dan selulosa. Capinera (2008: 2355--2356) menyatakan bahwa enzim kitinase yang dihasilkan oleh kapang entomopatogen berperan dalam proses degradasi kutikula serangga.

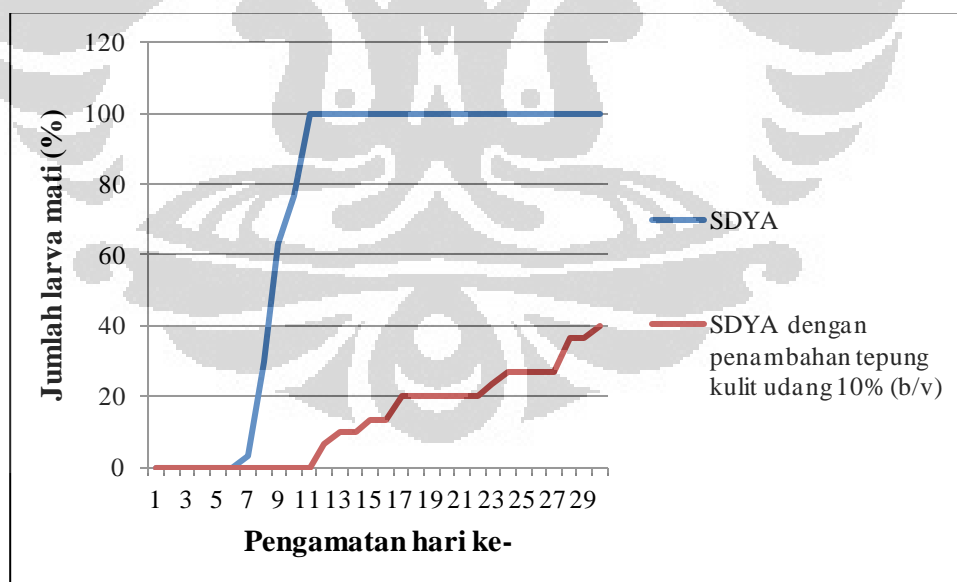


Gambar 4.2.3. Larva mati terinfeksi *M. majus* UICC
295

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Tabel 4.2.4. Jumlah larva mati dan persentase kematian larva per hari selama 30 hari pengamatan

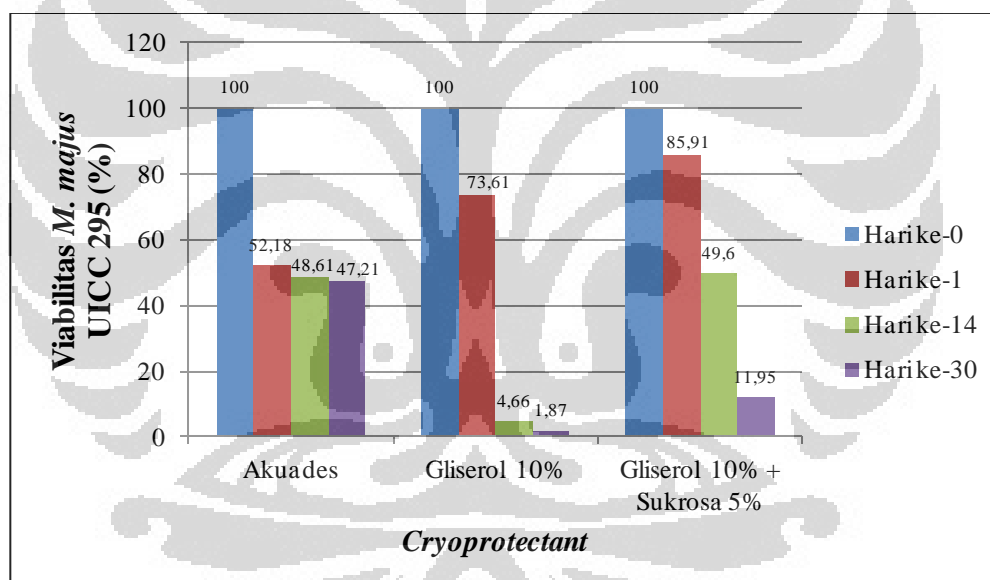
Hari ke-	Larva yang diaplikasikan <i>M. majus</i> UICC 295 dalam SDYA (%)		Larva yang diaplikasikan <i>M. majus</i> UICC 295 dalam SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (%)	
	Jumlah larva mati	Persentase	Jumlah larva mati	Persentase
7	1	3,33	-	-
8	8	26,67	-	-
9	10	33,33	-	-
10	4	13,33	-	-
11	7	23,33	-	-
12	-	-	2	6,67
13	-	-	1	3,33
17	-	-	2	6,67
23	-	-	1	3,33
24	-	-	1	3,33
28	-	-	3	10
30	-	-	1	3,33
Total	30	100	12	40

Gambar 4.2.4. Grafik kematian larva perlakuan dengan aplikasi suspensi konidia/larva *M. majus* UICC 295 selama 30 hari pengamatan

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

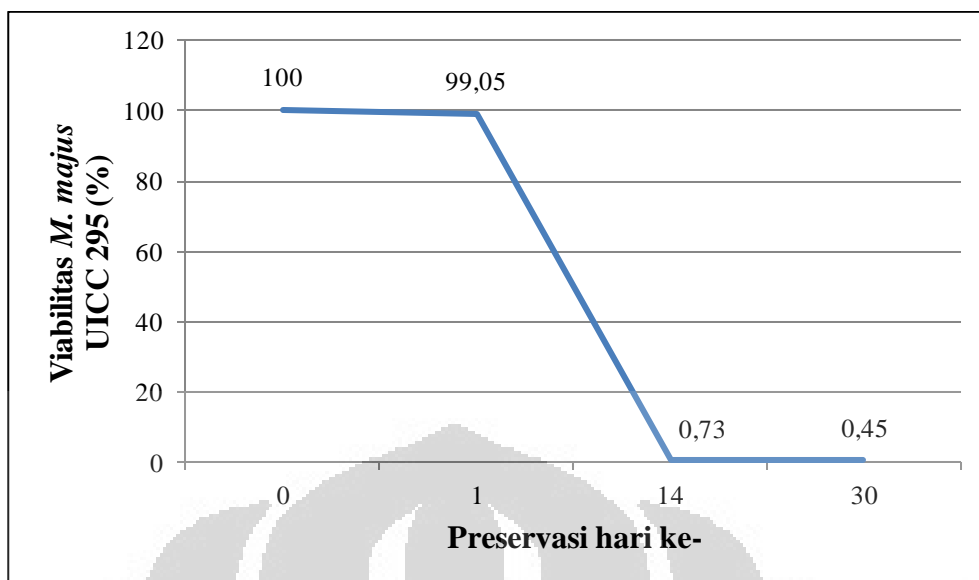
4.3 PRESERVASI KONIDIA/HIFA *M. majus* UICC 295 PADA SUHU -80°C

Hasil preservasi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 menunjukkan bahwa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA tetap memiliki viabilitas setelah dipreservasi selama 30 hari, baik pada protektan gliserol 10% (v/v), gliserol 10% (v/v) dengan penambahan sukrosa 5% (b/v), maupun pada akuades (kontrol) (Gambar 4.3.1). *Metarhizium majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan kulit udang 10% (b/v) kehilangan viabilitasnya setelah dipreservasi pada kedua protektan. *Metarhizium majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan kulit udang 10% (b/v) tetap memiliki viabilitas ketika dipreservasi menggunakan akuades (kontrol) (Gambar 4.3.2).



Gambar 4.3.1. Grafik persentase viabilitas *M. majus* UICC 295 dari medium SDYA setelah dipreservasi pada suhu -80°C selama 30 hari

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.3.2. Grafik persentase *M. majus* UICC 295 dari medium SDYA dengan penambahan kulit udang 10% setelah dipreservasi pada suhu -80°C selama 30 hari di dalam akuades [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Metarhizium majus UICC 295 pada SDYA yang dipreservasi pada suhu -80°C menggunakan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan sukrosa 5% (b/v) tetap memiliki viabilitas setelah dipreservasi selama 30 hari. Gliserol merupakan salah satu *cryoprotectant* yang dapat masuk ke dalam membran sel dan melindungi bagian intraseluler serta ekstraseluler, sedangkan sukrosa merupakan *cryoprotectant* yang berfungsi untuk melindungi sel pada bagian luar membran. Berdasarkan Nakasone dkk. (2004: 41), *cryoprotectant* terdiri atas *penetrating agent* dan *non-penetrating agent*. Salah satu contoh *penetrating agent* adalah gliserol dan contoh *non-penetrating agent* antara lain sukrosa, laktosa, dan glukosa. Hubalek (2003: 218 & 220) menyatakan bahwa *penetrating agent* seperti gliserol dapat berikatan dengan air di dalam sel untuk mencegah sel dari kehilangan air. Selain itu, gliserol dapat menstimulasi pembentukan kristal es yang halus, sehingga tidak menyebabkan kerusakan pada membran sel. *Non-penetrating agent* seperti sukrosa melindungi bagian luar membran sel dengan meningkatkan kekentalan larutan, sehingga dapat mencegah pembentukan kristal es pada bagian ekstraseluler.

Metarhizium majus UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) kehilangan viabilitasnya ketika dipreservasi pada suhu

-80° C menggunakan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan sukrosa 5% (b/v). Gliserol 10% (v/v) dan sukrosa 5% (b/v) diduga menyebabkan tekanan di luar sel menjadi lebih besar dibandingkan tekanan di dalam sel (hipertonik). Gliserol dapat masuk ke dalam sel kapang untuk menyeimbangkan cairan intraseluler. Akan tetapi, gliserol memerlukan waktu yang lama untuk dapat masuk ke dalam sel. Kurangnya waktu ekuilibrase gliserol untuk masuk ke dalam sel menyebabkan tekanan di luar sel masih lebih besar dibandingkan tekanan di dalam sel. Penyimpanan pada suhu rendah (-80° C) mengakibatkan tekanan di luar sel semakin meningkat, sehingga sel akan mengalami *osmotic shock*. *Osmotic shock* menyebabkan cairan intraseluler keluar, sel mengerut, dan menjadi rusak. Berdasarkan Hubalek (2003: 216 & 218), ekuilibrase merupakan waktu yang diperlukan protektan untuk menyeimbangkan cairan intraseluler sel yang akan dipreservasi. *Penetrating agent* seperti gliserol dapat berikatan dengan air di dalam sel untuk mencegah dehidrasi yang berlebihan. Selain itu, *penetrating agent* dapat menstimulasi pembentukan kristal es yang halus, sehingga tidak menyebabkan kerusakan pada membran sel. Gliserol merupakan *penetrating agent* yang memerlukan waktu ekuilibrase lebih lama dan suhu yang lebih tinggi untuk dapat berpenetrasi ke dalam sel. Dimetil sulfoksida (DMSO/Me₂SO) memerlukan waktu ekuilibrase selama 15 menit pada suhu 4° C, sedangkan gliserol memerlukan waktu ekuilibrase selama 1--4 jam dengan suhu optimum yang berbeda-beda pada setiap mikroorganisme. Lastra dkk. (2002: 1127--1128) melaporkan bahwa preservasi *M. anisopliae* menggunakan gliserol 10% (v/v) pada suhu -80° C dapat mempertahankan viabilitas kapang selama 18 bulan. Kapang tersebut disimpan pada suhu 4° C di dalam larutan gliserol 10% (v/v) selama satu malam sebelum disimpan pada suhu -80° C.

