



**UNIVERSITAS INDONESIA**

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

**SKRIPSI**

**GRAND SEPTIA YAMA  
0806327263**

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



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PENGARUH PENAMBAHAN TEPUNG CANGKANG  
KEPITING 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**

**GRAND SEPTIA YAMA  
0806327263**

**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 : Grand Septia Yama

NPM : 0806327263

Tanda tangan : 




Tanggal : 26 Juni 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Grand Septia Yama  
NPM : 0806327263  
Program Studi : S1 Biologi  
Judul Skripsi : Pengaruh Penambahan Tepung Cangkang Kepiting 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. Adi Basukriadi, M.Sc. 

Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : 26 Juni 2012

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah rabbil'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. Penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ariyanti Oetari, Ph.D. selaku pembimbing atas bimbingan, motivasi, perhatian, dan kesabaran, serta sumbangan pikiran selama penelitian hingga tersusunnya skripsi.
2. *University of Indonesia Culture Collection (UICC)* yang telah membiayai penelitian ini.
3. Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D. dan Dr. Adi Basukriadi M.Sc. 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 atas bekal ilmu yang penulis terima, perhatian dan dukungannya.
5. Dr. Dadang Kusmana M.Sc. 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. Prof. Akira Yokota atas bantuan yang diberikan sehingga penelitian berlangsung dengan baik.
8. Ahmad Supriyadi S.Pi, Asri Martini S.Si, dan seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA UI atas semua bantuan yang diberikan.
9. Kedua orang tuaku Yusup Yama dan Sri Nirwana atas do'a, kasih sayang, pengertian, pengorbanan, serta dukungan moril dan materil yang selalu diberikan hingga skripsi ini dapat diselesaikan.

10. Saudara-saudaraku tersayang, Opa Eiji Yoshizawa, Anna, Riris, Mareta, Rita Dwi Pratiwi, Ambar Kusharyadi, dan Aris Setiadi, atas do'a, dukungan, semangat, dan kebersamaan yang selalu menjadi motivasi bagi penulis.
11. Cinthya Karlina, Dhian Chitra Ayu, Oktarina Sumandari, dan Nur Amalina selaku teman seperjuangan yang selalu bersama dalam suka maupun duka selama masa penelitian dan penulisan skripsi ini.
12. Gubug Makan Mang Engking, khususnya Bapak Sutopo dan seluruh karyawan yang telah membantu menyediakan limbah cangkang kepiting serta Bapak Endi dan Bapak Sangsang yang telah menyediakan larva yang digunakan dalam penelitian.
13. Teman-teman di Laboratorium Mikrobiologi, DIVAS (Dila, Savitry, Hanum, dan Seyla), DEMON (Dessy, Edvan, Michelle, Usman, dan Alvin), CITRUS (Rizky, Nova, Rusli, dan Sentot), Kak Dafina, Kak Irvan, Mbak Reno, Mbak Dahlia, Mbak Murni, Bu Retno, Kak Bama, Kak Doni, Kak Galuh dan NADIN (Hanna dan Muhabidin) yang telah banyak membantu dan memberi masukan dalam menyelesaikan penelitian.
14. Eko Aditya yang selalu memberikan do'a, semangat, perhatian, dan dukungan kepada penulis selama penyusunan skripsi ini, serta sahabat-sahabat terdekatku Pepe, Rahma, Citra, Dita, Dwi, Dewi, Rina, Retno, Aji, Harun, Bayu, Adhit, Iyus, Roni, Hamim, dan Danu atas persahabatan indah serta dukungan yang telah diberikan.
15. Teman-teman Biologi khususnya BIOSENTRIS (*Biology Two Thousand and Eight Truly Inspiring*) atas pertemanan yang tak akan terlupakan.
16. Bapak Yaya dan keluarga fotokopi cenat-cenut yang telah banyak berjasa.
17. 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, 2012

Penulis

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

---

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

Nama : Grand Septia Yama  
NPM : 0806327263  
Program Studi : S1  
Departemen : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam  
Jenis Karya : Skripsi

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

Pengaruh Penambahan Tepung Cangkang Kepiting 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 : 26 Juni 2012

Yang menyatakan



(Grand Septia Yama)

## ABSTRAK

Nama : Grand Septia Yama  
Program Studi : Biologi  
Judul : Pengaruh Penambahan Tepung Cangkang Kepiting pada Medium Pertumbuhan terhadap Kemampuan *Metarhizium majus* UICC 295 Menginfeksi Larva *Oryctes rhinoceros* Linnaeus

*Metarhizium majus* UICC 295 merupakan kapang entomopatogen yang mampu membunuh serangga. Penelitian bertujuan menguji pengaruh penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) pada medium *Saboraud Dextrose with Yeast Extract Agar* (SDYA) terhadap kemampuan *M. majus* UICC 295 dalam menginfeksi larva *Oryctes rhinoceros* serta mengetahui pengaruh *freezing* pada  $-80^{\circ}\text{C}$  menggunakan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan laktosa 5% (b/v). *Metarhizium majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% mampu membunuh larva 100% dalam waktu 13 hari. Preservasi pada  $-80^{\circ}\text{C}$  menggunakan akuades, gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan laktosa 5% (b/v) mampu mempertahankan viabilitas *M. majus* UICC 295 pada SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v). *Metarhizium majus* UICC 295 pada kadaver larva *O. rhinoceros* tetap viabel setelah dipreservasi pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Kata kunci: Cangkang kepiting, *cryoprotectant*, *freezing*, *Metarhizium majus*, *Oryctes rhinoceros*, preservasi.

xiv + 101 halaman; 19 gambar; 6 tabel; 30 lampiran  
Daftar Referensi: 68 (1976--2011)



## ABSTRACT

Name : Grand Septia Yama  
Study Program : Biologi  
Title : The Effect of Crab 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 with the ability to kill insects. This research investigated the effect of 10% (w/v) crab shell powder in Saboraud Dextrose Agar with Yeast Extract (SDAY) on the pathogenicity of *M. majus* UICC 295 to infect *Oryctes rhinoceros* larvae and to determine the effect of freezing at  $-80^{\circ}\text{C}$  using 10% (v/v) glycerol and 10% (v/v) glycerol added with 5% (w/v) lactose. *Metarhizium majus* UICC 295 on SDAY added with 10% (w/v) crab shell powder caused 100% larval mortality within 13 days. Preservation at  $-80^{\circ}\text{C}$  using 10% (v/v) glycerol and 10% (v/v) glycerol added with 5% (w/v) lactose maintained the viability of *M. majus* UICC 295 on SDAY and SDAY added with 10% (w/v) crab shell powder. *Metarhizium majus* UICC 295 on *O. rhinoceros* cadaver was viable after being preserved at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Keyword: Crab shell, cryoprotectant, freezing, *Metarhizium majus*, *Oryctes rhinoceros*, preservation.

xiv + 101 pages; 19 pictures; 6 tables; 30 attachments  
Bibliography: 68 (1976--2011)

## 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
<b>1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>6</b>
2.1 Kapang Entomopatogen.....	6
2.2 Kapang <i>Metarhizium majus</i> .....	8
2.3 <i>Oryctes rhinoceros</i> Linnaeus (Kumbang Badak).....	12
2.4 Medium dengan Penambahan Cangkang Kepiting.....	14
2.5 Aplikasi Kapang pada Serangga.....	18
2.6 Preservasi Fungi.....	18
<b>3. METODOLOGI PENELITIAN.....</b>	<b>21</b>
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	21
3.2 Alat dan Bahan.....	21
3.2.1 Alat.....	21
3.2.2 Bahan.....	22
3.2.2.1 Mikroorganisme.....	22
3.2.2.2 Larva <i>Oryctes rhinoceros</i> .....	22
3.2.2.3 Medium.....	22
3.2.2.4 Limbah Cangkang Kepiting.....	22
3.2.2.5 Pakan Larva.....	22
3.2.2.6 Bahan Kimia.....	23
3.2.2.7 Bahan Habis Pakai.....	23
3.3 Cara Kerja.....	23
3.3.1 Pembuatan Tepung Cangkang Kepiting.....	23
3.3.2 Pembuatan Medium SDYA dan SDYA dengan Penambahar Tepung Cangkang Kepiting .....	24
3.3.3 Pembuatan <i>Stock</i> dan <i>Working culture</i> kapang <i>M. majus</i> UICC 295.....	25
3.3.4 Pengamatan Morfologi <i>M. majus</i> UICC 295 Secara Makroskopik dan Mirkoskopik.....	25
3.3.5 Enumerasi Konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295.....	26
3.3.6 Perhitungan Jumlah Konidia <i>M. majus</i> UICC 295 dengan Hemositometer.....	27

3.3.7	Persiapan Larva <i>O. rhinoceros</i> untuk Pengujian.....	27
3.3.8	Pembuatan Larutan Triton X-100 0,05% Steril.....	28
3.3.9	Pengujian Konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada Larva <i>O. rhinoceros</i> dengan Aplikasi Kontak Langsung.....	28
3.3.10	Preservasi <i>M. majus</i> UICC 295 pada Suhu -80° C.....	29
3.3.11	Pengujian Viabilitas <i>M. majus</i> UICC 295 Setelah Preservasi.....	31
3.3.12	Pengolahan dan Analisis Data.....	32
<b>4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>33</b>
4.1	Pengaruh Penambahan Tepung Cangkang Kepiting pada Medium Pertumbuhan terhadap Morfologi <i>M. majus</i> UICC 295.....	33
4.2	Pengujian Suspensi Konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada Larva <i>O. rhinoceros</i> .....	44
4.3	Preservasi Konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295.....	53
<b>5.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>64</b>
5.1	Kesimpulan	64
5.2	Saran	64
	<b>DAFTAR REFERENSI.....</b>	<b>65</b>
	<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>72</b>

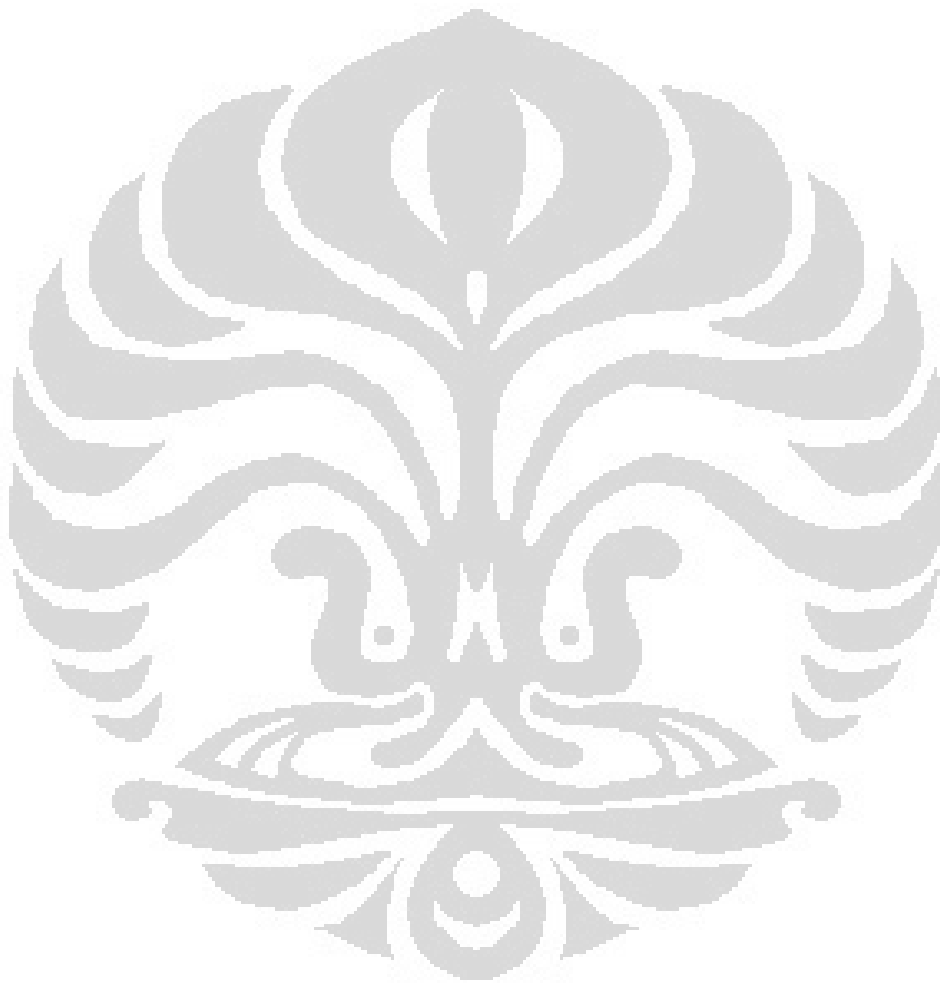
## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1.1	Hasil Pengamatan Morfologi <i>M. majus</i> UICC 295 Secara Makroskopik dalam Medium SDYA Umur 18 Hari dan SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting 5%, 10%, dan 15% Umur 10 Hari pada Suhu 28° C dengan Kondisi Gelap.....	37
Tabel 4.1.2	Ukuran Hifa dan Konidia <i>M. majus</i> UICC 295 dalam Medium SDYA Umur 21 Hari dan <i>M. majus</i> UICC 295 dalam Medium SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) Umur 14 hari pada Suhu 28° C dengan Kondisi Gelap.....	40
Tabel 4.2.1	Jumlah Konidia (konidia/ml) <i>M. majus</i> UICC 295 dalam Medium SDYA dan SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting 10% (b/v) Umur 23 Hari pada Suhu 28° C dengan Kondisi Gelap.....	45
Tabel 4.2.2	Hasil TPC <i>M. majus</i> UICC 295 dalam Medium SDYA Umur 23 Hari pada Suhu 28° C dengan Kondisi Gelap.....	46
Tabel 4.2.3	Hasil TPC <i>M. majus</i> UICC 295 dalam Medium SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting 10% (b/v) Umur 23 Hari pada Suhu 28° C dengan Kondisi Gelap.....	46
Tabel 4.3	Hasil Perhitungan Jumlah Konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 Setelah Preservasi.....	55