Metarhizium majus UICC 295 tetap memiliki viabilitas setelah dipreservasi menggunakan akuades. Konidia dari *M. majus* UICC 295 diduga menghasilkan *compatible solute* yang melindungi sel, yaitu dengan meningkatkan tekanan pada bagian intraseluler. Hal tersebut penting pada saat kapang dipreservasi pada suhu rendah (-80° C). Preservasi pada suhu -80° C menyebabkan peningkatan tekanan pada bagian ekstraseluler. *Compatible solute*

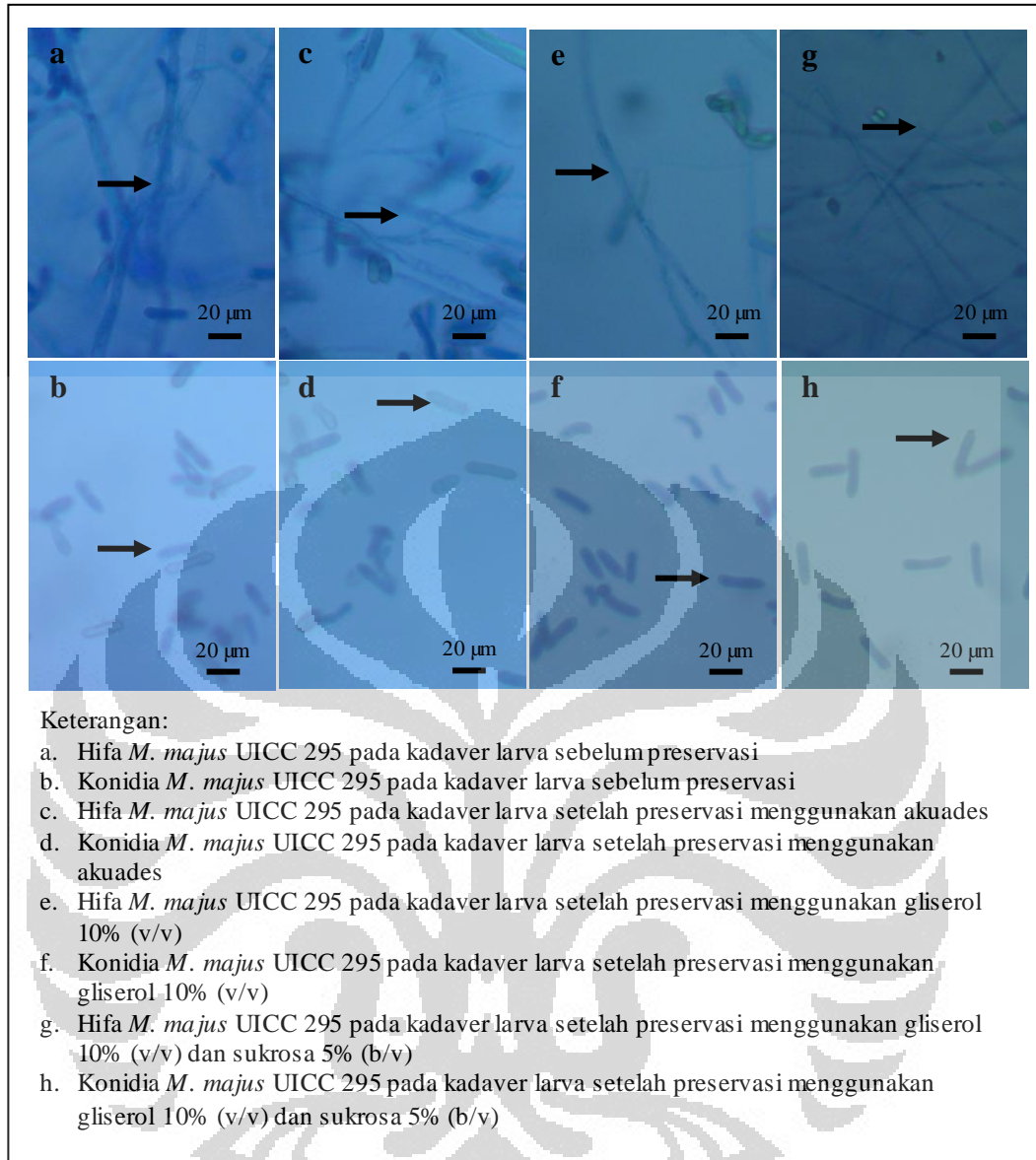
dari konidia kapang akan menyebabkan tekanan ekstraseluler dan intraseluler menjadi seimbang (isotonis). Hal tersebut menyebabkan sel kapang tidak mengalami kerusakan. Madigan dkk. (1997: 171) menyatakan bahwa *compatible solute* merupakan zat terlarut yang digunakan sel pada bagian intraseluler untuk menyesuaikan a_w (*water activity*) pada sitoplasma tanpa menghambat metabolisme sel. *Compatible solute* dihasilkan dengan cara memompa ion anorganik yang berasal dari lingkungan ke dalam sel, atau dengan mensintesis zat-zat organik. Beberapa contoh *compatible solute* adalah gula, gula alkohol, dan asam amino atau derivatnya. Leland (2001: 8--10) menyatakan bahwa *M. anisopliae* menghasilkan gula alkohol (gliserol, arabitol, eritritol, dan manitol) dan trehalosa yang berfungsi untuk melindungi konidia. Gula alkohol dan trehalosa tersebut melapisi konidia, sehingga konidia terlindung dari kekeringan atau keadaan yang tidak menguntungkan.

Pengujian viabilitas *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva dilakukan secara kualitatif, yaitu dengan melihat pertumbuhan *M. majus* UICC 295 ketika kadaver larva diletakkan di atas permukaan medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v). Selain itu, pertumbuhan *M. majus* UICC 295 dibuktikan melalui pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 secara mikroskopik. Berdasarkan hasil pengamatan, *M. majus* UICC 295 tetap memiliki viabilitas ketika ditumbuhkan pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v), baik pada saat sebelum preservasi, maupun setelah dipreservasi selama satu hari pada suhu -80°C . Hal tersebut membuktikan bahwa preservasi *M. majus* UICC 295 bersama dengan inangnya (kadaver larva *O. rhinoceros*) dapat mempertahankan viabilitas kapang tersebut. Pertumbuhan *M. majus* UICC 295 dibuktikan dengan adanya pertumbuhan hifa dan konidia kapang. Koloni kapang berwarna *olive green* menunjukkan warna sporulasi *M. majus* UICC 295. Selain itu, berdasarkan pengamatan morfologi secara mikroskopik, konidia kapang memiliki bentuk silindris serta memiliki hifa bercabang dan bersepta (Gambar 4.3.3 dan Gambar 4.3.4). Hasil tersebut sesuai dengan deskripsi *M. majus* UICC 295 oleh Bischoff dkk. (2009: 516 & 525) yang menyatakan bahwa *M. majus* memiliki konidia berbentuk silindris dan koloni

berwarna *olive green*. Tzean dkk. (1997: 150) menyatakan bahwa *M. anisopliae* var. *majus* memiliki hifa bercabang.

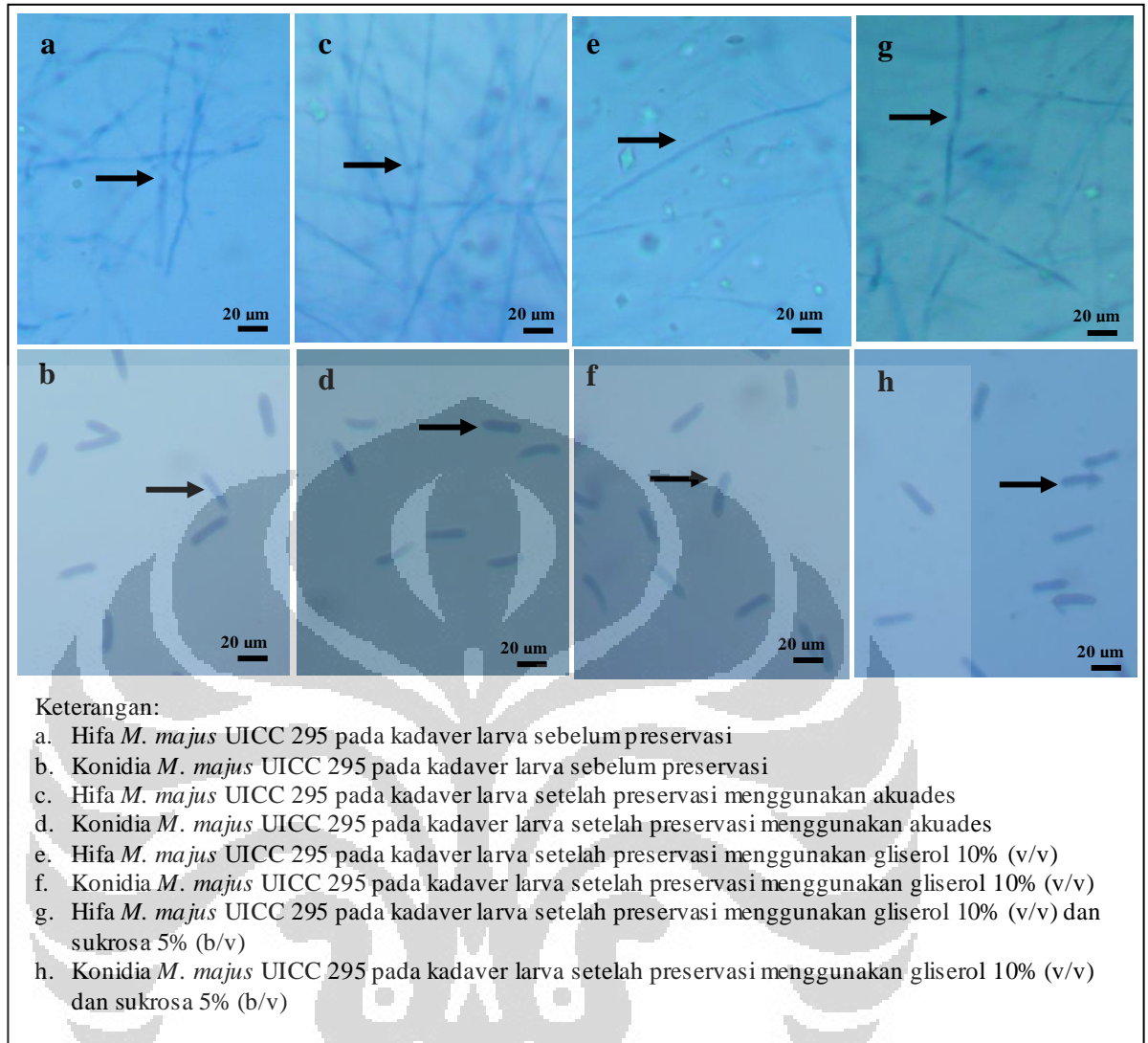
Berdasarkan pengamatan, *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) tetap dapat tumbuh baik setelah dipreservasi pada suhu -80° C bersama dengan kadaver larva. Hal tersebut disebabkan karena larva *O. rhinoceros* merupakan habitat alami bagi *M. majus* UICC 295. Berdasarkan Nakasone dkk. (2004: 40), fungi entomopatogen dapat dipreservasi bersama dengan inang fungsi tersebut. Fungi *Neozygites fresenii* yang dipreservasi bersama dengan inangnya (kutu daun) menghasilkan konidia yang tetap viabel (dapat hidup).

Metarhizium majus UICC 295 pada kadaver larva yang diletakkan pada medium SDYA maupun medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) dapat tumbuh, namun pada medium tersebut terdapat pertumbuhan mikroorganisme lain, yaitu kapang dengan tekstur dan warna koloni yang berbeda dengan *M. majus* UICC 295, serta terdapat pertumbuhan khamir berwarna putih (Gambar 4.3.5 dan Gambar 4.3.6). Hal tersebut menunjukkan terdapat kontaminan karena kadaver larva merupakan kadaver yang tidak steril. Beberapa kapang kontaminan pada medium tumbuh dengan cepat, sehingga mengakibatkan kapang *M. majus* UICC 295 sulit tumbuh karena tertutup oleh kapang lain. Hal tersebut merupakan kelemahan penggunaan kadaver larva yang tidak steril.



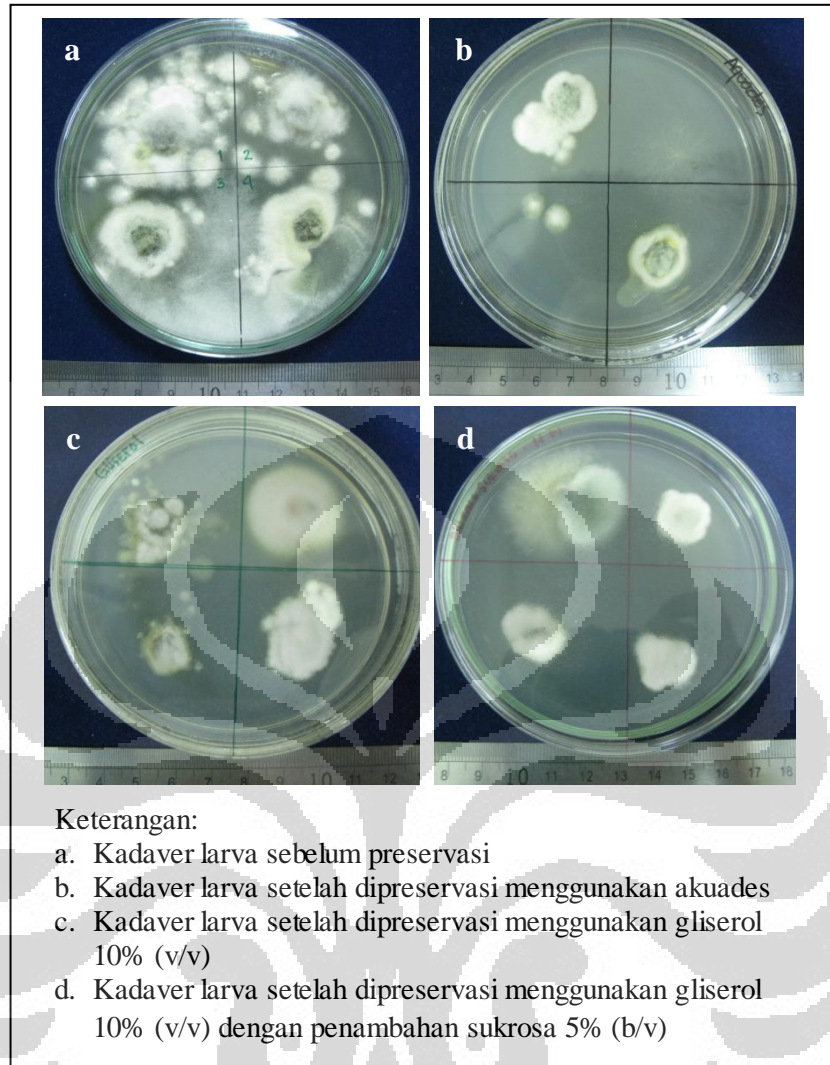
Gambar 4.3.3. Hifa dan konidia *M. majus* UICC 295 dari kadaver larva *O. rhinoceros* pada medium SDYA pada suhu 28° C dengan kondisi gelap menggunakan pewarna *lactophenol cotton blue*

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



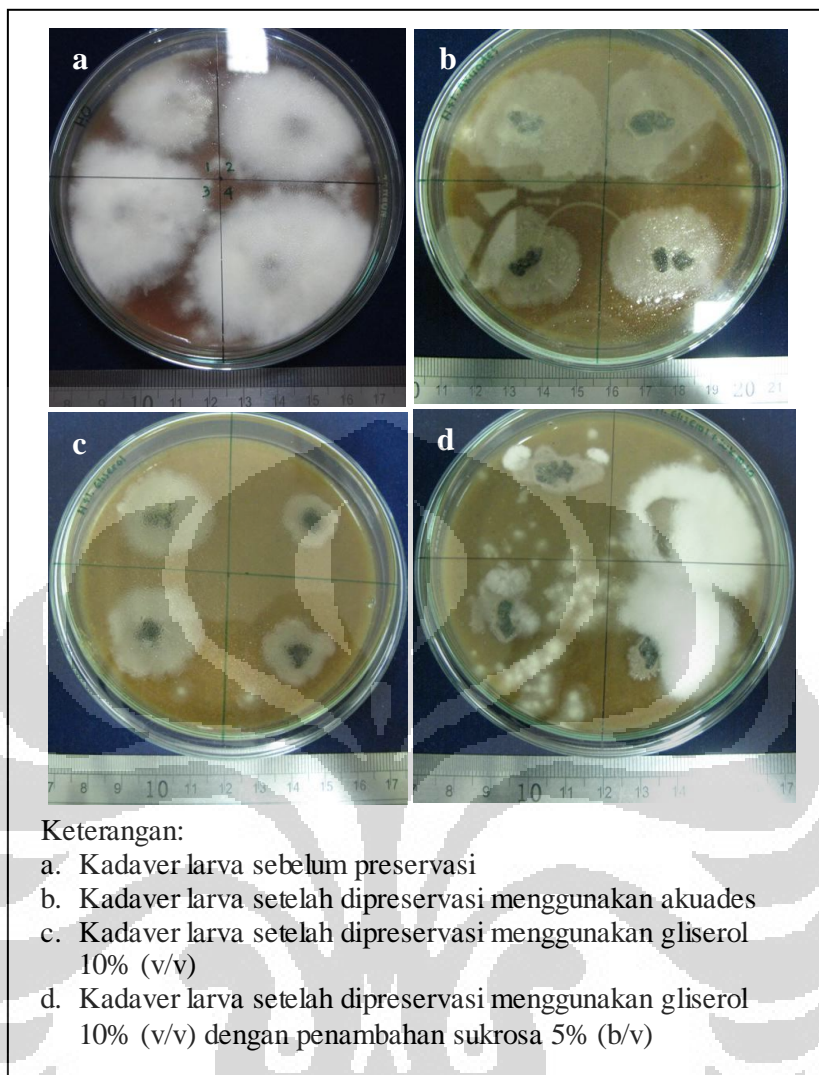
Gambar 4.3.4. Hifa dan konidia *M. majus* UICC 295 dari kadaver larva *O. rhinoceros* pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) suhu 28° C dengan kondisi gelap menggunakan pewarna *lactophenol cotton blue*

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.3.5. Hasil pengujian viabilitas *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA setelah dipreservasi selama satu hari dengan kadaver larva pada suhu -80°C

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.3.6. Hasil pengujian viabilitas *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) setelah dipreservasi selama satu hari dengan kadaver larva pada suhu -80°C

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Hasil dari penelitian memperlihatkan bahwa tepung kulit udang yang berasal dari limbah rumah makan dapat dimanfaatkan sebagai medium yang mendukung pertumbuhan *M. majus* UICC 295. *Metarhizium majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) memiliki potensi sebagai bioinsektisida yang memiliki kemampuan dalam membunuh larva *O. rhinoceros*. Namun demikian, *M. majus* UICC 295 tidak dapat membunuh larva *O. rhinoceros* 100% selama 30 hari. Selain itu, *M. majus* UICC 295 pada

medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang kehilangan viabilitasnya ketika dipreservasi menggunakan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan sukrosa 5% (b/v). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai konsentrasi tepung kulit udang yang tepat untuk *M. majus* UICC 295 sebagai bioinsektisida agar kapang memiliki kemampuan lebih baik dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros* yang merupakan serangga hama. Selain itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai metode preservasi *M. majus* UICC 295 dengan waktu, suhu ekuilibrase, dan suhu penyimpanan yang tepat agar viabilitas kapang tersebut sebagai kapang entomopatogen potensial dapat tetap terjaga.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

1. *Metarhizium majus* UICC 295 pada medium SDYA dapat membunuh larva *O. rhinoceros* 3,33%--100% dalam 7--11 hari, sedangkan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) membunuh larva *O. rhinoceros* 6,67%--40% dalam 12--30 hari.
2. *Metarhizium majus* UICC 295 pada medium SDYA tetap memiliki viabilitas setelah dipreservasi selama 30 hari pada suhu -80° C menggunakan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan sukrosa 5% (b/v).
3. *Metarhizium majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) kehilangan viabilitasnya setelah dipreservasi pada suhu -80° C selama 30 hari menggunakan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan sukrosa 5% (b/v).
4. *Metarhizium majus* UICC 295 pada kadaver larva *O. rhinoceros* tetap memiliki viabilitas setelah dipreservasi pada suhu -80° C.

5.2 SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai konsentrasi tepung kulit udang yang tepat untuk mengetahui pengaruh penambahan tepung kulit udang pada medium pertumbuhan terhadap kemampuan *M. majus* UICC 295 dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros*.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai preservasi *M. majus* UICC 295 menggunakan *cryoprotectant* dengan waktu, suhu ekuilibrisasi, dan suhu penyimpanan yang tepat untuk mengetahui viabilitas serta kemampuan kapang dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros*.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengujian viabilitas *M. majus* UICC 295 setelah dipreservasi pada kadaver larva *O. rhinoceros* steril untuk mengetahui pengaruh preservasi terhadap viabilitas kapang *M. majus* UICC 295.

DAFTAR REFERENSI

- Abdullah, W. 2009. Isolasi dan pengujian kemampuan *Metarhizium majus* (Johnst.) Bisch., Rehner & Humber sebagai kapang entomopatogen dengan metode aplikasi pakan pada larva *Oryctes rhinoceros* Linn. Skripsi Sarjana Departemen Biologi FMIPA-UI, Depok: xi + 103 hlm.
- Atlas, R.M. 2004. *Handbook of microbiological media*. 3rd ed. CRC Press, Florida: 2051 hlm.
- Barreto, C.C., C.C. Staats, A. Schrank, & M.H. Vainstein. 2004. Distribution of chitinase in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. *Current Microbiology* **48**: 102--107.
- Benson. 2001. *Microbiological application laboratory manual*. 8th ed. The McGraw-Hill, 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.
- Bugeme, D.M., N.K. Maniania, M. Knapp & H.I. Boga. 2008. Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to *Tetranychus evansi*. *Experimental and Applied Acarology* **46**: 275--285.
- Capinera, J.L. 2008. *Encyclopedia of entomology*. 2nd ed. Springer, Florida: lxiv + 4345 hlm.
- Castrillo, L.A., D.W. Roberts & J.D. Vandenberg. 2005. The fungal past, present, and future: germination, ramification, and reproduction. *Journal of Invertebrate Pathology* **89**: 46-56.
- Chen, P-Y, A. Y-M. Lin, J. Mckittrick, & M.A. Meyers. 2008. Structure and mechanical properties of crab exoskeletons. *Acta Biomaterialia*. **4**: 587--596.