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.2.1	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i> .....	10
Gambar 2.2.3	<i>Cordyceps brittlebankisoides</i> .....	11
Gambar 2.3	<i>Oryctes rhinoceros</i> .....	14
Gambar 2.4	Struktur eksoskeleton cangkang kepiting.....	16
Gambar 4.1.1	Hasil Pembuatan Tepung Cangkang Kepiting.....	34
Gambar 4.1.2	Diagram Persentase Kenaikan Diameter Koloni <i>M. majus</i> UICC 295 pada Medium SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) Dibandingkan pada Medium SDYA.....	38
Gambar 4.1.3	Koloni <i>M. majus</i> UICC 295 pada Suhu Inkubasi 28° C dengan Kondisi Gelap.....	39
Gambar 4.1.4	Diagram Perbandingan Ukuran Konidia dan Hifa (µm) <i>M. majus</i> UICC 295 pada SDYA dan SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting.....	41
Gambar 4.1.5	Hasil Pengamatan Morfologi Secara Mikroskopik <i>M. majus</i> UICC 295 dalam Medium SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting 5% Umur 14 Hari pada Suhu 28° C dengan Kondisi Gelap.....	42
Gambar 4.2.1	Bercak Cokelat pada Tubuh Larva.....	47
Gambar 4.2.2	Grafik Jumlah Kematian Larva Selama 15 Hari pada Pengujian Suspensi Konidi/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada Medium SDYA dan SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting 10% (b/v).....	50
Gambar 4.2.3	Pertumbuhan <i>M. majus</i> UICC 295 dari SDYA dengan Penambahan tepung Cangkang Kepiting 10% (b/v) pada Larva <i>O. rhinoceros</i> Mati.....	51
Gambar 4.2.4	Grafik Berat Larva Rata-rata yang Masih Hidup Setelah Aplikasi pada Pengujian Suspensi Konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada Medium SDYA dan SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting 10% (b/v).....	53
Gambar 4.3.1	Diagram Jumlah Konidia/hifa Hidup <i>M. majus</i> UICC 295 pada Medium SDYA Setelah Preservasi.....	56
Gambar 4.3.2	Diagram Jumlah Konidia/hifa Hidup <i>M. majus</i> UICC 295 pada Medium SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting 10% (b/v) Setelah Preservasi.....	56
Gambar 4.3.3	Koloni <i>M. majus</i> UICC 295 pada Medium SDYA Setelah Preservasi Satu Hari dengan Kadaver Larva.....	58
Gambar 4.3.4	Hasil pengamatan morfologi <i>M. majus</i> UICC 295 secara mikroskopik pada medium SDYA setelah dipreservasi bersama kadaver selama satu hari.....	59
Gambar 4.3.5	Koloni <i>M. majus</i> UICC 295 pada Medium SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting 10% (b/v) Setelah Preservasi Satu Hari dengan Kadaver larva.....	61

Gambar 4.3.6 Hasil pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 secara mikroskopik pada medium SDYA setelah dipreservasi bersama kadaver selama satu hari..... 62



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Skema Kerja Penelitian.....	72
Lampiran 2.	Skema Kerja Pembuatan Medium SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting 10%.....	73
Lampiran 3.	Skema Pembuatan <i>Stock Culture</i> dan <i>Working Culture</i> Kapang <i>M. majus</i> UICC 295.....	73
Lampiran 4.	Skema Kerja Pengamatan Morfologi Kapang <i>M. majus</i> UICC 295.....	74
Lampiran 5.	Skema Kerja Enumerasi Konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295.....	74
Lampiran 6.	Aplikasi Kontak Langsung Konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada larva <i>O. rhinoceros</i> .....	75
Lampiran 7.	Preservasi Suspensi Konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295.....	75
Lampiran 8.	Preservasi <i>M. majus</i> UICC 295 pada Kadaver Larva.....	76
Lampiran 9.	Standar Warna Faber Castell.....	77
Lampiran 10.	Tabel Hasil Pengukuran Konidia dan Hifa <i>M. majus</i> UICC 295 Umur 21 Hari dalam Medium SDYA pada Suhu 28° C.....	78
Lampiran 11.	Tabel Hasil Pengukuran Konidia dan Hifa <i>M. majus</i> UICC 295 dalam Medium SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting 5% (b/v) Umur 14 Hari pada Suhu 28° C.....	79
Lampiran 12.	Tabel Hasil Pengukuran Konidia dan Hifa <i>M. majus</i> UICC 295 dalam Medium SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting 10% (b/v) Umur 14 Hari pada Suhu 28° C.....	80
Lampiran 13.	Tabel Hasil Pengukuran Konidia dan Hifa <i>M. majus</i> UICC 295 dalam Medium SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting 15% (b/v) Umur 14 Hari pada Suhu 28° C.....	81
Lampiran 14.	Hasil Uji Anova Panjang Konidia <i>M. majus</i> UICC 295 pada Medium SDYA dan SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting.....	82
Lampiran 15.	Hasil Uji Tukey Panjang Konidia <i>M. majus</i> UICC 295 pada Medium SDYA dan SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting.....	82
Lampiran 16.	Hasil Uji Anova Lebar Konidia <i>M. majus</i> UICC 295 pada Medium SDYA dan SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting.....	82
Lampiran 17.	Hasil Uji Tukey Lebar Konidia <i>M. majus</i> UICC 295 pada Medium SDYA dan SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting.....	83
Lampiran 18.	Hasil Uji Anova Lebar Hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada Medium SDYA dan SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting.....	83
Lampiran 19.	Hasil Uji Tukey Lebar Hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada Medium SDYA dan SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting.....	84
Lampiran 20.	Tabel Jumlah Larva yang Mati, Kelembaban Relatif, dan Suhu Ruang Selama 15 Hari Pengamatan pada Pengujian Suspensi Konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada Medium SDYA.....	85

Lampiran 21. Tabel Jumlah Larva yang Mati, Kelembaban Relatif, dan Suhu Ruang Selama 15 Hari Pengamatan pada Pengujian Suspensi Konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada Medium SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting 10% (b/v).....	86
Lampiran 22. Tabel Berat Badan (g) Larva yang Masih Hidup pada Kelompok Kontrol.....	87
Lampiran 23. Tabel Berat Larva (g) yang Masih Hidup Setelah Aplikasi pada Pengujian Suspensi Konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 dalam SDYA pada Suhu 28 °C dengan Kondisi Gelap.....	88
Lampiran 24. Tabel Berat Larva (g) yang Masih Hidup Setelah Aplikasi pada Pengujian Suspensi <i>M. majus</i> UICC 295 dalam SDYA dengan Penambahan Cangkang Kepiting 10% (b/v) pada Suhu 28 °C dengan Kondisi Gelap.....	89
Lampiran 25. Tabel Hasil TPC <i>M. majus</i> UICC 295 pada Medium SDYA Setelah Preservasi Menggunakan Akuades (Kontrol).....	90
Lampiran 26. Tabel Hasil TPC <i>M. majus</i> UICC 295 pada Medium SDYA Setelah Preservasi Menggunakan <i>Cryoprotectant</i> Gliserol 10% (v/v).....	92
Lampiran 27. Tabel Hasil TPC <i>M. majus</i> UICC 295 pada Medium SDYA Setelah Preservasi Menggunakan <i>Cryoprotectant</i> Gliserol 10% (v/v) dengan Penambahan Laktosa 5% (b/v).....	94
Lampiran 28. Tabel Hasil TPC <i>M. majus</i> UICC 295 pada Medium SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting 10% (b/v) Setelah Preservasi Menggunakan Akuades (Kontrol).....	96
Lampiran 29. Tabel Hasil TPC <i>M. majus</i> UICC 295 pada Medium SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting 10% (b/v) Setelah Preservasi Menggunakan <i>Cryoprotectant</i> Gliserol 10% (v/v).....	98
Lampiran 30. Tabel Hasil TPC <i>M. majus</i> UICC 295 pada Medium SDYA dengan Penambahan Tepung Cangkang Kepiting 10% (b/v) Setelah Preservasi Menggunakan <i>Cryoprotectant</i> Gliserol 10% (v/v) dengan Penambahan Laktosa 5% (b/v).....	100



# BAB 1

## PENDAHULUAN

Kapang entomopatogen merupakan kapang yang dapat menginfeksi dan membunuh serangga. Kapang entomopatogen menginfeksi inang melalui beberapa tahap. Tahap awal, konidia kapang entomopatogen melekat pada kutikula serangga, kemudian konidia mengalami germinasi menjadi *germ tube*. Selanjutnya *germ tube* mengalami penetrasi menembus integumen serangga. Tahap berikutnya, *germ tube* masuk ke dalam *haemocoel* untuk berkembang menjadi kapang entomopatogen yang secara umum dapat menyebabkan kematian pada serangga (Kendrick 2000: 223). *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin dan *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin merupakan contoh kapang entomopatogen (Ali dkk. 2011: 1203).

Salah satu kapang entomopatogen yaitu *Metarhizium majus* (Johnst.) Bisch., Rehner & Humber. *Metarhizium majus* merupakan salah satu varian dari jenis *Metarhizium anisopliae* (Bischoff dkk. 2009: 512). Kapang dari marga *Metarhizium* Sorokin memproduksi metabolit sekunder, yaitu destruksin yang dapat menyebabkan kematian pada serangga inang (Skrobek dkk. 2008: 362). Kapang tersebut memproduksi destruksin pada saat berada di dalam *haemocoel* (Carlile dkk. 1995: 358). *Metarhizium anisopliae* var. *majus* (Johnst.) Tulloch diketahui mampu membunuh larva *Oryctes rhinoceros* (Hashim & Ibrahim 2003: 104).

*Oryctes rhinoceros* Linnaeus (*Coleoptera: Dinastidae*) dikenal sebagai kumbang badak atau wangwung kelapa (Pracaya 2008: 113). *Oryctes rhinoceros* diketahui dapat menyerang tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis*) (Hashim & Ibrahim 2003: 104). Luas serangan *O. rhinoceros* terhadap tanaman kelapa sawit di Kebun Bukit Maradja, Kabupaten Simalungun, Sumatera Utara, tahun 2002 mencapai 242 ha (33.396 pohon). Serangan tersebut cukup berat, yaitu sekitar 1.345 pohon berumur dua bulan dan 2.800 pohon berumur lima bulan mengalami kematian. Kumbang dewasa menggerek batang hingga mencapai titik tumbuh.

Kumbang dapat menyebabkan kematian pada tanaman kelapa sawit jika terjadi serangan beberapa kali yang dapat merusak jaringan meristem pada titik tumbuh (Pasaribu & Cheon 2005: 103--104). *Oryctes rhinoceros* juga merupakan salah satu hama yang menyerang dan merusak tanaman kelapa (*Cocos nucifera* L.) (Chan & Elevitch 2006: 3 & 14). Serangan *O. rhinoceros* dapat menyebabkan kematian pada tanaman muda dan menyebabkan kerusakan pada bagian pucuk daun muda yang belum terbuka (Pracaya 2009: 194). Luas serangan *O. rhinoceros* terhadap tanaman kelapa di Indonesia pada bulan Februari 1993 sebesar 118.857,8 ha dan mencapai kerugian Rp. 6.110 milyar (Departemen Pertanian 1993: 1). Tahun 2004, serangan *O. rhinoceros* menyebabkan kerugian pada tanaman kelapa sebesar Rp. 11.146.198.961.940 (Sambiran & Hosang 2007: 2).