- Chian, Ri-Cheng & P. Quinn. 2010. *Fertility cryopreservation*. Cambridge University Press, New York: xiii + 271 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 & Teknologi Kayu Tropis* 5(2): 68--77.
- Digital. 2008. Colour chart for Faber Castell polychromos pencils and pastels. <http://www.drawinganddrafting.com/au/category2471.htm>, 25 Mei 2012, pk. 22.30.
- Doelle, H.W. 1994. *Microbial process development*. World Scientific Publishing, USA: xiii + 287 hlm.
- Einbu, A. 2007. Characterisation of chitin and a study of its acid-catalysed hydrolysis. Tesis Departemen Bioteknologi Fakultas Ilmu Pengetahuan Alam dan Teknologi Universitas Norwegia, Trondheim: vii + 75 hlm.
- Florida, E.B., P.B. Camilo, L. Mayorga-Reyes, R.G. Cervantes, P.M. Cruz, & A. Azaola. 2009. β -N-acetylglucosaminidase production by *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* ATCC 26854 by solid-state fermentation utilizing shrimp shell. *Interciencia* 34(5): 356--360.
- Gandjar, I., I. R. Koentjoro, W. Mangunwardoyo & L. Soebagya. 1992. *Pedoman praktikum mikrobiologi dasar*. Jurusan Biologi FMIPA UI, Depok: vii + 87 hlm.
- Gandjar, I., W. Sjamsuridzal & A. Oetari. 2006. *Mikologi: dasar dan terapan*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta: xii + 238 hlm.
- Gopal, M., A. Gupta, B. Sathiamma & C.P.R. Nair. 2002. Microbial pathogens of the coconut pest *Oryctes rhinoceros*: influence of weather factors on their infectivity and study of their coincidental ecology in Kerala, India. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18: 417--421.
- Gullan, P.J. & P.S. Cranston. 2010. *The insects: an outline of entomology*. 4th ed. Wiley-Blackwell, UK: xvi + 565 hlm.

- Hajek, Ann E. & I. Delalibera Jr. 2010. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. *BioControl* **55**: 147--158.
- Hasyim, A., H. Yasir, & Azwana. 2005. Seleksi substrat untuk perbanyakan *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin dan infektivitasnya terhadap hama penggerek bonggol pisang, *Cosmopolites sordides* Germar. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **15**(2): 116--123.
- Herlinda, S., M.D. Utama, Y. Pujiastuti, & Suwandi. 2006. Kerapatan dan viabilitas spora *Beauveria bassiana* (Bals.) akibat subkultur dan pengayaan media, serta virulensinya terhadap larva *Plutella xylostella* (Linn.). *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika* **6**(2): 70--78.
- Herlinda, S., C. Irsan, R. Mayasari & S. Septariani. 2010. Identification and selection of entomopathogenic fungi as biocontrol agents for *Aphis gossypii* from South Sumatra. *Microbiology Indonesia* **4**: 137--142.
- Hochberg, M.E. & J.K. Waage. 1991. A model for the biological control of *Oryctes rhinoceros* (Coleoptera: Scarabaeidae) by means of pathogens. *Journal of Applied Ecology* **28**: 514--531.
- Hogg, S. 2005. *Essential microbiology*. John Wiley & 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.
- Inglis, G.D, M.S. Goettel, T.M. Butt & H. Strasser. 2001. Use of Hypomycetous fungi for managing insect pests. Dalam: Butt, T.M., C.W. Jackson & N. Magan. 2001. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems, and potential*. CABI Publishing, London: x + 390 hlm.
- Kusnadi, Peristiwa, A. Syulasm, W. Purwianingsih & D. Rochintaniawati. 2003. *Mikrobiologi*. FPMIPA UPI, Bandung: ii + 409 hlm.

- Lastra, C.C.L., A.E. Hajek & R.A. Humber. 2002. Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Botany* **80**: 1126--1130.
- Leger, R.J.St., R.M. Cooper & A.K. Charnley. 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation production of chitinolytic enzymes. *Journal of General Microbiology* **132**: 1509--1517.
- Leland, J.E. 2001. Environmental-stress tolerant formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* for control of African desert locust (*Schistocerca gergaria*). Disertasi Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg: xviii + 173 hlm.
- Li, D.P. & Holdom D.G. 1995. Effects of nutrients on colony formation, growth, and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology* **65**: 253--260.
- 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. Prentice Hall Inc., New Jersey: xviii + 986 hlm.
- Madigan, M. T., J.M. Martinko, D.A. Stahl, & D.P. Clark. 2012. *Brock biology of microorganisms*. 13th ed. Pearson Education Inc., California: 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.
- Mantovani, T.R.D., G.A. Linde & N.B. Colauto. 2007. Effect of addition of nitrogen source to cassava fiber and carbon-to-nitrogen ratios on *Agaricus brasiliensis* growth. *Canadian Journal of Microbiology* **53**(1): 139--143.
- Matsumoto, K.S. 2006. Fungal chitinase. *Enzyme* **661**(186): 289--304.
- Murjito, N. 2010. Penggunaan metode *freezing* (-4°C) dan metode *liquid-drying* untuk preservasi strain-strain khamir *Basidiomycota* koleksi University of

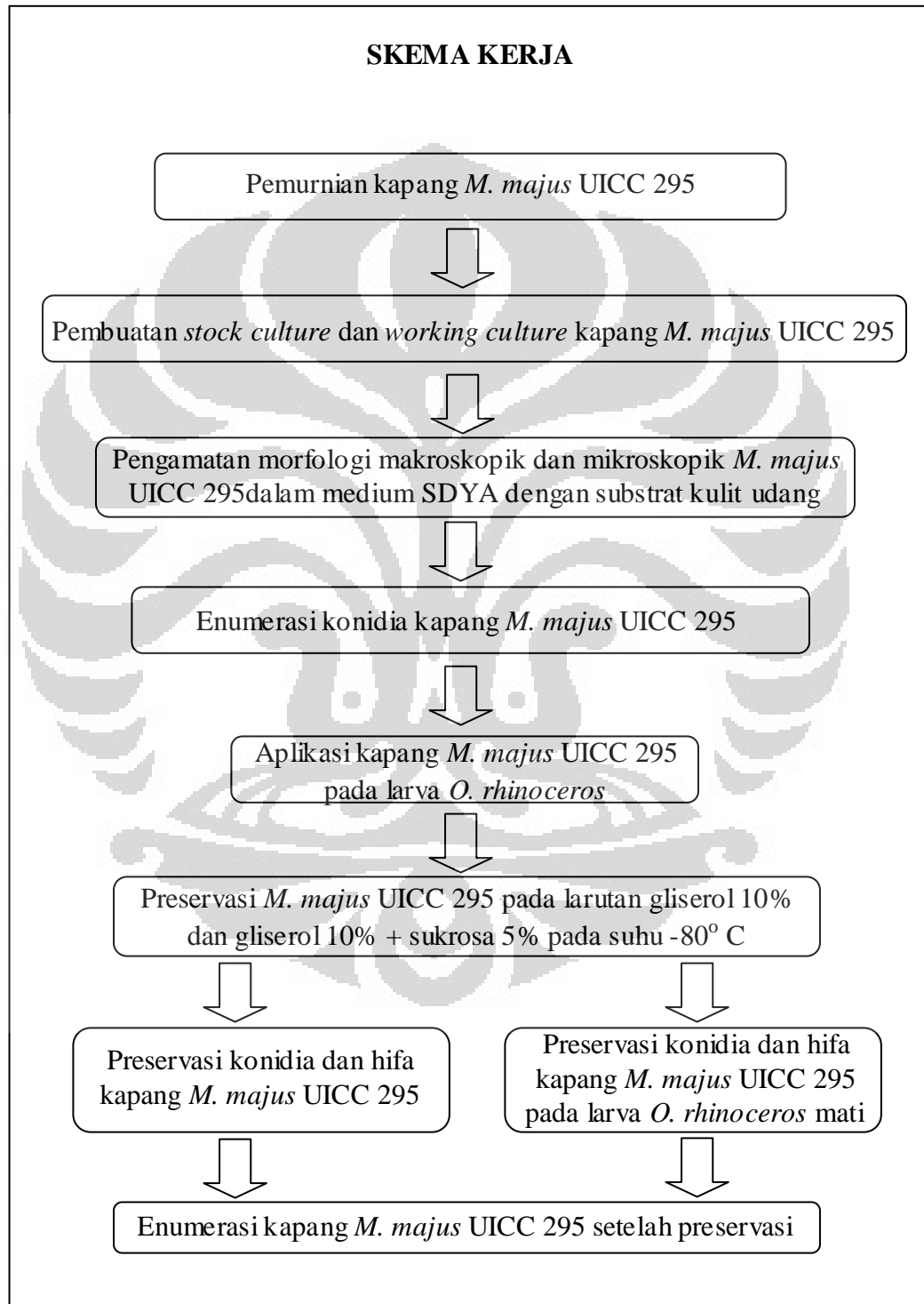
- Indonesia Culture Collection (UICC). Skripsi Sarjana Departemen Biologi FMIPA-UI, Depok: xv + 60 hlm.
- Nakasone, K.K., S.W. Peterson, & S-C. Jong. 2004. Preservation and distribution of fungal cultures. Dalam: Mueller, G.M., G.F. Bills, & M.S. Foster. *Biodiversity of fungi*. Elsevier Academic Press, 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.
- Pracaya. 2009. *Pengendalian hama dan penyakit tanaman secara organik*. Kanisius, Yogyakarta: 308 hlm.
- Prayogo, Y. 2006. Upaya mempertahankan keefektifan cendawan entomopatogen untuk mengendalikan hama tanaman pangan. *Jurnal Litbang Pertanian* **25**(2): 47--54.
- Prayogo, Y., W. Tengkan, & Marwoto. 2005. Prospek cendawan entomopatogen *Metarhizium anisopliae* untuk mengendalikan ulat grayak *Spodoptera litura* pada kedelai. *Jurnal Litbang Pertanian* **24**(1): 19--26.
- Putra, R. P. 2009. Isolasi dan pengujian kemampuan *Metarhizium majus* (Johnst.) Bisch., Rehner & Humber sebagai kapang entomopatogen dengan metode kontak langsung pada larva *Oryctes rhinoceros* Linn. Skripsi Sarjana Departemen Biologi FMIPA-UI, 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.
- Sambiran, W.J. & 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.
- Safavi, S.A., F.A. Shah, A.K. Pakdel, G.R. Rasouljan, A.R. Bandani & T.M. Butt. 2007. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology* **270**: 116--123.

- Seckbach, J. & M. Grube. 2010. *Symbiosis and stress: joint ventures in biology*. Springer, London: xxxii + 629 hlm.
- Siregar, J. 2012. Tingkat serangan kumbang badak (*Oryctes rhinoceros* L.) pada areal pertanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) berdasarkan umur tanaman. Skripsi Sarjana Departemen Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian USU, Medan: viii + 34 hlm.
- Skrobek, A., F.A. Shah, & T.M. Butt. 2008. Destruxin production by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* in insects and factors influencing their degradation. *BioControl* **53**: 361--373.
- Suresh, P.V. & M. Chandrasekaran. 1998. Utilization of prawn waste for chitinase production by the marine fungus *Beauveria bassiana* by solid state fermentation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **14**: 655--660.
- Thorp, J.H. & A.P. Covich. 2010. *Ecology and classification of North American freshwater invertebrates*. 3rd ed. Academic Press, London: xiii + 1021 hlm.
- Tzean, S.S., L.S. Hsieh, & W.J. Wu. 1997. *Atlas of entomopathogenic fungi from Taiwan*. Council of Agriculture, Taipei: vii + 214 hlm.
- Walker, G.M., & N.A. White. 2005. Introduction to fungal physiology. Dalam: Kavanagh, K. *Fungi biology and application*. John Wiley & Sons, Ltd., England: xi + 267 hlm.
- Webster, J. & W.S. Weber. 2007. *Introduction to fungi*. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge: xix + 841 hlm.
- Weinzierl, R. & T. Henn. 1991. *Alternatives in insects management: biological and biorational approaches*. North Central Regional Extension Publications: 73 hlm.
- Zaid, A., P.F. de Wet, M. Djerbi & A. Oihabi. 2006. Disease and pests of date palm. 23 April 2006: 50 hlm.
<http://www.fao.org/DOCREP/006/Y4360E/y4360e0g.htm>. 12 Juni 2012, pk 12.30.