Larva *O. rhinoceros* dapat dibunuh oleh *M. anisopliae* melalui pengujian kontak langsung. Aplikasi kontak langsung dengan cara mencelupkan larva ke dalam suspensi kapang mampu membunuh larva 100% (Sambiran & Hosang 2007: 3--4). Aplikasi kontak langsung juga dapat dilakukan dengan cara meneteskan suspensi kapang pada larva (Herlinda dkk. 2006: 72). Aplikasi kontak langsung memungkinkan konidia kapang langsung melekat pada tubuh serangga (Desyanti dkk. 2007: 75). Keefektifan kapang dalam menginfeksi larva serangga dipengaruhi oleh faktor lingkungan, seperti suhu dan kelembaban. Suhu optimum untuk pertumbuhan kapang *M. anisopliae* adalah 22--27° C. Kapang *M. anisopliae* melakukan germinasi pada kondisi dengan kelembaban di atas 90% (Prayogo dkk. 2005: 20). Kapang *M. anisopliae* mampu tumbuh pada lingkungan dengan pH 2,5--10,5 (Matsumoto 2006: 297).

*Metarhizium anisopliae* menyebabkan infeksi pada larva *O. rhinoceros* dengan gejala, yaitu warna tubuh larva menjadi kusam kemudian menjadi kaku (Sambiran & Hosang 2007: 5). Kapang *M. anisopliae* memanfaatkan cairan dan jaringan tubuh larva sebagai sumber nutrisi, sehingga menyebabkan tubuh larva menjadi kaku (Prayogo dkk. 2005: 21). Selanjutnya kapang *M. anisopliae* berkembang menjadi miselium, sehingga menyebabkan tubuh larva menjadi berwarna putih. Beberapa hari selanjutnya kapang *M. anisopliae* bersporulasi dan menyebabkan tubuh larva menjadi berwarna hijau (Sambiran & Hosang 2007: 7).

Kapang *M. anisopliae* menginfeksi serangga dengan melakukan penetrasi menembus kutikula serangga. Kapang tersebut menghasilkan enzim kitinase, protease, dan lipase saat melakukan penetrasi. Kitinase mampu mendegradasi kitin pada kutikula serangga (Ali dkk. 2011: 1203). Kitin merupakan sumber karbon dan nitrogen bagi pertumbuhan fungi (Matsumoto 2006: 297).

Sumber kitin dapat diperoleh dari limbah cangkang *Crustacea*, seperti cangkang kepiting. Oleh karena itu, limbah cangkang kepiting merupakan sumber kitin yang diperoleh dengan biaya rendah (Robinson-Lora & Brennan 2008: 534). Kandungan kitin dalam cangkang kepiting adalah 18,70--32,20%, sedangkan kandungan protein dan kalsium karbonat dalam cangkang kepiting masing-masing adalah 15,60--23,90% dan 53,70--78,40% (Puspawati & Simpen 2010: 80). Penambahan sumber kitin ke dalam medium pertumbuhan dapat merangsang produksi kitinase, sehingga kitinase banyak diproduksi oleh kapang entomopatogen. Oleh sebab itu, kemampuan kapang entomopatogen pada medium pertumbuhan dengan penambahan kitin dalam menginfeksi serangga menjadi meningkat (Herlinda dkk. 2006: 77).

Fungi entomopatogen perlu dipreservasi untuk menjaga kemampuan fungi tersebut dalam menginfeksi inang. Preservasi fungi adalah upaya pemeliharaan fungi untuk menjaga viabilitas fungi serta kestabilan karakter morfologi, fisiologi, biokimia, dan genetik fungi. Preservasi dibagi menjadi dua berdasarkan lamanya penyimpanan fungi, yaitu preservasi jangka panjang dan preservasi jangka pendek. Preservasi jangka panjang menjaga kestabilan karakter morfologi, fisiologi, biokimia, dan genetika fungi lebih baik dibandingkan dengan preservasi jangka pendek. Preservasi jangka pendek yang dilakukan dengan mentransfer biakan berulang kali dapat mengubah karakter tersebut (Nakasone dkk. 2004: 37--38).

Metode *freezing* merupakan salah satu preservasi jangka panjang (Nakasone dkk. 2004: 41). Metode *freezing* membutuhkan *cryoprotectant*, yaitu senyawa yang berfungsi untuk mencegah kerusakan sel akibat pembekuan (*freezing*) (Chian & Quinn 2010: 31). Gliserol merupakan *cryoprotectant* yang berfungsi mencegah dehidrasi sel selama preservasi dan mencegah pembentukan kristal es yang kasar pada bagian ekstraseluler dan intraseluler. Selain itu,

disakarida seperti laktosa juga dapat digunakan sebagai *cryoprotectant* untuk melindungi bagian ekstraseluler dari kerusakan akibat pembentukan kristal es (Hubalek 2003: 218 & 220). Metode *freezing* dapat dilakukan dengan menambahkan gliserol 10% (v/v) ke dalam biakan fungi yang akan dipreservasi pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  (Nakasone dkk. 2004: 37 & 41). Preservasi *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen pada suhu  $-70^{\circ}\text{C}$  menggunakan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan laktosa 5% (b/v) lebih baik dibandingkan hanya menggunakan gliserol 10% (b/v) (Hubalek 2003: 211).

Fungi patogen dapat dipreservasi bersama dengan jaringan inang. Jaringan inang tersebut digunakan fungi sebagai substrat alami. *Pyrenochaeta* De Not. dan *Thielaviopsis* Went dapat dipreservasi bersama akar tanaman yang terinfeksi oleh fungi tersebut. Kapang entomopatogen *Neozygites fresenii* (Nowak.) Remaud., & Keller tetap viabel setelah dipreservasi bersama kutu daun yang telah terinfeksi fungi tersebut (Nakasone dkk. 2004: 37).

Penumbuhan kapang *M. majus* UICC 295 pada medium *Saboraud Dextrose Yeast Extract Agar* (SDYA) dengan penambahan substrat kulit udang 10% (b/v) telah dilakukan pada prapenelitian. Hasil menunjukkan bahwa sporulasi *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan substrat kulit udang lebih cepat dibandingkan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA (kontrol). Koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan substrat kulit udang telah berwarna hijau yang menandakan bahwa koloni sudah bersporulasi penuh, sedangkan koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA masih berwarna kuning dan menandakan koloni belum bersporulasi penuh.

Ukuran konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan substrat kulit udang menjadi lebih besar dibandingkan dengan *M. majus* UICC 295 dari medium SDYA. Panjang dan lebar konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan substrat kulit udang lebih besar 11,64% dan 13,11%. Pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting belum dilakukan. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 pada medium tersebut.

Kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA mampu membunuh larva *O. rhinoceros* 100% dalam waktu 13 hari setelah aplikasi (Gusmana 2011: 36). Akan tetapi, belum dilakukan pengujian *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros*. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengujian *M. majus* UICC 295 dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros*. Preservasi *M. majus* UICC 295 dari medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting dan *M. majus* UICC 295 pada larva mati akibat terinfeksi oleh kapang menggunakan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan laktosa 5% (b/v) pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  juga belum dilakukan. Oleh karena itu, preservasi menggunakan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan laktosa 5% (b/v) pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  perlu dilakukan.

Hipotesis penelitian adalah *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting tetap memiliki kemampuan dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros*. Preservasi *M. majus* UICC 295 dari medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting dan *M. majus* UICC 295 pada larva mati akibat terinfeksi oleh kapang menggunakan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan laktosa 5% (b/v) pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  dapat mempertahankan viabilitas *M. majus* UICC 295.

Hasil yang diharapkan dalam penelitian ini adalah medium pertumbuhan dengan penambahan tepung cangkang kepiting dapat dimanfaatkan sebagai medium pertumbuhan *M. majus* UICC 295. Kapang *M. majus* UICC 295 pada medium pertumbuhan dengan penambahan tepung cangkang kepiting diharapkan mampu menginfeksi larva *O. rhinoceros*, sehingga *M. majus* UICC 295 dapat digunakan sebagai bioinsektisida yang ramah lingkungan. Selain itu, preservasi menggunakan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan laktosa 5% (b/v) pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  diharapkan dapat mempertahankan viabilitas *M. majus* UICC 295.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. KAPANG ENTOMOPATOGEN

Fungi merupakan kelompok eukariota, multiseluler atau uniseluler, kemoheterotrof, dan memperoleh nutrisi dengan cara absorpsi. Fungi memiliki dinding sel yang terdiri dari glukukan dan kitin, bereproduksi secara seksual dan aseksual (Webster & Weber 2007: 1--2 & 23). Fungi bersifat saprofit, parasit, patogen atau sebagai simbiosis mutualisme (Walker & White 2005: 1).

Fungi berdasarkan morfologinya dikelompokkan menjadi tiga, yaitu kapang (*molds*), khamir (*yeast*), dan cendawan (*mushroom*) (Gandjar dkk. 2006). Khamir adalah fungi uniseluler yang bersifat dimorfik, yaitu dapat tumbuh dalam bentuk sel khamir atau pseudohifa atau hifa. Khamir tumbuh dalam bentuk hifa ketika kondisi lingkungan tidak menguntungkan, seperti terjadi kekeringan atau keterbatasan nutrisi di lingkungan. Cendawan merupakan fungi multiseluler yang memiliki tubuh buah besar. Kapang merupakan fungi multiseluler yang membentuk hifa atau miselium (Walker & White 2005: 2--3).

Fungi yang telah ditemukan alat reproduksi seksualnya disebut teleomorfik. Fungi yang belum ditemukan alat reproduksi seksualnya disebut anamorfik (Webster & Weber 2007: 32). Fungi terbagi menjadi lima filum berdasarkan alat reproduksi seksualnya, yaitu *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*, *Ascomycota*, dan *Basidiomycota* (Sumbali & Mehrotra 2009: 430). *Chytridiomycota* umumnya disebut *Chytrid*. Fungi dari filum *Chytridiomycota* merupakan fungi yang unik karena memiliki alat reproduksi seksual berupa zoospora bermotil dan berflagel. *Rhizophlyctis rosea* (de Bary & Woronin) Fischer dan *Allomyces arbusculus* Butler merupakan contoh jenis dari filum *Chytridiomycota*. *Glomeromycota* dikenal sebagai fungi *arbuscular mycorrhizal* (AM) dan ditemukan pada akar tumbuhan. Hifa fungi tersebut berpenetrasi ke dalam sel korteks akar dan membentuk *arbuscula* (sistem percabangan seperti pohon), tetapi tidak membunuh sel akar melainkan membentuk *feeding relationship*. *Acaulospora gerdemannii* Schenck & T.H.

Nicolson dan *Glomus mosseae* (Nicolson & Gerdemann) Gerdemann & Trappe merupakan contoh spesies dari filum *Glomeromycota*. *Zygomycota* memiliki miselium *coenocytic* serta alat reproduksi seksual berupa zigospora. Spora aseksual fungi dari filum tersebut berupa sporangiospora. *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. dan *Absidia corymbifera* (Cohn) Sacc. & Trotter merupakan contoh spesies dari filum *Zygomycota* (Deacon 2006: 17--27). *Ascomycota* memiliki askus yang memproduksi spora seksual berupa askospora (Webster & Weber 2007: 226). *Basidiomycota* memiliki basidium yang memproduksi spora seksual, yaitu basidiospora (Deacon 2006: 31). Alat reproduksi aseksual *Ascomycota* dan *Basidiomycota* adalah konidia yang berkembang dari *conidiogenous cell*. *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter dan *Emericella nidulans* (Eidam) Vuill. merupakan contoh spesies dari filum *Ascomycota* (Webster & Weber 2007: 32, 230, & 501). *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach dan *Volvariella volvacea* (Bull.) Singer merupakan contoh spesies dari filum *Basidiomycota* (Deacon 2006: 31--34).

Kapang entomopatogen adalah kapang yang dapat menginfeksi dan membunuh serangga (Kendrick 2000: 223). Kapang entomopatogen sebagian besar berasal marga *Beauveria* Vuillemin dan *Metarhizium* Sorokin. Beberapa spesies dari marga *Paecilomyces* Bainier, *Aspergillus* Micheli ex Haller, dan *Hirsutella* Pat. juga merupakan kapang entomopatogen (Carlile dkk. 1995: 358). Kapang entomopatogen menginfeksi serangga melalui beberapa tahap (Kendrick 2000: 223). Interaksi awal konidia kapang entomopatogen dengan serangga dewasa terjadi pada epikutikula serangga. Interaksi tersebut melibatkan adsorpsi antara konidia dengan epikutikula. Epikutikula serangga mengandung makromolekul lipid dan protein, serta senyawa kimia lipoprotein dan polifenol. Konidia kapang yang sudah melekat pada epikutikula kemudian mengalami germinasi menjadi *germ tube*. Germinasi konidia menjadi *germ tube* dipengaruhi faktor lingkungan seperti suhu dan kelembaban. Germinasi konidia juga dipengaruhi oleh nutrien yang berasal dari komponen pembentuk epikutikula. Selanjutnya, *germ tube* mengalami penetrasi menembus integumen. Penetrasi *germ tube* berlangsung lebih lama dibandingkan dengan pelekatan ataupun germinasi konidia karena prokutikula pada integumen serangga memiliki struktur

tebal dan keras (Samson dkk. 1988: 128--134). Integumen serangga terdiri dari epikutikula, prokutikula, dan epidermis. Prokutikula serangga yang terdiri dari eksokutikula dan endokutikula mengandung kitin (Gullan & Cranston 2010: 24 & 26). Oleh karena itu, *germ tube* mengeluarkan enzim untuk mendegradasi integumen serangga tersebut (Samson dkk. 1988: 128--134). *Germ tube* mengeluarkan enzim, seperti lipase, protease, kitinase, amilase, pospatase, dan esterase saat menginfeksi serangga (Prayogo dkk. 2005: 21).

## 2.2. KAPANG *Metarhizium majus*

Salah satu spesies kapang entomopatogen adalah *Metarhizium anisopliae* (Bischoff dkk. 2009: 512). *Metarhizium anisopliae* diketahui dapat menginfeksi beberapa jenis serangga dari ordo *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Homoptera*, *Hemiptera*, dan *Isoptera* (Prayogo 2006: 48). Hoe dkk. (2009: 292) melaporkan bahwa *M. anisopliae* mampu membunuh hama rayap *Coptotermes curvignathus* Holmgren (*Isoptera*) 100% dalam waktu tiga hari setelah aplikasi. Prayogo dkk. (2005: 22) juga melaporkan bahwa *M. anisopliae* mampu membunuh ulat grayak *Spodoptera litura* Fabricius (*Lepidoptera*) 100%.

Kapang *M. anisopliae* di dalam *haemocoel* berkembang sebagai *single yeast-like cells*. Kapang kembali berkembang menjadi hifa dan menembus integumen ketika serangga telah mati. Kapang menutupi seluruh permukaan tubuh serangga dengan hifa tersebut (Samson dkk. 1988: 128, 131, 133--134, & 137). Kapang *M. anisopliae* umumnya memanfaatkan semua jaringan dan cairan tubuh serangga, sehingga serangga mati dengan tubuh yang mengeras seperti mumi (Prayogo dkk. 2005: 21). Kapang *M. anisopliae* memproduksi toksin berupa destruksin saat kapang berkembang sebagai *single yeast-like cells* (Carlile dkk. 1995: 358).

Destruksin adalah metabolit sekunder yang memiliki struktur depsipeptida siklik (Hanson 2008: 45). Destruksin mengandung  $\alpha$ -hydroxyl acid dan lima asam amino, yaitu prolin, isoleusin, valin, alanin, dan  $\beta$ -alanin. Destruksin yang dihasilkan *M. anisopliae* adalah destruksi A, B, B2, C, dan E (Male dkk. 2009: 1447). Destruksin merupakan toksin neuromuskular yang menyebabkan



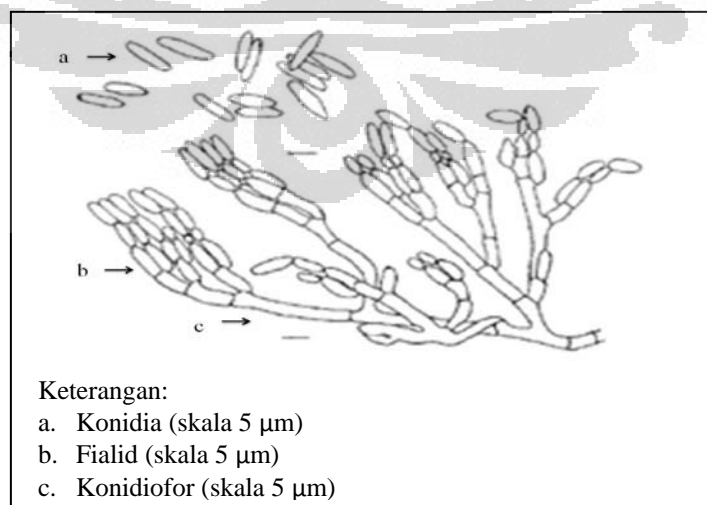
depolarisasi membran otot serangga dengan mempengaruhi transpor ion  $\text{Ca}^{2+}$  (Samuels 1998: 230 & 234). Depolarisasi menyebabkan  $\text{Ca}^{2+}$  channel terbuka, sehingga konsentrasi  $\text{Ca}^{2+}$  di dalam sitosol meningkat. Ion-ion  $\text{Ca}^{2+}$  di dalam sitosol terikat dengan kompleks troponin dan menyebabkan tropomiosin bergerak, sehingga situs pengikat miosin terbuka. Hal tersebut menyebabkan aktin dan miosin berikatan, sehingga terjadi kontraksi (Campbell dkk. 2008: 1108). Kontraksi secara terus menerus menyebabkan kelumpuhan otot dan kematian pada serangga inang (Samuels 1998: 230).

*Metarhizium anisopliae* merupakan tipe spesies entomopatogen anamorfik. *Metarhizium anisopliae* memiliki *variety* yaitu *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *Metarhizium anisopliae* secara taksonomi dipisahkan dari *M. majus* berdasarkan perbedaan ukuran konidia dan analisis filogenetik. Analisis filogenetik dilakukan menggunakan sekuen gen *elongation factor 1-alpha* (EF-1 $\alpha$ ), *RNA polymerase II largest subunit* (RPBI), *RNA polymerase second largest subunit* (RPB2), dan  $\beta$ -*tubulin* (Bt). Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa *M. majus* dan *M. anisopliae* berada pada *clade* berbeda, sedangkan *M. majus* dan *M. guizhouense* Chen & Guo berada pada *clade* yang sama. *Metarhizium majus* memiliki keistimewaan, yaitu memiliki konidia terbesar dibandingkan dengan *M. anisopliae*, *M. pingshaense* Chen & Guo, *M. robertsii* Bisch., Rehner & Humber, *M. brunneum* Petch, *M. globosum* Bisch., Rehner & Humber, *M. lepidiotae* (Driver & Milner) Bisch., Rehner & Humber dan *M. acridum* (Driver & Milner) Bisch., Rehner & Humber. *Metarhizium majus* yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan pencahayaan *fluorescence* pada suhu 23°C memiliki konidia dengan ukuran (8,5--14,5) x (2,5--5,0)  $\mu\text{m}$ , sedangkan *M. anisopliae* memiliki konidia dengan ukuran (5--7) x (2--3,5)  $\mu\text{m}$  (Bischoff dkk. 2009: 512 & 521--525).

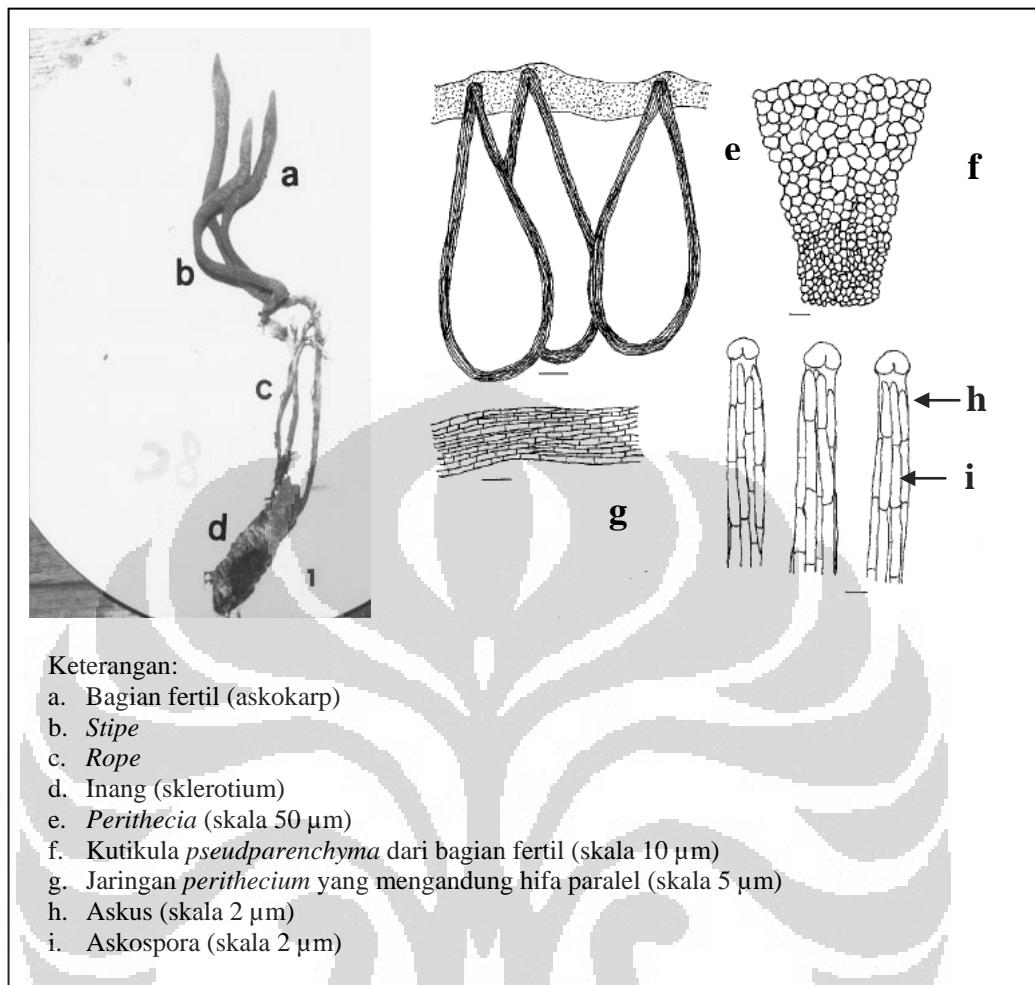
Kapang dari marga *Metarhizium* menyebabkan *green muscardine disease* pada serangga karena kapang tersebut menutupi tubuh serangga dengan konidia berwarna hijau (Herlinda dkk. 2010: 137). *Metarhizium majus* memiliki pigmentasi warna yang diawali dengan warna putih dari hifa, kemudian menjadi kuning dari konidia yang masih muda, dan menjadi hijau ketika konidia matang. *Metarhizium majus* ditemukan di tanah sebagai saprofit dan juga ditemukan pada

tubuh serangga dari ordo *Coleoptera* (Bischoff dkk. 2009: 516). Koloni *M. majus* UICC 295 berumur 22 hari dalam medium SDYA pada suhu 25--27°C dalam kondisi gelap dapat dilihat pada Gambar 2.2.1. Warna koloni kapang adalah *olive green* dan *reverse colony* tidak berwarna atau hialin. Koloni kapang tersebut bertekstur granular, menghasilkan *exudate drops* berwarna kuning kecokelatan, memiliki *radial furrow* dan *growing zone*, tetapi tidak memiliki zonasi (Gusmana 2011: 32).

*Metarhizium anisopliae* var. *majus* merupakan anamorf dari *Cordyceps brittlebankisoides* Liu, Liang, Whalley, Yao, & Liu dan termasuk ke dalam filum *Ascomycota*. *Cordyceps brittlebankisoides* diisolasi dari larva kumbang (*Coleoptera: Scarabaedae*) yang ditemukan di tanah (Gambar 2.2.2). *Cordyceps brittlebankisoides* memiliki askus silindris berukuran (188--313) x (3--3,2) µm dan askospora hialin, berbentuk silindris dan berukuran (5,7--8,1) x 0,94 µm. Askospora, sklerotia, dan stroma *Cord. brittlebankisoides* yang ditumbuhkan dalam medium PDA pada suhu 23° C selama 14 hari menghasilkan koloni kapang berwarna hijau kekuningan. Koloni kapang tersebut merupakan anamorf dari *Cord. brittlebankisoides*, yaitu *M. anisopliae* var. *majus*. Hal tersebut dapat dibuktikan dengan adanya kesamaan bentuk fialid dan kemiripan ukuran konidia antara anamorf *Cord. brittlebankisoides* dengan *M. anisopliae* var. *majus*. Anamorf *Cord. brittlebankisoides* dan *M. anisopliae* var. *majus* memiliki fialid berbentuk silindris (Liu dkk. 2001: 178--180).



Gambar 2.2.1. *Metarhizium anisopliae* var. *majus*  
[Sumber: Liu dkk. 2001: 181.]