LAMPIRAN

Lampiran 1

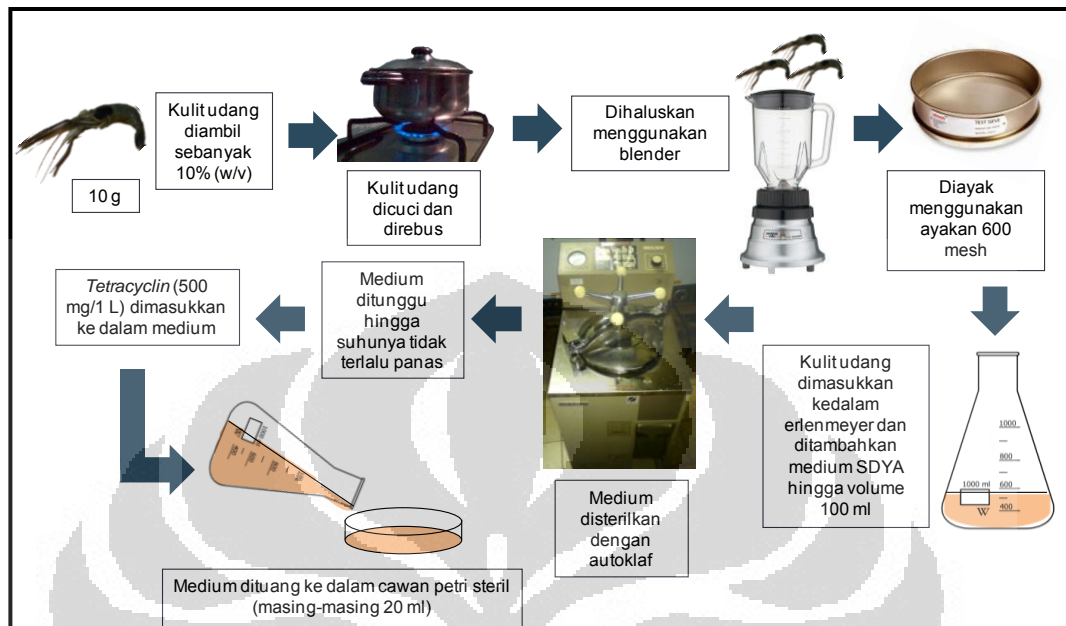
Skema kerja penelitian



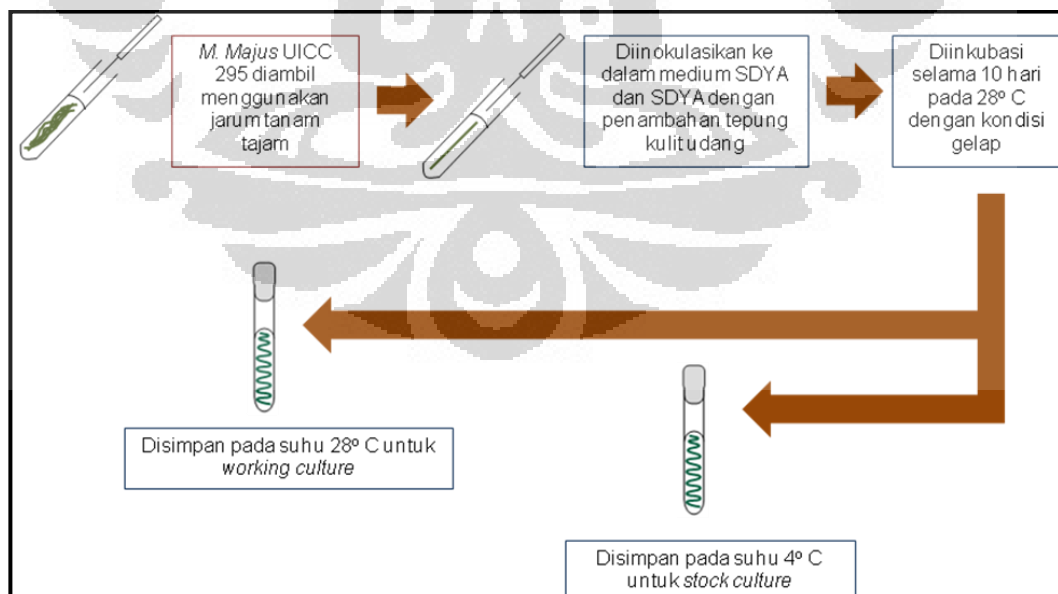
Lampiran 2
Standar Warna Faber Castell
[Sumber: Digital 2008: 1.]

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	vermilion	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

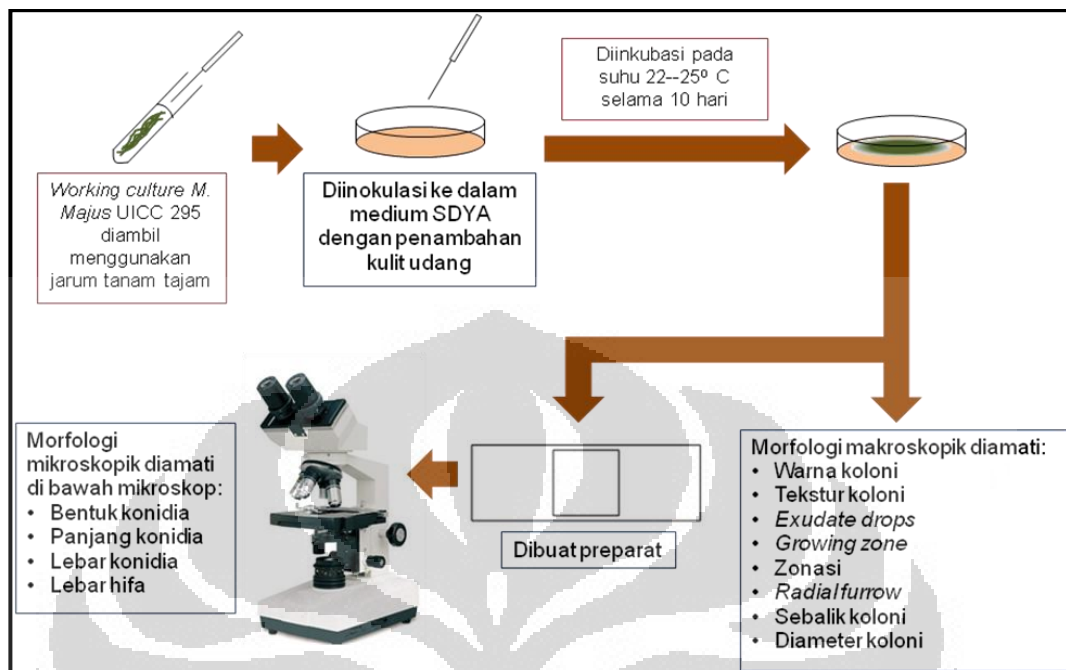
Lampiran 3
Skema Kerja Pembuatan Medium SDYA dengan Penambahan Kulit Udang 10% (b/v)



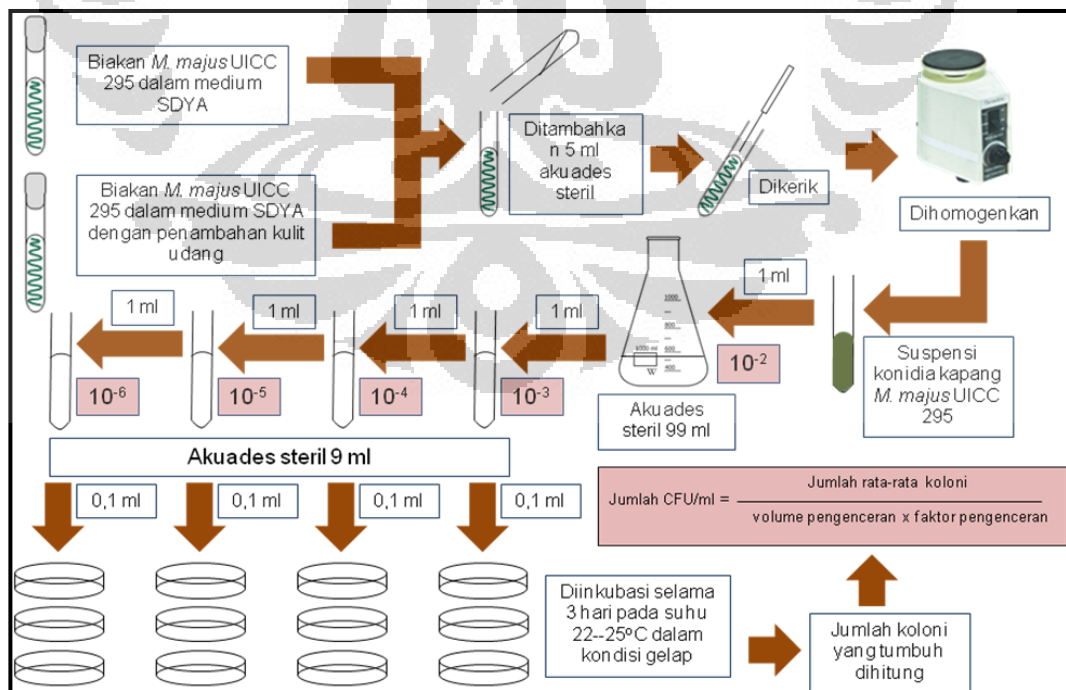
Lampiran 4
Skema Kerja Pembuatan *Stock Culture* dan *Working Culture* Kapang *M. majus* UICC 295



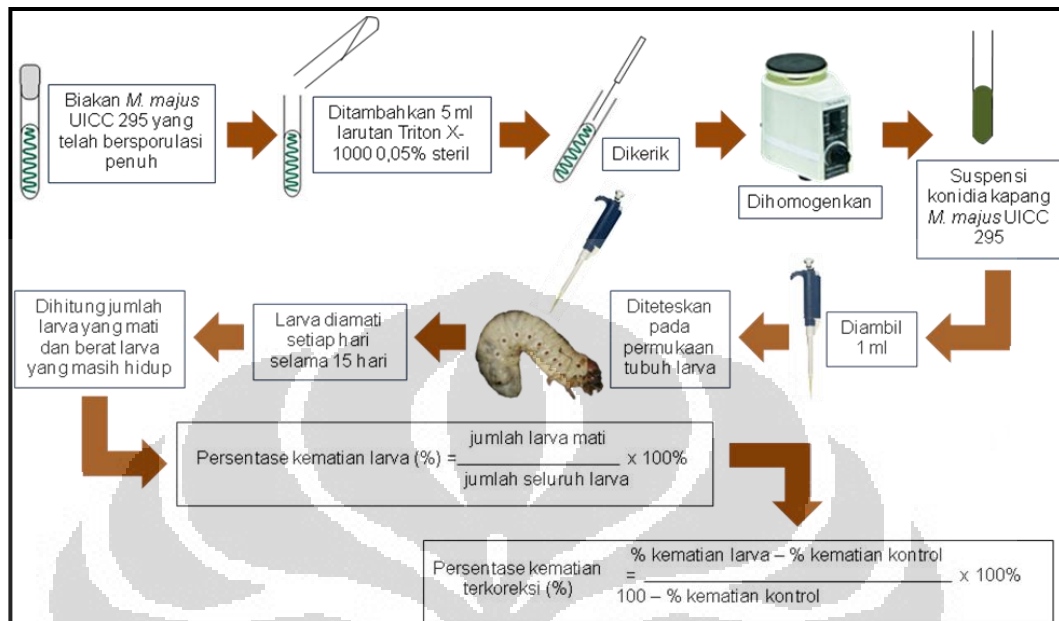
Lampiran 5
 Skema Kerja Pengamatan Morfologi Kapang *M. majus* UICC 295