Gambar 2.2.2. *Cordyceps brittlebankisoides*

[Sumber: Liu dkk. 2001: 180.]

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

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

### 2.3. *Oryctes rhinoceros* Linnaeus (KUMBANG BADAQ)

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

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

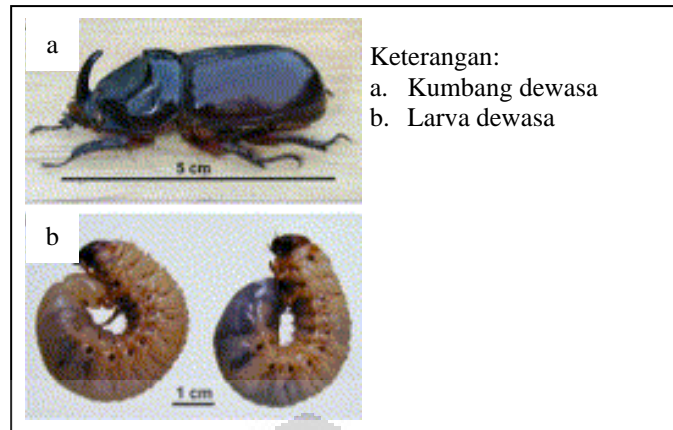
*Oryctes rhinoceros* L. (*Coleoptera: Scarabaeidae*) merupakan salah satu hama yang banyak menimbulkan kerugian pada tanaman kelapa karena memiliki kemampuan merusak yang tinggi, tersebar luas dan populasinya tinggi sepanjang tahun (Sambiran & Hosang 2007: 2). Kumbang yang memakan pucuk daun muda tanaman kelapa mengakibatkan daun terpotong-potong seperti huruf V bila daun membuka (Pracaya 2009: 194). Kumbang yang menyerang jaringan meristem pada pucuk daun menyebabkan kerusakan daun dan kematian pada tanaman (Pasaribu & Cheon 2005: 103--104).

*Oryctes rhinoceros* meletakkan telurnya di dalam tumpukan kompos, serta daun-daunan dan batang yang membusuk. Telur *O. rhinoceros* berwarna putih dan berdiameter 3 mm. Larva *O. rhinoceros* membutuhkan waktu 2--6 bulan untuk berkembang setelah menetas dari telur. Larva *O. rhinoceros* yang baru keluar dari telur berwarna putih dengan kepala berwarna cokelat dan berukuran 7--8 mm. Larva *O. rhinoceros* yang sudah dewasa memiliki ukuran panjang 60--105 mm dan lebar 25 mm (Pracaya 2008: 114--115). Bentuk badan larva membengkok, bagian ujung abdomen membentuk kantung. Badan larva ditumbuhi rambut-rambut pendek. Larva dewasa akan berhenti makan dan mencari tempat yang terlindung dari dingin dan lembab untuk bersiap-siap menjadi kepompong. Kepompong *O. rhinoceros* berwarna cokelat dan memiliki

panjang 45--50 mm serta lebar 22 mm. Lama stadium kepompong adalah 2--4 minggu (Departemen Pertanian 1993: 1--2). Kumbang inaktif tidak segera keluar dari kepompong tetapi masih berlindung dalam kepompong selama 14--28 hari (Pracaya 2008: 114--115). Kumbang yang baru keluar dari kepompong akan terbang menuju pohon kelapa untuk mencari makan (Departemen Pertanian 1993: 2). *Oryctes rhinoceros* dewasa berwarna cokelat tua mengkilap (Gambar 2.3). Panjang *O. rhinoceros* mencapai 5--6 cm (Pracaya 2009: 194).

Larva *O. rhinoceros* lebih rentan terinfeksi *M. anisopliae* (Sambiran & Hosang 2007: 9). Larva serangga memiliki lapisan kutikula lebih tipis dan lunak dibandingkan kutikula imago (Gullan & Cranston 2010: 24). Larva memiliki kutikula yang tipis, sehingga kapang entomopatogen mudah melakukan penetrasi menembus kutikula (Prayogo dkk. 2005: 23).

Serangga memiliki pertahanan diri terhadap partikel asing yang masuk ke dalam *haemocoel* serangga. Enzim fenoloksidase merupakan prekursor tidak aktif yang terlibat dalam proses pertahanan diri serangga. Fenoloksidase diubah menjadi prekursor aktif, yaitu profenoloksidase oleh *proteolytic cascade system* (proPO-system). Aktivasi fenoloksidase menyebabkan produksi melanin. Produksi melanin menyebabkan tubuh serangga menjadi menggelap. Hal tersebut merupakan respon serangga ketika partikel asing masuk ke dalam *haemocoel*. Aktivasi fenoloksidase menjadi profenoloksidase juga dapat menstimulasi pertahanan diri serangga yang melibatkan pelekatan hemosit terhadap partikel asing, fagositosis, pembentukan nodul, dan pergerakan hemosit. Hemosit merupakan sel yang terlibat dalam pertahanan serangga dan melindungi serangga dari partikel asing. Fagositosis merupakan mekanisme pertahanan serangga yang melibatkan penelanan partikel asing oleh hemosit. Hemosit mengeluarkan enzim untuk mencerna partikel tersebut. Pembentukan nodul terjadi jika jumlah partikel asing di dalam *haemocoel* melimpah dan tidak dapat dicerna melalui proses fagositosis. Pembentukan nodul melibatkan kumpulan hemosit yang memerangkap partikel-partikel asing untuk dikeluarkan dari hemolimfa. Enkapsulasi terjadi di dalam *haemocoel* ketika partikel asing berukuran besar. Hemosit memipih dan menjadi suatu lapisan yang menyelubungi partikel asing tersebut (Capinera 2008: 1941, 1943, 1946, & 1951).



Gambar 2.3. *Oryctes rhinoceros*

[Sumber: Huger 2005: 80.]

#### 2.4. MEDIUM PERTUMBUHAN DENGAN PENAMBAHAN CANGKANG KEPITING

Mikroorganisme yang ditumbuhkan pada skala laboratorium membutuhkan medium buatan bagi pertumbuhan mikroorganisme tersebut. Medium buatan tersebut mengandung komposisi nutrisi yang mirip dengan komposisi nutrisi pada substrat alami. Medium pertumbuhan juga memiliki pH yang mirip dengan substrat alami. Selain itu, lingkungan laboratorium umumnya memiliki suhu dan kelembaban yang sesuai dengan habitat alami, sehingga mendukung pertumbuhan mikroorganisme tersebut (Hogg 2005: 84). Medium buatan umumnya mengandung sumber karbon, nitrogen, fosfat, magnesium, dan potasium, serta mengandung sulfat dan klorida (Hanson 2008: 18). Medium terbagi menjadi dua, yaitu medium padat (*Agar*) dan medium cair (*Broth*). Medium cair meliputi *Nutrient Broth*, *Citrate Broth*, *Glucose Broth*, dan lain-lain. Medium padat dibuat dengan penambahan *solidifying agent* seperti agar (Benson 2001: 76).

Medium *Saboraud Dextrose with Yeast Extract Agar* (SDYA) merupakan medium pertumbuhan *Metarhizium majus*. Medium SDYA mengandung dekstrosa, pepton, *yeast extract*, dan agar (Bischoff dkk. 2009: 514). Dekstrosa merupakan monosakarida dan menjadi sumber karbohidrat. Pepton merupakan sumber nitrogen dan hasil hidrolisis protein secara enzimatik. *Yeast extract*

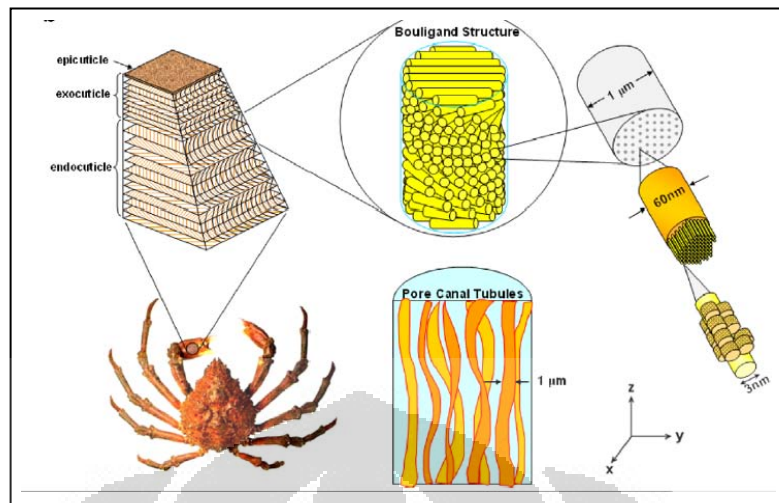
merupakan sumber vitamin dan sumber karbon serta nitrogen dari asam amino. Agar merupakan *solidifying agent* yang digunakan dalam medium. Agar meleleh pada suhu 84°C dan menjadi padat pada suhu 38°C (Atlas 2010: 1--6).

Kitin merupakan sumber karbon dan nitrogen (Matsumoto 2006: 297). Karbon merupakan unsur esensial untuk biosintesis karbohidrat, protein, lipid, dan asam nukleat. Karbon juga berfungsi sebagai sumber energi bagi fungi (Hoe dkk. 2009: 295). Nitrogen merupakan unsur esensial untuk pembentukan asam amino, asam nukleat, dan vitamin (Mustafa & Kaur 2009: 923). Penambahan sumber karbon dan nitrogen pada medium pertumbuhan dapat meningkatkan sporulasi fungi (Hoe dkk. 2009: 295). Sumber kitin dapat diperoleh dari cangkang kepiting (Robinson-Lora & Brennan 2008: 534)

Eksoskeleton cangkang kepiting terdiri dari epikutikula dan prokutikula (eksokutikula dan endokutikula) (Gambar 2.4). Epikutikula merupakan lapisan luar dari eksoskeleton, tipis, dan mengandung lapisan lilin. Prokutikula yang terdiri dari eksokutikula dan endokutikula mengandung kitin, protein, dan kalsium karbonat. Prokutikula tersusun atas rantai panjang kitin yang bersatu membentuk fibril. Fibril-fibril tersebut diselubungi oleh protein-protein menjadi suatu *fiber* yang kemudian membentuk kumpulan menjadi *bundle*. *Bundle* tersusun secara paralel membentuk suatu struktur seperti *twister* yang disebut *bouligand structure*. Struktur-struktur tersebut membentuk eksokutikula dan endokutikula (prokutikula). Mineral dalam bentuk kalsit atau kalsium karbonat berada di dalam matriks kitin-protein (Chen dkk. 2008: 587--588).

Taksonomi *Scylla serrata* berdasarkan Pavasovic (2004: 3) adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Animalia*  
Filum : *Arthropoda*  
Subfilum : *Crustacea*  
Kelas : *Malacostraca*  
Bangsa : *Decapoda*  
Suku : *Portinuidae*  
Marga : *Scylla*  
Jenis : *Scylla serrata* Forskal



Gambar 2.4. Struktur eksoskeleton cangkang kepiting

[Sumber: Chen dkk. 2008: 588.]

Cangkang kepiting dapat dijadikan kitin koloidal 2%. Pembentukan kitin koloidal dilakukan dengan menghaluskan cangkang kepiting dan melarutkan cangkang tersebut menggunakan asam kuat. Cangkang kepiting yang telah dilarutkan dengan HCl, diaduk selama 3 menit pada suhu 40° C, kemudian ditambahkan akuades dan disaring dengan kertas penyaring kasar akan menjadi kitin koloidal (Kang dkk. 1999: 277).

Medium *Saboraud Dextrose Broth* (SDB) dengan penambahan sumber kitin seperti koloidal cangkang kepiting dapat digunakan sebagai medium pertumbuhan kapang entomopatogen (Kang dkk. 1999: 276--277). Medium SDB yang ditambahkan sumber kitin dapat meningkatkan jumlah konidia. Kapang *B. bassiana* yang ditumbuhkan pada medium SDB dengan penambahan kitin mengalami peningkatan jumlah konidia dari  $4,98 \times 10^8$  CFU/ml menjadi  $5,23 \times 10^8$  CFU/ml (Herlinda dkk. 2006: 73).

Kitin koloidal 2% yang ditambahkan ke dalam medium pertumbuhan kapang entomopatogen mempengaruhi aktivitas kitinase. Penambahan kitin koloidal 2% ke dalam medium pertumbuhan kapang entomopatogen dapat meningkatkan aktivitas kitinase oleh kapang entomopatogen. Aktivitas kitinase mempengaruhi kemampuan kapang entomopatogen dalam menginfeksi serangga. Hal tersebut disebabkan enzim kitinase mampu menguraikan kitin pada kutikula



serangga saat proses infeksi serangga oleh kapang entomopatogen. Kitinase bersama dengan protease berperan dalam proses infeksi tersebut. Protease yang dihasilkan oleh kapang entomopatogen berperan mendegradasi protein, sedangkan kitinase digunakan untuk mendegradasi kitin pada kutikula serangga. Beberapa fungi entomopatogen yang dapat menghasilkan enzim kitinase dan protease adalah *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, dan *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson (Kang dkk. 1999: 277--280). Herlinda dkk. (2006: 76) melaporkan bahwa *B. bassiana* pada medium pertumbuhan dengan penambahan sumber kitin 0,5% mampu membunuh larva *Plutella xylostella* Linnaeus 75,13%. Kapang *B. bassiana* pada medium pertumbuhan tanpa penambahan sumber kitin hanya mampu membunuh larva 66,52%.

Produksi enzim ekstraseluler kitinase dan protease oleh kapang *M. anisopliae* dipengaruhi mekanisme *induction-repression*. Produksi enzim kitinase dan protease masing-masing diinduksi oleh keberadaan substrat yang mengandung kitin dan protein. Sekresi enzim protease (Pr1) paling tinggi dihasilkan oleh *M. anisopliae* yang ditumbuhkan pada medium dengan penambahan kutikula ngengat dan kitin dari cangkang kepiting dengan penambahan glukosa 1% dan paling rendah pada medium dengan penambahan glukosa 1% (Ali dkk. 2011: 1209 & 1211). Katabolit glukosa dapat menekan produksi protease (Pr1) (Leger dkk. 1994: 1659). Menurut Dhar dan Kaur (2010: 8098), penambahan koloidal kitin 2% yang mengandung N-asetil-glukosamin menginduksi ekspresi gen pengkode sintesis enzim kitinase, tetapi N-asetil-glukosamin pada konsentrasi tinggi akan dikatabolisme menghasilkan katabolit yang menekan ekspresi gen pengkode sintesis enzim kitinase, sehingga produksi enzim tersebut terhambat. Penambahan sumber karbon dari dekstroza ke dalam medium yang mengandung koloidal kitin 2% juga menekan produksi enzim kitinase. Glukosa dapat menekan ekspresi gen yang mengkode enzim dan gen tersebut terbagi menjadi tiga kategori. Pertama adalah kelompok gen yang terlibat dalam glikolisis dan glukoneogenesis. Kelompok gen kedua adalah gen yang terlibat dalam siklus krebs. Kelompok gen ketiga mengandung gen yang mengkode enzim yang mengkatalis proses penyerapan nutrisi oleh fungi dan metabolisme sumber karbon selain dari glukosa.

## 2.5. APLIKASI KAPANG PADA SERANGGA

Aplikasi konidia kapang entomopatogen pada larva dan serangga dewasa (imago) *O. rhinoceros* dapat dilakukan dengan kontak langsung (Sambiran & Hosang 2007: 3). Aplikasi kontak langsung memungkinkan konidia langsung menempel pada tubuh serangga, sehingga konidia dapat dengan cepat bergerminasi dan berpenetrasi menembus integumen serangga. Selain menginfeksi inang melalui kontak pada integumen, kapang entomopatogen juga menginfeksi inang melalui spirakel dan bagian antar segmen pada tubuh serangga (Desyanti dkk. 2007: 75).

Aplikasi kontak langsung konidia *M. anisopliae* memperlihatkan bahwa larva lebih rentan terinfeksi *M. anisopliae* dibandingkan dengan imago *O. rhinoceros*. Larva *O. rhinoceros* instar I mencapai mortalitas 100% pada hari kesepuluh setelah aplikasi kontak langsung konidia kapang *M. anisopliae*, pada larva instar II pada hari kesebelas setelah perlakuan dan larva instar III pada hari ke 14 setelah perlakuan, sedangkan mortalitas pada imago mencapai 61,7--76,7% pada hari ke 20 setelah perlakuan (Sambiran & Hosang 2007: 4 & 9).

## 2.6. PRESERVASI FUNGI

Preservasi fungi merupakan kegiatan pemeliharaan fungi untuk menjaga kestabilan karakter morfologi, fisiologi, biokimia, dan genetik fungi. Konservasi fungi berdasarkan lamanya penyimpanan dibagi menjadi dua, yaitu konservasi jangka pendek dan konservasi jangka panjang. Konservasi jangka pendek memiliki kelebihan, yaitu metode tersebut mudah dilakukan. Selain itu, metode konservasi jangka pendek tidak membutuhkan peralatan khusus, sehingga tidak membutuhkan biaya mahal untuk melakukan konservasi dengan metode tersebut. Konservasi jangka pendek digunakan untuk menyimpan biakan dalam waktu paling lama satu tahun. Konservasi menggunakan *continuous growth* merupakan contoh konservasi jangka pendek. Metode tersebut dilakukan dengan menumbuhkan kapang pada medium agar dan disimpan pada suhu sekitar

5--20° C. Selain memiliki kelebihan, preservasi jangka pendek juga memiliki kekurangan. Biakan yang dipreservasi dengan metode preservasi jangka pendek harus diperiksa secara berkala karena ada kemungkinan terkontaminasi oleh mikroorganisme lain. Selain itu, karakter morfologi dan fisiologi fungi dapat berubah. Fungi entomopatogen kehilangan kemampuan dalam menginfeksi inang setelah ditransfer berulang kali (Nakasone dkk. 2004: 37--38). Menurut Herlinda dkk. (2006: 75) viabilitas kapang *B. bassiana* pada medium *Saboraud Dextrose broth* (SDB) menurun akibat ditransfer berulang kali.

Preservasi jangka panjang dapat digunakan untuk menyimpan biakan dalam waktu bertahun-tahun. Karakter morfologi, fisiologi, bioimia, dan genetik fungi yang dipreservasi dengan metode preservasi jangka panjang lebih stabil dibandingkan menggunakan preservasi jangka pendek. Beberapa contoh preservasi jangka panjang, yaitu *oil overlay*, *silica gel*, *freezing*, *liquid nitrogen*, *lyophilization* (Nakasone dkk. 2004: 37--42).

Preservasi jangka panjang juga dapat dilakukan dengan metode preservasi fungi pada substrat organik, seperti kayu, *cereal grain*, jaringan serangga atau tumbuhan, dan tanah (Nakasone dkk. 2004: 39--40). Fungi dari marga *Fusarium* Link tetap viabel setelah dipreservasi dengan substrat berupa tanah selama sepuluh tahun (Smith & Onions 1994: 68). Fungi seperti *Sclerotinia* Fuckel, *Magnaporthe* Krause & Webster, dan *Leptosphaeria* Ces. & De Not. yang dipreservasi pada biji gandum mampu bertahan hidup selama sepuluh tahun. *Neozygites fresenii* (Nowak.) Remaud., & Keller tetap viabel setelah dipreservasi bersama inang fungi tersebut, yaitu kutu daun (Nakasone dkk. 2004: 39--40).

*Freezing* merupakan salah satu contoh preservasi jangka panjang. Metode tersebut dapat dilakukan dengan memindahkan biakan dari medium ke dalam *cryotube* dengan menggunakan *cryoprotectant*, kemudian *cryotube* disimpan pada suhu -80° C (Nakasone dkk. 2004: 41). *Cryoprotectant* berfungsi untuk mencegah kerusakan sel akibat *freezing* (Chian & Quinn 2010: 31). *Cryoprotectant* terbagi menjadi dua, yaitu *penetrating cryoprotectant* dan *nonpenetrating cryoprotectant*. *Penetrating cryoprotectant* masuk ke dalam sel dengan melewati membran sel, sehingga dapat melindungi bagian ekstraseluler dan intraseluler (Nakasone dkk. 2004: 41). Contoh *penetrating cryoprotectant*,

yaitu gliserol, *dimethyl sulfoxide* (DMSO), *metanol*, *propylene glycol*, *butylene glycol*, *ethylene glicol*, dan *adonitol* (Chian & Quinn 2010: 28). Agen *non-penetrating cryoprotectant*, seperti laktosa, sukrosa, maltosa, manitol, sorbitol, dan dekstran tidak mampu masuk ke dalam sel, sehingga hanya dapat melindungi bagian ekstraseluler (Nakasone dkk. 2004: 37--38 & 41). *Penetrating cryoprotectant* dapat mengikat air di dalam sel, sehingga mencegah dehidrasi yang berlebihan, mengurangi konsentrasi garam dan mencegah pembentukan kristal es kasar pada bagian ekstraseluler dan intraseluler. *Penetrating cryoprotectant* dapat menstimulasi pembentukan kristal es yang halus, sehingga tidak merusak membran sel. *Non-penetrating cryoprotectant* menghambat pembentukan kristal es pada bagian ekstraseluler dengan meningkatkan kekentalan larutan (Hubalek 2003: 218 & 220). *Non-penetrating cryoprotectant* juga berfungsi mencegah *osmotic shock* pada saat dilakukan *thawing*. *Osmotic shock* terjadi ketika tekanan osmotik bagian intraseluler lebih tinggi dibandingkan dengan tekanan bagian ekstraseluler, sehingga menyebabkan dehidrasi pada sel (Chian & Quinn 2010: 28).

## BAB 3

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 LOKASI DAN WAKTU

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 dalam penelitian adalah lemari pendingin [GASSIO], kompor listrik [SANYO], oven [Heraeus], autoklaf [Hirayama], pemanas air [SHARP], timbangan digital [AND EW-300 G, ACIS BC-500, dan ACIS MN-200], timbangan analitik [Sartorius], vorteks [Bio-Rad], mikropipet [Gilson, Biohit Proline, dan V.A. Howe], *tips*, mikroskop [Euromex], mikroskop trinokular [Carl ZEISS], mikroskop stereo [Carl ZEISS], lemari pendingin [AMB-HI-LO], kamera digital [Canon IXY DIGITAL 910iS], blender [PHILIPS], *cryotube* [BIOLOGIX], *water bath* [GRANT], *deep freezer* [SANYO], *mesh* 600  $\mu\text{m}$ , jangka sorong digital, kompor listrik, termometer ruang, mangkuk plastik kotak berukuran 14,5 cm x 9,5 cm x 6 cm dengan tutup, palu, *transfer box*, erlenmeyer, gelas *beaker*, gelas ukur, cawan petri, tabung reaksi, batang pengaduk, spatula, jarum tanam tajam, jarum tanam bulat (*ose*), *object glass*, *cover glass*, pinset, pipet, botol alkohol, spatel *Drygalski*, dan pembakar spiritus.

### 3.2.2 Bahan

#### 3.2.2.1 Mikroorganisme

*Metarhizium majus* UICC 295 diperoleh dari koleksi *University of Indonesia Culture Collection* (UICC).

#### 3.2.2.2 Larva *Oryctes rhinoceros*

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

#### 3.2.2.3 Medium

*Saboraud Dextrose with Yeast Extract Agar* (SDYA) dan *Saboraud Dextrose with Yeast Extract Agar* (SDYA) dengan penambahan substrat cangkang kepiting digunakan untuk pertumbuhan kapang.

#### 3.2.2.4 Limbah cangkang kepiting

Limbah kepiting diperoleh dari Rumah Makan Mang Engking, Universitas Indonesia, Depok. Kepiting diidentifikasi oleh Dra. Titi Soedjiarti, S.U. di Departemen Biologi, FMIPA-UI, Depok.

#### 3.2.2.5 Pakan larva

Pakan yang digunakan berupa kotoran hewan ternak dari Desa Rajagaluh, Kabupaten Majalengka, Jawa Barat.

### 3.2.2.6 Bahan kimia

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

### 3.2.2.7 Bahan habis pakai

Bahan habis pakai yang digunakan dalam penelitian adalah alumunium *foil*, plastik tahan panas [Bell], masker wajah [Krisbow], *tissue* gulung, kertas *yellow pages*, dan karet gelang.

## 3.3 CARA KERJA

Skema kerja penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1.

### 3.3.1. Pembuatan tepung cangkang kepiting

Pembuatan tepung cangkang kepiting dilakukan berdasarkan Natasasmita dan Sunarto (2004: 10). Cangkang kepiting dicuci hingga bersih dan dikeringkan. Cangkang kepiting dibersihkan kembali dengan alkohol 70% (v/v). Cangkang kepiting yang telah bersih kemudian dihancurkan menggunakan palu hingga menjadi partikel-partikel yang kecil. Cangkang kepiting yang telah dihancurkan kemudian dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk. Serbuk tersebut diayak menggunakan ayakan berukuran 600  $\mu\text{m}$ , sehingga diperoleh tepung cangkang dengan ukuran partikel 600  $\mu\text{m}$ .