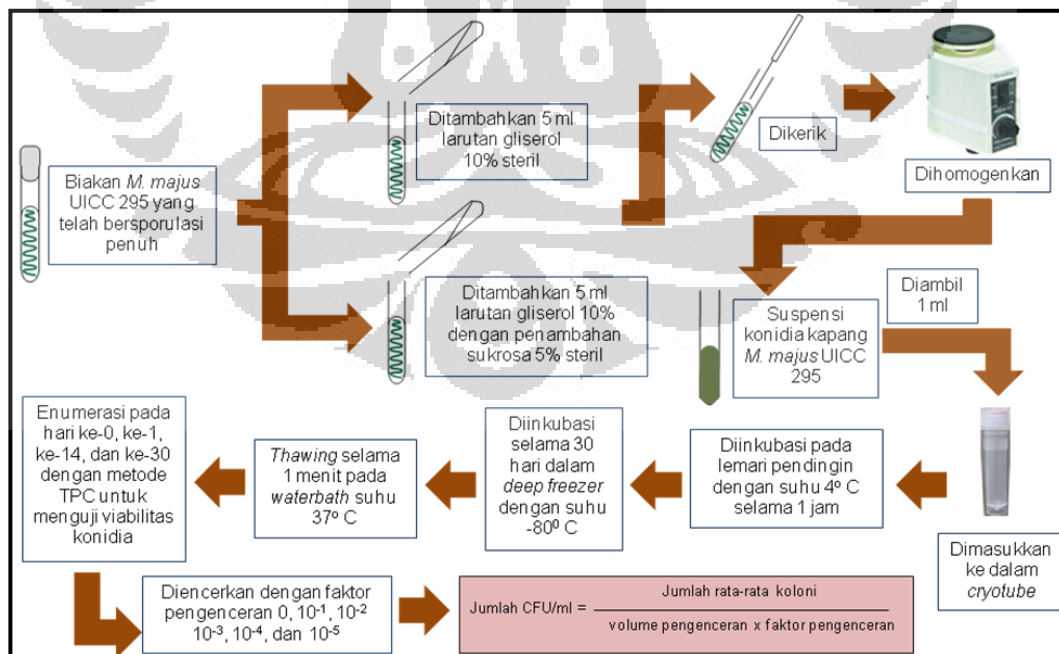
Lampiran 6
 Skema kerja enumerasi konidia/hifa *M. majus* UICC 295



Lampiran 7
Skema kerja aplikasi konidia/kapang *M. majus* UICC 295 pada larva *O. rhinoceros* dengan aplikasi kontak langsung

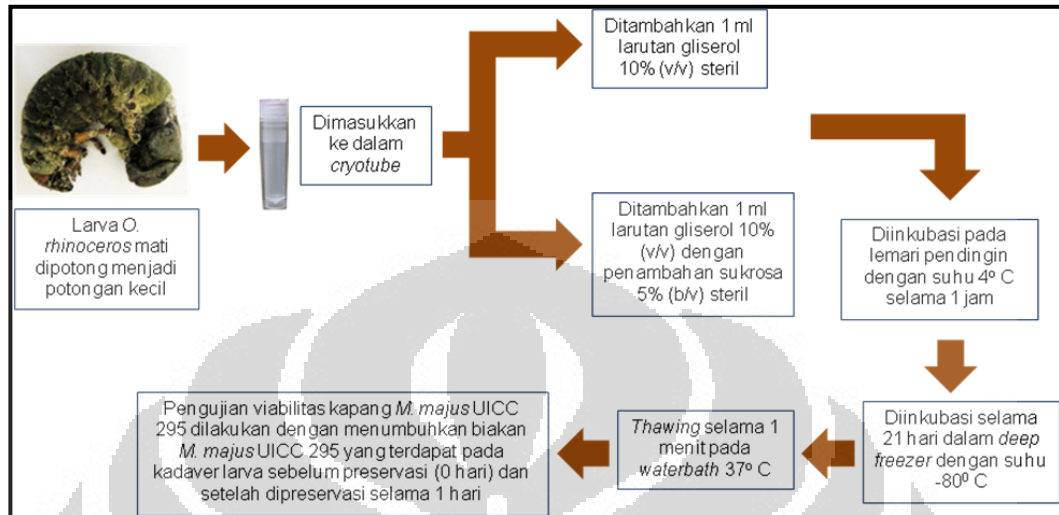


Lampiran 8
Skema kerja preservasi *M. majus* UICC 295 pada suhu -80°C



Lampiran 9

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



Lampiran 10
 Hasil pengukuran konidia dan hifa *M. majus* UICC 295 dalam medium
 SDYA umur 21 hari pada suhu 28° C

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	19,32--26,44	4,60--7,49	1,84--2,91
Rata-rata	23,757	6,041	2,343
SD	2,105	0,734	0,379

Lampiran 11
 Hasil pengukuran konidia dan hifa *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5% (b/v) umur 14 hari pada suhu 28° C

Ulangan ke-	Konidia		Lebar hifa (µm)
	Panjang (µm)	Lebar (µm)	
1	26,51	5,85	2,35
2	24,38	7,82	2,68
3	25,30	6,90	3,09
4	23,92	6,44	3,32
5	22,56	6,41	2,30
6	24,93	6,26	2,60
7	22,76	5,52	3,59
8	24,93	7,01	3,35
9	23,46	5,98	2,30
10	23,62	6,14	2,76
11	22,16	5,08	2,30
12	22,03	7,86	3,09
13	25,96	6,05	2,68
14	24,10	5,69	2,68
15	24,81	6,59	3,59
16	24,69	6,90	2,60
17	25,37	6,54	2,76
18	23,46	6,90	3,09
19	25,50	6,19	2,48
20	21,44	5,89	3,25
Kisaran	21,44--26,51	5,08--7,86	2,30--3,59
Rata-rata	24,094	6,401	2,843
SD	1,395	0,701	0,424

Lampiran 12
 Hasil pengukuran konidia dan hifa *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) umur 14 hari pada suhu 28° C

Ulangan ke-	Konidia		Lebar hifa (µm)
	Panjang (µm)	Lebar (µm)	
1	25,32	6,39	3,59
2	24,84	6,46	4,74
3	25,45	6,92	4,34
4	27,24	6,51	3,25
5	24,77	5,82	3,32
6	22,89	7,01	4,53
7	24,5	6,84	2,95
8	25,26	5,69	3,90
9	23,27	6,79	3,32
10	26,15	6,54	3,79
11	24,07	6,19	3,68
12	24,93	6,84	3,32
13	27,05	4,60	3,25
14	24,2	6,92	4,11
15	24,9	6,39	2,68
16	23,51	7,20	3,32
17	23,76	7,19	4,62
18	23,37	6,96	3,96
19	23,26	6,26	3,25
20	24,86	5,54	3,09
Kisaran	22,18--27,24	5,54--7,27	2,68--4,74
Rata-rata	24,68	6,453	3,650
SD	1,206	0,644	0,582

Lampiran 13
 Hasil pengukuran konidia dan hifa *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 15% (b/v) umur 14 hari pada suhu 28° C

Ulangan ke-	Konidia		Lebar hifa (µm)
	Panjang (µm)	Lebar (µm)	
1	25,01	6,19	4,55
2	26,22	6,44	4,14
3	21,70	6,41	3,09
4	24,88	6,00	3,60
5	23,21	6,63	4,34
6	21,44	4,98	3,22
7	26,77	6,41	3,62
8	25,00	6,59	3,59
9	26,06	4,95	3,25
10	26,02	6,84	4,14
11	25,75	6,90	4,53
12	25,40	6,63	3,09
13	23,27	6,70	3,50
14	23,87	6,00	3,36
15	25,20	6,41	3,71
16	23,53	6,92	3,96
17	24,77	5,56	2,76
18	26,67	6,59	3,32
19	24,08	6,59	4,36
20	25,05	6,19	4,04
Kisaran	21,44--26,77	4,95--6,92	2,76--4,55
Rata-rata	24,695	6,297	3,708
SD	1,497	0,564	0,524

Lampiran 14
 Hasil uji ANOVA panjang konidia *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang

Medium	Rata-rata	SD	P value
SDYA	23,76	2,11	
SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5%	24,09	1,40	
SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10%	24,68	1,21	0,177
SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 15%	24,70	1,50	

Keterangan: P value (*probability value*) lebih kecil dari 0,05 = terdapat perbedaan

Lampiran 15
 Hasil uji ANOVA lebar konidia *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang

Medium	Rata-rata	SD	P value
SDYA	6,04	0,73	
SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5%	6,40	0,70	
SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10%	6,45	0,64	0,214
SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 15%	6,30	0,56	

Keterangan: P value (*probability value*) lebih kecil dari 0,05 = terdapat perbedaan

Lampiran 16
 Hasil uji ANOVA lebar hifa *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang

Medium	Rata-rata	SD	P value
SDYA	2,34	0,38	
SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 5%	2,84	0,42	
SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10%	3,65	0,58	0,000
SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 15%	3,71	0,52	

Keterangan: P value (*probability value*) lebih kecil dari 0,05 = terdapat perbedaan

Lampiran 17
 Hasil uji Tukey lebar hifa *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang

	Perlakuan	Perbedaan rata-rata	P value
SDYA	SDYA + tepung kulit udang 5%	-0,5000	0,009
	SDYA + tepung kulit udang 10%	-1,3075	0,000
	SDYA + tepung kulit udang 15%	-1,3655	0,000
SDYA + tepung kulit udang 5%	SDYA	0,5000	0,009
	SDYA + tepung kulit udang 10%	-0,8075	0,000
	SDYA + tepung kulit udang 15%	-0,8655	0,000
SDYA + tepung kulit udang 10%	SDYA	1,3075	0,000
	SDYA + tepung kulit udang 5%	0,8075	0,000
	SDYA + tepung kulit udang 15%	-0,580	0,981
SDYA + tepung kulit udang 15%	SDYA	1,3655	0,000
	SDYA + tepung kulit udang 5%	0,8655	0,000
	SDYA + tepung kulit udang 10%	0,580	0,981

Keterangan: P value (*probability value*) lebih kecil dari 0,05 = berbeda nyata

Lampiran 18
 Jumlah larva yang mati, kelembaban relatif, dan suhu ruang selama 15 hari pengamatan pada pengujian suspensi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA

Hari ke-	Jumlah larva mati						Kelembaban relatif (%)	Suhu ruang (° C)
	KP S 1	KP S 2	KP S 3	KK 1	KK 2	KK 3		
0	-	-	-	-	-	-	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	-	-	-	90	28,2
9	5	4	1	-	-	-	88	28,0
10	2	1	1	-	-	-	88	27,5
11	1	3	3	-	-	-	88	28,1
12	-	-	-	-	-	-	90	27,2
13	-	-	-	-	-	-	90	27,1
14	-	-	-	-	-	-	88	27,6
15	-	-	-	-	-	-	88	27,4
Total	10	10	10					
	Rata-rata						87±5,05	27,8±0,39

Keterangan: KP S : kelompok perlakuan *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA
 KK : kelompok kontrol

Lampiran 19
 Jumlah larva mati, kelembaban relatif, dan suhu ruang selama 30 hari pengamatan pada pengujian suspensi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 dalam SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v)

Hari ke-	Jumlah larva mati						Kelembaban relatif (%)	Suhu ruang (° C)
	KP KU 1	KP KU 2	KP KU 3	KK 1	KK 2	KK 3		
0	-	-	-	-	-	-	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	-	-	-	-	-	-	74	28,1
8	-	-	-	-	-	-	90	28,2
9	-	-	-	-	-	-	88	28,0
10	-	-	-	-	-	-	88	27,5
11	-	-	-	-	-	-	88	28,1
12	1	1	-	-	-	-	90	27,2
13	-	-	1	-	-	-	90	27,1
14	-	-	-	-	-	-	88	27,6
15	-	-	1	-	-	-	88	27,4
16	-	-	-	-	-	-	88	27,9
17	-	1	1	-	-	-	86	27,5
18	-	-	-	-	-	-	87	27,6
19	-	-	-	-	-	-	86	27,4
20	-	-	-	-	-	-	86	27,6
21	-	-	-	-	-	-	87	27,5
22	-	-	-	-	-	-	87	27,6
23	-	1	-	-	-	-	86	27,4
24	-	1	-	-	-	-	84	27,6
25	-	-	-	-	-	-	86	27,6
26	-	-	-	-	-	-	86	27
27	-	-	-	-	-	-	86	27,3
28	2	-	1	-	-	-	88	27,2
29	-	-	-	-	-	-	88	27
30	-	1	-	-	-	-	89	27

Keterangan: KP KU : kelompok perlakuan *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10%
 KK : kelompok kontrol

Lampiran 20
Berat larva yang masih hidup pada kelompok kontrol (g)

Kode Larva	Aplikasi dilakukan	Penimbangan ke-									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15	Hari ke-18	Hari ke-21	Hari ke-24	Hari ke-27	Hari ke-30
KK 1.1	7,85	7,90	8,11	8,22	7,80	7,79	7,81	7,80	7,84	7,84	7,88
KK 1.2	7,80	7,91	7,94	7,84	7,70	7,49	7,66	7,70	7,76	7,52	7,45
KK 1.3	7,71	7,61	7,51	7,55	7,30	7,36	7,58	7,60	7,62	7,64	7,67
KK 1.4	7,66	7,73	7,78	7,87	7,30	7,20	7,25	7,28	7,34	7,51	7,44
KK 1.5	7,63	7,65	7,64	7,74	7,90	7,63	7,71	7,68	7,72	7,71	7,70
KK 1.6	7,48	7,50	7,59	7,16	6,90	6,76	6,77	6,80	6,77	6,58	6,74
KK 1.7	7,40	7,31	7,50	7,04	7,61	7,57	7,55	7,60	7,65	7,64	7,60
KK 1.8	7,10	7,15	7,84	7,50	7,67	7,61	7,63	7,66	7,71	7,70	7,72
KK 1.9	7,09	7,18	7,03	7,00	7,13	7,24	7,22	7,20	7,19	7,16	7,17
KK 1.10	6,99	6,87	6,55	6,83	6,60	6,76	6,73	6,72	6,75	6,77	6,82
Rata-rata	7,47	7,48	7,55	7,48	7,39	7,34	7,39	7,40	7,44	7,41	7,42
KK 2.1	6,98	7,05	7,02	6,70	6,60	6,60	6,62	6,70	6,73	6,78	6,80
KK 2.2	6,93	7,13	7,72	6,98	7,10	7,11	7,15	7,20	7,18	7,21	7,22
KK 2.3	6,91	6,87	6,94	6,82	6,80	6,50	6,53	6,72	6,74	6,70	6,75
KK 2.4	6,89	6,91	6,90	6,72	6,30	5,99	6,04	6,14	6,30	6,28	6,35
KK 2.5	6,83	6,80	6,70	6,03	6,51	6,57	6,53	6,40	6,45	6,47	6,46
KK 2.6	6,81	6,78	6,93	7,18	6,90	6,59	6,61	6,63	6,85	6,91	6,91
KK 2.7	6,64	6,89	6,96	6,63	6,60	6,41	6,40	6,51	6,53	6,57	6,81
KK 2.8	6,47	6,51	6,42	6,49	6,20	6,09	6,06	6,17	6,27	6,34	6,38
KK 2.9	6,31	6,28	6,24	6,06	6,30	6,16	6,21	6,31	6,42	6,43	6,40
KK 2.10	6,19	6,20	6,14	6,46	6,20	5,95	6,01	6,18	6,22	6,27	6,25
Rata-rata	6,70	6,74	6,80	6,61	6,55	6,40	6,50	6,57	6,60	6,63	6,50
KK 3.1	5,86	5,85	5,85	5,96	5,50	5,57	5,55	5,58	5,62	5,60	5,61
KK 3.2	5,76	5,80	6,30	5,78	6,10	5,88	5,91	6,01	6,11	6,08	6,06
KK 3.3	5,70	5,76	5,64	5,78	5,50	5,56	5,55	5,58	5,63	5,67	5,71
KK 3.4	5,66	5,79	5,98	6,19	6,10	5,94	5,98	6,03	6,04	6,11	6,15
KK 3.5	5,64	5,69	5,78	5,92	5,70	5,29	5,35	5,42	5,69	5,71	5,74
KK 3.6	5,44	5,50	5,49	5,81	5,70	5,38	5,41	5,50	5,57	5,65	5,68
KK 3.7	5,40	5,31	5,25	5,37	5,20	4,85	5,23	5,32	5,37	5,38	5,48
KK 3.8	5,39	5,48	5,45	5,49	5,30	5,07	5,17	5,23	5,36	5,41	5,45
KK 3.9	5,16	5,25	5,07	5,42	5,20	4,92	5,11	5,18	5,24	5,37	5,40
KK 3.10	5,02	5,03	4,60	4,75	4,20	4,22	4,30	4,35	4,37	4,46	4,41
Rata-rata	5,50	5,55	5,54	5,65	5,45	5,27	5,42	5,50	5,54	5,57	5,42

Lampiran 21
 Berat larva yang masih hidup setelah aplikasi pada pengujian suspensi konidia/hifa
M. majus UICC 295 dalam medium SDYA (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
KP S 1.1	9,49	9,63	9,91	mati	mati	mati
KP S 1.2	9,43	9,22	9,31	8,19	mati	mati
KP S 1.3	9,39	9,28	8,43	mati	mati	mati
KP S 1.4	9,36	9,54	9,82	mati	mati	mati
KP S 1.5	9,35	9,46	9,59	mati	mati	mati
KP S 1.6	9,31	9,27	9,14	6,69	mati	mati
KP S 1.7	9,21	8,88	8,63	6,44	mati	mati
KP S 1.8	9,04	8,70	8,63	7,37	mati	mati
KP S 1.9	8,96	8,60	7,14	6,38	mati	mati
KP S 1.10	8,94	8,82	8,72	6,87	mati	mati
Rata-rata	9,25	9,14	8,93	6,99		
KP S 2.1	8,91	8,92	8,98	8,66	mati	mati
KP S 2.2	8,85	8,78	8,75	mati	mati	mati
KP S 2.3	8,82	8,92	9,09	8,42	mati	mati
KP S 2.4	8,73	8,71	8,54	mati	mati	mati
KP S 2.5	8,68	8,42	8,30	6,60	mati	mati
KP S 2.6	8,64	8,29	6,69	mati	mati	mati
KP S 2.7	8,61	8,52	7,25	6,82	mati	mati
KP S 2.8	8,60	8,44	8,33	mati	mati	mati
KP S 2.9	8,58	7,98	6,72	mati	mati	mati
KP S 2.10	8,57	8,52	8,46	7,67	mati	mati
Rata-rata	8,70	8,55	8,11	7,63		
KP S 3.1	8,57	8,45	8,23	7,05	mati	mati
KP S 3.2	8,46	8,21	8,08	mati	mati	mati
KP S 3.3	8,46	8,44	8,55	mati	mati	mati
KP S 3.4	8,45	7,82	5,57	mati	mati	mati
KP S 3.5	8,19	7,96	7,98	mati	mati	mati
KP S 3.6	8,19	8,29	8,38	7,54	mati	mati
KP S 3.7	8,06	8,22	8,32	mati	mati	mati
KP S 3.8	7,99	7,92	7,81	mati	mati	mati
KP S 3.9	7,96	8,08	8,11	7,32	mati	mati
KP S 3.10	7,88	8,01	8,23	6,90	mati	mati
Rata-rata	8,22	8,14	7,93	7,20		

Lampiran 22

Berat larva yang masih hidup setelah aplikasi pada pengujian suspensi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA dengan penambahan tepung kulit udang 10% (b/v) (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	6 Hari ke-18	7 Hari ke-21	8 Hari ke-24	9 Hari ke-27	10 Hari ke-30
KP KU 1.1	14,95	14,93	14,95	14,38	14,26	14,32	13,65	13,12	12,74	12,31	12,00
KP KU 1.2	14,71	14,6	14,19	13,88	13,35	13,52	13,42	13,38	13,21	13,07	12,71
KP KU 1.3	14,71	14,75	14,94	14,78	mati	mati	mati	mati	mati	mati	mati
KP KU 1.4	14,66	14,5	14,18	14,28	13,92	12,32	11,86	11,39	10,87	9,56	9,04
KP KU 1.5	14,59	14,6	14,22	14,27	13,76	13,95	13,87	13,71	13,69	13,52	12,63
KP KU 1.6	14,19	14,05	13,69	13,31	13,91	13,97	13,84	13,65	13,50	13,44	mati
KP KU 1.7	14,04	14,03	14,11	13,51	14,02	13,74	13,80	13,75	13,73	13,73	13,70
KP KU 1.8	14,00	14,00	13,88	13,19	13,71	13,05	13,12	13,10	13,01	12,95	12,76
KP KU 1.9	13,99	13,88	13,75	13,54	13,63	13,38	13,27	13,11	13,09	12,54	12,01
KP KU 1.10	13,90	13,73	13,57	13,19	13,71	13,22	13,19	13,14	13,08	13,02	mati
Rata-rata	14,37	14,31	14,15	13,83	13,81	13,50	13,34	13,15	12,99	12,68	12,12
KP KU 2.1	13,89	13,79	13,47	13,19	13,04	13,12	13,02	12,76	12,31	11,73	10,83
KP KU 2.2	13,86	13,85	13,13	12,67	12,91	13,10	13,07	12,81	12,31	12,63	12,07
KP KU 2.3	13,79	13,79	13,77	13,32	12,91	10,66	9,11	7,87	6,15	5,58	5,02
KP KU 2.4	13,78	13,78	13,99	13,54	13,35	12,25	mati	mati	mati	mati	mati
KP KU 2.5	13,72	13,63	13,18	12,85	12,67	12,33	12,03	11,54	10,95	10,43	9,98
KP KU 2.6	13,67	13,59	13,10	12,94	13,11	12,74	12,87	12,94	13,01	13,09	13,13
KP KU 2.7	13,66	13,51	13,06	12,27	mati	mati	mati	mati	mati	mati	mati
KP KU 2.8	13,62	13,51	13,09	12,21	11,95	12,03	11,85	11,23	mati	mati	mati
KP KU 2.9	13,55	13,53	13,48	13,00	13,12	12,70	12,31	12,11	12,01	11,81	mati
KP KU 2.10	13,53	13,51	13,62	12,92	13,60	12,97	12,77	12,31	mati	mati	mati
Rata-rata	13,71	13,65	13,39	12,89	12,96	12,43	12,13	11,70	11,12	10,88	10,21
KP KU 3.1	13,49	13,48	13,45	13,08	13,04	12,82	12,35	12,01	11,98	11,88	11,34
KP KU 3.2	13,40	13,59	13,73	13,30	12,41	13,14	12,84	12,21	11,75	11,28	mati
KP KU 3.3	13,30	13,28	13,22	12,86	13,03	11,66	mati	mati	mati	mati	mati
KP KU 3.4	13,29	13,25	12,97	12,41	12,01	mati	mati	mati	mati	mati	mati
KP KU 3.5	13,27	13,12	12,60	11,94	12,12	11,94	12,01	12,15	12,03	11,96	11,94
KP KU 3.6	13,27	13,25	13,21	12,79	13,14	12,97	12,81	12,51	12,19	11,44	11,07
KP KU 3.7	13,21	13,18	12,62	12,50	12,12	10,38	9,11	8,61	7,94	6,48	5,13
KP KU 3.8	13,20	13,15	12,61	12,33	11,57	10,94	9,11	9,04	8,12	8,20	8,02
KP KU 3.9	13,18	13,20	13,24	12,22	12,63	12,66	12,43	12,29	12,04	11,99	11,56
KP KU 3.10	13,16	13,16	13,15	11,97	12,61	mati	mati	mati	mati	mati	mati
Rata-rata	13,277	13,266	13,08	12,54	12,47	12,06	11,52	11,26	10,86	10,46	9,84