3.3.2. Pembuatan medium *Saboraud Dextrose Yeast Extract Agar* (SDYA) dan *Saboraud Dextrose Yeast Extract Agar* (SDYA) dengan penambahan tepung cangkang kepiting

Skema kerja pembuatan medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting dapat dilihat pada Lampiran 2. Pembuatan medium SDYA berdasarkan Gusmana (2011: 21) dilakukan dengan melarutkan dektrosa 10 g, pepton 2,5 g, *yeast extract* 2,5 g, dan agar 20 g dalam akuades hingga mencapai volume 1.000 ml. Medium dipanaskan hingga mendidih. Medium didinginkan kemudian ditambahkan kloramfenikol 200 mg/L yang telah dilarutkan dalam satu ml etanol 96% (v/v). Medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C, tekanan dua atm selama 15 menit. Medium kemudian dituang ke dalam cawan petri steril sebanyak 20 ml.

Pembuatan medium SDYA miring untuk pemeliharaan *M. majus* UICC 295 dilakukan dengan melarutkan dektrosa 10 g, pepton 2,5 g, *yeast extract* 2,5 g, dan agar 20 g dalam akuades hingga mencapai volume 1.000 ml. Medium dipanaskan hingga mendidih. Medium didinginkan kemudian ditambahkan kloramfenikol 200 mg/L yang telah dilarutkan dalam satu ml etanol 96% (v/v). Medium dimasukkan ke dalam tabung reaksi menggunakan dispenser, masing-masing sebanyak lima ml. Medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C, tekanan dua atm selama 15 menit. Medium steril kemudian diletakkan pada papan yang dimiringkan dan dibiarkan mengeras.

Medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 5% (b/v) dibuat dengan melarutkan dektrosa 9,5 g, pepton 2,375 g, *yeast extract* 2,375 g, agar 19 g, dan tepung cangkang kepiting sebanyak 50 g dalam akuades hingga mencapai volume 1000 ml. Medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) dibuat dengan melarutkan dektrosa 9 g, pepton 2,25 g, *yeast extract* 2,25 g, agar 18 g, dan tepung cangkang kepiting sebanyak 100 g dalam akuades hingga mencapai volume 1.000 ml. Medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 15% (b/v) dibuat dengan melarutkan dektrosa 8,5 g, pepton 2,125 g, *yeast extract* 2,125 g, agar 17 g, dan tepung cangkang kepiting sebanyak 150 g dalam akuades hingga mencapai volume 1.000



ml. Medium kemudian dipanaskan hingga mendidih. Medium didinginkan kemudian ditambahkan kloramfenikol 200 mg/L yang telah dilarutkan dalam satu ml etanol 96% (v/v). Medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C, tekanan dua atm selama 15 menit. Medium kemudian dituang ke dalam cawan petri steril masing-masing sebanyak 20 ml.

### 3.3.3. Pembuatan *stock culture* dan *working culture* kapang *M. majus* UICC 295

Skema kerja pembuatan *stock culture* dan *working culture* dapat dilihat pada Lampiran 3. Pembuatan *stock culture* dan *working culture* berdasarkan Hogg (2005: 89 & 96). Koloni tunggal *M. majus* UICC 295 yang terpisah dari koloni lainnya dipindahkan ke dalam medium SDYA miring dan medium SDYA miring dengan penambahan tepung cangkang kepiting sebagai *stock culture* dan *working culture*. *Stock culture* dan *working culture* dibuat dengan metode *streak* lurus. *Stock culture* yang telah tumbuh disimpan dalam lemari pendingin (4° C). *Working culture* disimpan pada suhu 28° C dengan kondisi gelap untuk pengerjaan penelitian.

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

Skema cara kerja pengamatan morfologi kapang dapat dilihat pada Lampiran 4. Pengamatan morfologi kapang dilakukan berdasarkan Rosadi (2011: 26). Pengamatan morfologi kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA yang ditambahkan tepung cangkang kepiting (SDYA modifikasi) dilakukan secara makroskopik dan mikroskopik. Kapang *M. majus* UICC 295 ditumbuhkan pada medium SDYA dan SDYA modifikasi dalam cawan petri. Kapang *M. majus* UICC 295 ditanam pada tiga titik dalam medium kemudian diinkubasi pada suhu 28° C.

Hal-hal yang perlu diamati pada pengamatan morfologi kapang secara makroskopik, yaitu warna koloni berdasarkan standar warna Faber Castell (Lampiran 9.), warna sebalik koloni, tekstur koloni, *radial furrow*, zonasi, *exudate*

*drops*, dan *growing zone*. Hal-hal yang perlu diamati saat pengamatan morfologi kapang secara mikroskopik adalah tipe hifa (berseptum atau tidak), ukuran hifa, bentuk konidia, ukuran konidia (panjang dan lebar konidia).

Preparat dibuat dari biakan yang tumbuh pada medium SDYA (preparat kontrol) dan SDYA yang ditambahkan substrat cangkang kepiting. Biakan diambil dengan jarum tanam tajam dan diletakkan pada *object glass* yang telah ditetes *lactophenol cotton blue*. Preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Konidia dan hifa diukur menggunakan mikroskop trinokular [Carl ZEISS].

### 3.3.5. Enumerasi konidia/hifa *M. majus* UICC 295

Skema kerja Enumerasi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 dapat dilihat pada Lampiran 5. Enumerasi konidia kapang menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) berdasarkan Hogg (2005: 91--93). 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 steril dan dikerik menggunakan jarum tanam bulat (*ose*). Suspensi kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks. Suspensi konidia/hifa kapang diencerkan menggunakan akuades steril hingga faktor pengenceran  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  dan  $10^{-6}$ .

Sebanyak 0,1 ml suspensi konidia/hifa dari masing-masing pengenceran disebar dengan mikropipet ke permukaan medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting dalam cawan petri dengan tiga pengulangan dan diratakan dengan spatel *Drygalski*. Biakan kemudian diinkubasi selama tiga hari pada suhu 28° C di dalam inkubator dengan kondisi gelap. Jumlah CFU/ml sampel dihitung berdasarkan Cappuccino dan Sherman (2001: 119) dengan rumus:

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

### 3.3.6. Perhitungan jumlah konidia *M. majus* UICC 295 dengan hemositometer

Perhitungan 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 *Oryctes rhinoceros* untuk pengujian

Larva *O. rhinoceros* dipelihara di dalam ruangan dengan kondisi gelap, suhu berkisar 25--28 °C, dan kelembaban 84--97%. Larva *O. rhinoceros* beserta pakan ditempatkan dalam mangkuk plastik kotak berukuran 14,5 cm x 9,5 cm x 6 cm dengan tutup yang diberi lubang sebanyak enam buah untuk pertukaran udara. Pemberian pakan pada larva dilakukan setiap tiga hari, yaitu sebanyak 10 g pakan larva.

Larva dikelompokkan terlebih dahulu berdasarkan berat awal tubuh larva. Pengelompokkan tersebut bertujuan agar larva pada masing-masing kelompok memiliki berat yang seragam. Larva dikelompokkan menjadi tiga kelompok perlakuan menggunakan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA, tiga kelompok perlakuan menggunakan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan

penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v), dan tiga kelompok kontrol. Setiap kelompok terdiri atas sepuluh ekor larva dengan berat yang hampir seragam. Penyeragaman berat pada masing-masing kelompok bertujuan agar masing-masing larva dari tiap kelompok memberikan respon yang sama saat diberi perlakuan.

### 3.3.8. Pembuatan larutan triton X-100 0,05% (v/v) steril

Sebanyak 50 µl triton X-100 (dengan konsentrasi 98--100%) ditambahkan akuades hingga volume mencapai 100 ml, sehingga diperoleh larutan triton X-100 dengan konsentrasi 0,05% (v/v). Larutan triton X-100 0,05% (v/v) tersebut kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks. Larutan yang telah homogen selanjutnya dipindahkan ke dalam tabung reaksi, masing-masing sebanyak lima ml, dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan dua atm selama 15 menit.

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

Skema kerja pengujian konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada larva *O. rhinoceros* dapat dilihat pada Lampiran 6. Pengujian konidia/hifa kapang pada larva *O. rhinoceros* diawali dengan pembuatan suspensi kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting. Suspensi dibuat dengan menambahkan lima ml larutan triton X-100 0,05% steril pada biakan kapang yang telah bersporulasi penuh, kemudian biakan dikerik menggunakan jarum tanam bulat (ose). Suspensi kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks. Sebanyak satu ml suspensi kapang diaplikasikan pada permukaan tubuh larva *O. rhinoceros* menggunakan mikropipet. Perlakuan tersebut dilakukan pada 30 ekor larva (tiga kelompok) dari kelompok perlakuan. Selain itu, sebanyak satu ml suspensi kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA diaplikasikan pada 30 ekor larva (tiga kelompok) dari kelompok perlakuan. Sebanyak 1 ml larutan triton X-100 0,05% steril diaplikasikan pada

sepuluh ekor larva (satu kelompok) sebagai kontrol. Perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali berturut-turut selama tiga hari.

Pengamatan larva dilakukan selama 15 hari. Parameter yang dihitung adalah jumlah larva yang mati dan berat larva yang masih hidup setelah perlakuan. Penghitungan jumlah larva yang mati dilakukan setiap hari. Pengukuran berat dan pemberian pakan pada larva yang masih hidup dilakukan setiap tiga hari. Larva diletakkan dalam ruangan dengan kondisi gelap dan suhu berkisar 25--28 °C. Parameter lingkungan yang diukur adalah kelembaban relatif dan suhu ruang. Kemampuan kapang dalam membunuh larva *O. rhinoceros* akan terlihat bila terjadi kematian pada larva yang diaplikasikan dengan 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 yang diperoleh kemudian dikoreksi menggunakan rumus Abbott's berdasarkan Hasyim dkk. (2005: 118), yaitu:

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

### 3.3.10. Preservasi *M. majus* UICC 295 pada suhu -80° C

Skema kerja preservasi suspensi *M. majus* UICC 295 pada suhu -80° C dapat dilihat pada Lampiran 7. Pembuatan larutan gliserol dan prosedur preservasi dilakukan berdasarkan Murjito (2010: 22). Larutan yang digunakan untuk preservasi adalah gliserol 10% (v/v). Pembuatan larutan gliserol 10% (v/v) dilakukan dengan memasukkan 10,86 ml larutan gliserol 92,1% dan ditambahkan akuades hingga volume mencapai 100 ml. Larutan dipindahkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak lima ml. Larutan tersebut kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan dua atm selama 15 menit.

Larutan yang digunakan sebagai *protectant* selain gliserol 10% (v/v) adalah gliserol 10% (v/v) dengan penambahan laktosa 5% (b/v). Pembuatan larutan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan laktosa 5% diawali dengan pembuatan larutan *stock* gliserol 20% (v/v) dan larutan *stock* laktosa 10%. Sebanyak 21,7 ml gliserol 92,1% ditambahkan akuades hingga mencapai volume total 100 ml, sehingga diperoleh larutan *stock* gliserol 20% (v/v). Sebanyak 10 g laktosa ditambahkan akuades hingga mencapai volume total 100 ml, sehingga diperoleh larutan *stock* laktosa 10% (b/v). Larutan *stock* gliserol 20% (v/v) dan larutan *stock* laktosa 10% (b/v) disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan dua atm selama 15 menit. Larutan *stock* gliserol 20% (v/v) sebanyak 100 ml dan larutan *stock* laktosa 10% (b/v) sebanyak 100 ml (perbandingan volume 1:1) dicampur ke dalam labu erlenmeyer hingga diperoleh 200 ml larutan larutan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan laktosa 5% (b/v).

Kapang *M. majus* UICC 295 diinokulasi dengan metode *streak* sebanyak 15 gores pada medium miring SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting. Kapang *M. majus* UICC 295 disimpan pada suhu 28° C dengan kondisi gelap hingga bersporulasi penuh. Preservasi menggunakan gliserol 10% (v/v) dilakukan dengan menambahkan lima ml larutan gliserol 10% (v/v) ke dalam biakan kapang, sedangkan preservasi menggunakan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan laktosa 5% (b/v) dilakukan dengan menambahkan lima ml larutan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan laktosa 5% (b/v) ke dalam biakan kapang. Biakan kapang kemudian dikerik menggunakan jarum tanam bulat (*ose*). Sebanyak satu ml suspensi dimasukkan ke dalam *cryotube* dan diinkubasi terlebih dahulu dalam lemari pendingin pada suhu 4° C selama satu jam kemudian diinkubasi selama 30 hari dalam *deep freezer* dengan suhu -80° C.

Skema kerja preservasi *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva *O. rhinoceros* dapat dilihat pada Lampiran 8. Preservasi *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva *O. 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) yang diberi penambahan laktosa 5% (b/v) sebanyak lima ml. *Cryotube*

diinkubasi terlebih dahulu dalam lemari pendingin pada suhu 4° C selama satu jam dan kemudian diinkubasi selama 30 hari dalam *deep freezer* dengan suhu -80° C.