Lampiran 23
 Hasil enumerasi *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA setelah dipreservasi selama 30 hari menggunakan akuades pada suhu -80° C

Hari ke-	Pengenceran	Pengulangan	Σ Koloni 6 hari		Σ CFU (CFU/ml)		Σ CFU rata-rata (CFU/ml) ± SD	
			Batch		Batch		Batch	
			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	6,2 x 10 ⁶	4,4 x 10 ⁶		
		3	75	44			6,63 x 10 ⁶	3,45 x 10 ⁶
	10 ⁻⁵	1	10	4				
		2	5	5	7,0 x 10 ⁶	4,3 x 10 ⁶		
		3	6	4				
	10 ⁻⁶	1	1	-				
		2	-	-	6,7 x 10 ⁶	-		
		3	1	-				
1	10 ⁻³	1	>300	135				
		2	>300	112	-	1,29 x 10 ⁶		
		3	>300	139				
	10 ⁻⁴	1	29	35				
		2	41	20	5,1 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶	3,7 x 10 ⁶	1,56 x 10 ⁶
		3	84	17				
	10 ⁻⁵	1	1	1				
		2	4	1	2,3 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁶		
		3	2	1				
14	10 ⁻³	1	101	98				
		2	113	118	1,06 x 10 ⁶	1,08 x 10 ⁶		
		3	104	109				
	10 ⁻⁴	1	40	18				
		2	54	17	4,8 x 10 ⁶	1,77 x 10 ⁶	3,39 x 10 ⁶	1,51 x 10 ⁶
		3	50	18				
	10 ⁻⁵	1	4	2				
		2	4	2	4,3 x 10 ⁶	1,67 x 10 ⁶		
		3	5	1				

Lampiran 23
(Lanjutan)

Hari ke-	Pengenceran	Pengulangan	Σ Koloni 6 hari		Σ CFU (CFU/ml)		Σ CFU rata-rata (CFU/ml) \pm SD	
			Batch		Batch		Batch	
			1	2	1	2	1	2
30	10^{-3}	1	144	101	$1,57 \times 10^6$	$1,02 \times 10^6$	$3,13 \times 10^6$	$1,20 \times 10^6$
		2	194	100				
		3	133	105				
	10^{-4}	1	32	11	$3,50 \times 10^6$	$1,26 \times 10^6$	$3,13 \times 10^6$	$1,20 \times 10^6$
		2	36	15				
		3	37	12				
	10^{-5}	1	7	1	$4,33 \times 10^6$	$1,33 \times 10^6$	$3,13 \times 10^6$	$1,20 \times 10^6$
		2	3	1				
		3	3	2				

Lampiran 24

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

Hari ke-	Pengenceran	Pengulangan	Σ Koloni 6 hari		Σ CFU (CFU/ml)		Σ CFU rata-rata (CFU/ml) \pm SD	
			Batch		Batch		Batch	
			1	2	1	2	1	2
0	10^{-3}	1	137	141	$1,4 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$
		2	149	132				
		3	134	137				
0	10^{-4}	1	4	22	$2,6 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$
		2	40	34				
		3	36	13				
0	10^{-5}	1	4	3	2×10^6	3×10^6	$2,0 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$
		2	0	1				
		3	2	5				

Lampiran 24
(Lanjutan)

Hari ke-	Pengenceran	Pengulangan	Σ Koloni 6 hari		Σ CFU (CFU/ml)		Σ CFU rata-rata (CFU/ml) ± SD	
			Batch		Batch		Batch	
			1	2	1	2	1	2
1	10 ⁻³	1	122	134				
		2	118	126	1,2 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶		
		3	120	137				
	10 ⁻⁴	1	29	31				
		2	28	25	2,9 x 10 ⁶	2,8 x 10 ⁶	2,03 x 10 ⁶	2,13 x 10 ⁶
		3	21	30				
	10 ⁻⁵	1	2	4				
		2	1	2	2,0 x 10 ⁶	2,3 x 10 ⁶		
		3	3	1				
14	10 ⁻¹	1	96	166				
		2	103	91	1,29 x 10 ⁴	1,37 x 10 ⁴		
		3	188	155				
	10 ⁻²	1	19	18				
		2	21	14	1,7 x 10 ⁴	1,87 x 10 ⁴	1,44 x 10 ⁴	1,64 x 10 ⁴
		3	11	24				
	10 ⁻³	1	1	2				
		2	2	0	1,33 x 10 ⁴	1,67 x 10 ⁴		
		3	1	3				
30	10 ⁻¹	1	74					
		2	119		1,01 x 10 ⁴			
		3	110					
	10 ⁻²	1	8					
		2	9		0,7 x 10 ⁴		0,90 x 10 ⁴	
		3	5					
	10 ⁻³	1	0					
		2	1		1 x 10 ⁴			
		3	2					

Lampiran 25
 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-	Pengenceran	Pengulangan	Σ Koloni		Σ CFU (CFU/ml)		Σ CFU rata-rata (CFU/ml) ± SD	
			Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2
0	10 ⁻³	1	>300	186				
		2	>300	156	-	1,67		
		3	>300	161		x 10 ⁶		
	10 ⁻⁴	1	56	44				
		2	55	45	6,20 x	4,40		
		3	75	44	10 ⁶	x 10 ⁶		
	10 ⁻⁵	1	10	4			6,63	3,45
		2	5	5	7,00 x	4,30	x 10 ⁶	x 10 ⁶
		3	6	4				
	10 ⁻⁶	1	1	-				
		2	0	-	6,70 x			
		3	1	-	10 ⁶			
1	10 ⁻³	1	160	121				
		2	164	134	1,52 x	1,26		
		3	131	124	10 ⁶	x 10 ⁶		
	10 ⁻⁴	1	65	32				
		2	75	46	7,03 x	3,76	4,63	2,78
		3	71	35	10 ⁶	x 10 ⁶	x 10 ⁶	x 10 ⁶
	10 ⁻⁵	1	8	5				
		2	2	3	5,33 x	3,33		
		3	6	2	10 ⁶	x 10 ⁶		
14	10 ⁻²	1	159	122				
		2	163	138	1,45 x	1,26		
		3	112	117	10 ⁵	x 10 ⁵		
	10 ⁻³	1	17	10				
		2	30	14	2,57 x	1,47	2,67	2,02
		3	30	21	10 ⁵	x 10 ⁵	x 10 ⁵	x 10 ⁵
	10 ⁻⁴	1	5	4				
		2	4	3	4,00 x	3,33		
		3	3	3	10 ⁵	x 10 ⁵		

Lampiran 25
(Lanjutan)

Hari ke-	Pengenceran	Pengulangan	Σ Koloni		Σ CFU (CFU/ml)		Σ CFU rata-rata (CFU/ml) ± SD	
			Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2
30	10 ⁻²	1	111	127	1,33 x 10 ⁵	1,20 x 10 ⁵	1,24 x 10 ⁵	1,11 x 10 ⁵
		2	148	112				
		3	141	121				
	10 ⁻³	1	7	11	1,16 x 10 ⁵	1,13 x 10 ⁵	1,24 x 10 ⁵	1,11 x 10 ⁵
		2	17	10				
		3	11	13				
	10 ⁻⁴	1	-	1	-	1,05 x 10 ⁵	-	-
		2	-	1				
		3	-	1				

Lampiran 26

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

Hari ke-	Pengenceran	Pengulangan	Σ Koloni		Σ CFU (CFU/ml)		Σ CFU rata-rata (CFU/ml) ± SD	
			Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2
0	10 ⁻³	1	>300	186	-	1,67 x 10 ⁶	6,63 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	6,63 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	6,63 x 10 ⁶	3,45 x 10 ⁶
		2	5	5				
		3	6	4				
10 ⁻⁶	1	1	-	6,70 x 10 ⁶	-	6,63 x 10 ⁶	3,45 x 10 ⁶	
	2	0	-					
	3	1	-					

Lampiran 26
(Lanjutan)

Hari ke-	Pengenceran	Pengulangan	Σ Koloni		Σ CFU (CFU/ml)		Σ CFU rata-rata (CFU/ml) ± SD	
			Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2
1	10 ⁻³	1	200	198	2,25 x 10 ⁶	2,21 x 10 ⁶	4,47 x 10 ⁶	4,18 x 10 ⁶
		2	231	211				
		3	244	254				
	10 ⁻⁴	1	36	51	5,87 x 10 ⁶	5,03 x 10 ⁶	4,47 x 10 ⁶	4,18 x 10 ⁶
		2	62	42				
		3	78	58				
	10 ⁻⁵	1	8	4	5,3 x 10 ⁶	5,3 x 10 ⁶		
		2	2	5				
		3	6	7				
14	10 ⁻³	1	154	148	1,42 x 10 ⁶	1,54 x 10 ⁶	2,65 x 10 ⁶	2,35 x 10 ⁶
		2	140	153				
		3	131	161				
	10 ⁻⁴	1	31	35	4,53 x 10 ⁶	3,83 x 10 ⁶	2,65 x 10 ⁶	2,35 x 10 ⁶
		2	82	47				
		3	23	33				
	10 ⁻⁵	1	0	1	2 x 10 ⁶	1,67 x 10 ⁶		
		2	3	3				
		3	3	1				
30	10 ⁻³	1	88	8,17 x 10 ⁵		7,92 x 10 ⁵		
		2	101					
		3	56					
	10 ⁻⁴	1	7	7,67 x 10 ⁵				
		2	8					
		3	8					