### 3.3.11. Pengujian viabilitas *M. majus* UICC 295 setelah preservasi

Pengujian viabilitas *M. majus* UICC 295 setelah dipreservasi dilakukan berdasarkan Murjito (2010: 25--26). Proses *thawing* menggunakan *water bath* pada suhu 37° C selama satu menit hingga mencair. Pengujian viabilitas suspensi *M. majus* UICC 295 setelah preservasi dilakukan dengan menghitung jumlah konidia/hifa kapang menggunakan metode TPC. Enumerasi *M. majus* UICC 295 dilakukan pada hari ke-1, hari ke-14, dan hari ke-30 setelah preservasi. Enumerasi juga dilakukan pada hari ke-0 sebagai kontrol untuk mengetahui jumlah konidia sebelum preservasi. Suspensi konidia/hifa kapang masing-masing dalam akuades steril, gliserol 10%, dan gliserol 10% dengan penambahan laktosa 5% diencerkan menggunakan akuades steril dengan faktor pengenceran  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , dan  $10^{-5}$ . Enumerasi tanpa pengenceran juga dilakukan. Sebanyak 0,1 ml suspensi konidia/kapang tanpa pengenceran dan hasil pengenceran disebarkan dengan mikropipet ke permukaan medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting dalam cawan petri dengan tiga kali pengulangan dan diratakan dengan spatel *Drygalski*. Biakan kemudian diinkubasi selama lima hingga enam hari pada suhu 28° C di dalam inkubator dengan kondisi gelap. Jumlah CFU/ml sampel dihitung berdasarkan Cappuccino dan Sherman (2001: 119) dengan rumus:

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

Pengujian viabilitas *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva dilakukan dengan melihat pertumbuhan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) setelah

preservasi pada  $-80^{\circ}\text{C}$ . Selain itu, pengujian viabilitas juga dilakukan dengan melakukan pengamatan *M. majus* UICC 295 secara mikroskopik setelah dipreservasi bersama kadaver. Kapang *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva ditumbuhkan pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) setelah preservasi selama satu hari menggunakan akuades, gliserol 10% (v/v), dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan laktosa 5% (b/v).

### 3.3.12. Pengolahan dan analisis data

Data yang diperoleh disusun dalam bentuk tabel dan gambar. Data yang diperoleh meliputi data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif meliputi data pengamatan morfologi secara makroskopik dan morfologi secara mikroskopik *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting dan data pengamatan kemampuan *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva untuk tumbuh pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) setelah preservasi, serta data pengamatan *M. majus* UICC 295 secara mikroskopik setelah dipreservasi bersama kadaver. Data kuantitatif meliputi data pengamatan morfologi secara mikroskopik *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting, data hasil TPC *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA, data hasil TPC *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting, data jumlah larva mati setelah pengujian suspensi konidia/hifa *M. majus* UICC 295, data berat larva yang masih hidup setelah aplikasi, dan data hasil TPC *M. majus* UICC 295 setelah dipreservasi dalam gliserol 10% (v/v) dengan penambahan laktosa 5% (b/v).

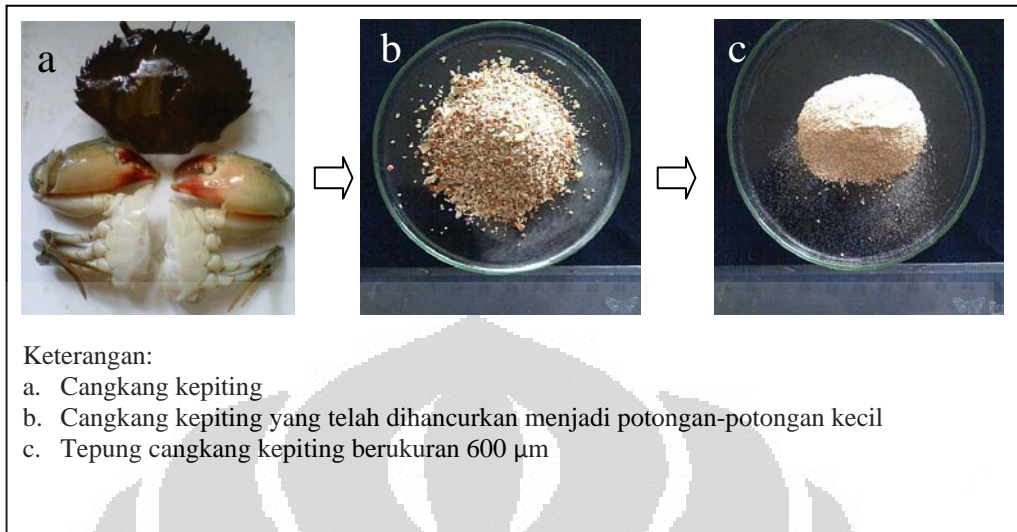


## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1. PENGARUH PENAMBAHAN TEPUNG CANGKANG KEPITING PADA MEDIUM PERTUMBUHAN TERHADAP MORFOLOGI *Metarhizium majus* UICC 295

Tepung cangkang kepiting mengandung kitin dan protein, serta beberapa mineral seperti kalsium. Tepung cangkang kepiting yang digunakan dalam penelitian memiliki ukuran partikel 600  $\mu\text{m}$ . Ukuran tersebut lebih kecil dibandingkan dengan ukuran cangkang kepiting yang dihancurkan menjadi potongan-potongan kecil tanpa pengayakan (Gambar 4.1.1). Partikel dengan ukuran 600  $\mu\text{m}$  menyebabkan luas permukaan substrat untuk kontak dengan hifa *M. majus* UICC 295 menjadi lebih besar, sehingga lebih banyak substrat (partikel) kontak dengan enzim. Oleh karena itu, *M. majus* UICC 295 dapat dengan mudah mengurai substrat tersebut. Hasil penguraian substrat tepung cangkang kepiting oleh enzim kitinase dan protease dimanfaatkan kapang *M. majus* UICC 295 untuk melakukan pertumbuhan. Pertumbuhan *M. majus* UICC 295 dapat dilihat dari pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 secara makroskopik dan mikroskopik. Menurut Kang dkk. (1999: 280), *M. anisopliae* merupakan salah satu kapang yang menghasilkan enzim kitinase dan protease. Oleh karena itu, *M. anisopliae* mampu tumbuh pada substrat yang mengandung kitin dan protein. Berdasarkan Dasari dan Berson (2007: 289), ukuran partikel yang kecil menyebabkan lebih banyak substrat mengalami kontak dengan enzim, sehingga waktu enzim hidrolitik untuk mengurai substrat menjadi berkurang. Penguraian partikel bubuk yang mengandung selulosa 10% dengan ukuran 35--75  $\mu\text{m}$  oleh biomassa setelah 72 jam menghasilkan glukosa 50% lebih banyak dibandingkan partikel bubuk dengan kandungan selulosa 13% dengan ukuran 590--850  $\mu\text{m}$ .



Gambar 4.1.1. Hasil pembuatan tepung cangkang kepiting

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Medium SDYA mengandung dekstrosa, pepton, *yeast extract*, dan agar. Dekstrosa menjadi sumber karbon, sedangkan pepton menjadi sumber nitrogen bagi pertumbuhan kapang. *Yeast extract* merupakan sumber karbon dan nitrogen dari hidrolisis karbohidrat, protein, lipid, dan asam nukleat, serta menjadi sumber vitamin. Medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting, selain mengandung dekstrosa, pepton, dan *yeast extract*, juga mengandung kitin yang juga menjadi sumber karbon dan nitrogen. Kapang akan melakukan metabolisme, yaitu asimilasi karbon dan nitrogen menjadi karbohidrat, protein, lipid, dan asam nukleat. Molekul-molekul tersebut merupakan molekul pembangun struktur sel dan struktur sel akan mengalami pertambahan ukuran yang mengindikasikan pertumbuhan sel. Mustafa dan Kaur (2009: 923) menyatakan bahwa karbon merupakan unsur esensial untuk biosintesis karbohidrat, protein, lipid, dan asam nukleat. Nitrogen juga merupakan unsur esensial untuk pembentukan asam amino, asam nukleat, dan vitamin. Unsur-unsur esensial tersebut merupakan unsur pembangun struktur sel.

Medium SDYA memiliki pH 6, sedangkan medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting memiliki pH 9. Hasil pengamatan

memperlihatkan pertumbuhan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting yang diinkubasi pada ruangan dengan suhu 28° C, kelembaban 64%, dan kondisi gelap. Suhu inkubasi tersebut merupakan suhu yang dapat mendukung pertumbuhan *M. majus* UICC 295. Pertumbuhan kapang *M. majus* UICC 295 ditandai dengan pertumbuhan hifa dan sporulasi pada koloni. Pertumbuhan kapang tidak hanya dipengaruhi oleh komposisi medium, tetapi juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan, seperti suhu, kelembaban, cahaya matahari, dan pH medium. Menurut Matsumoto (2006: 297), kapang *M. anisopliae* mampu tumbuh pada lingkungan dengan pH 2,5--10,5. Berdasarkan Arthurs dan Thomas (2001: 60 & 62), suhu dan kelembaban relatif yang mendukung pertumbuhan *M. anisopliae* var. *acridum* masing-masing adalah 20--30° C dan 80--100%. Kapang *M. anisopliae* var. *acridum* masih dapat tumbuh dan menginfeksi inang pada kelembaban relatif 45--75%.

Deskripsi koloni *M. majus* UICC 295 dilakukan pada kapang berumur 18 hari yang ditumbuhkan pada medium SDYA (kontrol) pada suhu inkubasi 28° C dengan kondisi gelap (Tabel 4.1.1) (Gambar 4.1.3). Deskripsi koloni *M. majus* UICC 295 juga dilakukan pada kapang berumur sepuluh hari yang ditumbuhkan dalam medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) pada suhu inkubasi 28° C dengan kondisi gelap (Tabel 4.1.1) (Gambar 4.1.3). Hasil pengamatan koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA (kontrol) menunjukkan bahwa warna koloni *olive green*. Hasil pengamatan koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) menunjukkan bahwa kapang memiliki warna koloni *sea green* (berdasarkan standar warna Faber Castell) dan sebalik koloni tidak berwarna (hialin). Koloni kapang pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting bertekstur *granular*, memiliki *exudate drops* berwarna kuning kecokelatan, *growing zone*, *radial furrow*, dan zonasi. Berdasarkan Bischoff dkk. (2009: 516) *M. majus* yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan suhu inkubasi 23° C memiliki warna koloni *olive green*. Akan tetapi, warna koloni *M. majus* yang belum *mature* adalah kuning. Berdasarkan Gusmana (2011: 32), koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA bertekstur granular,

menghasilkan *exudate drops* berwarna kuning kecokelatan, memiliki *radial furrow* dan *growing zone*, tetapi tidak memiliki zonasi.

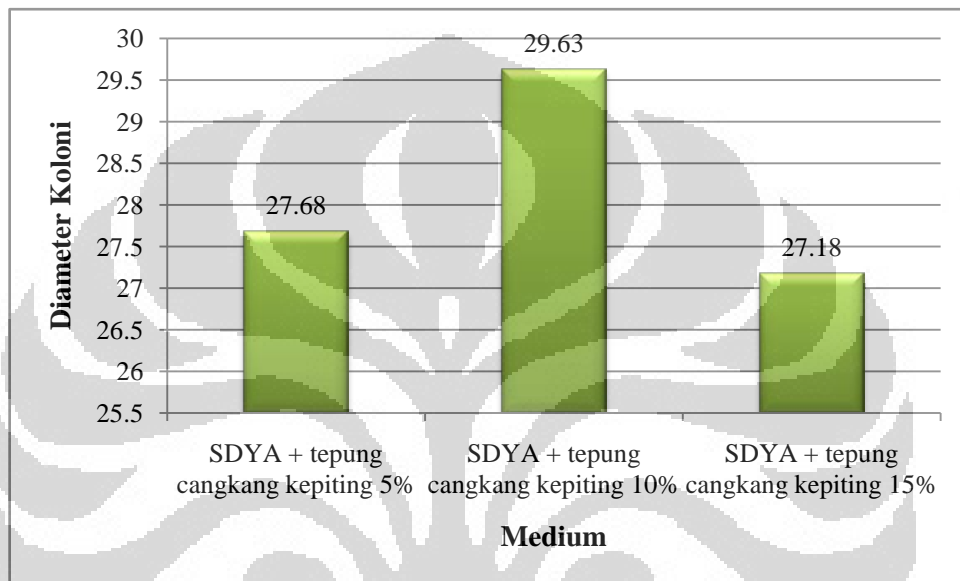
Berdasarkan hasil pengamatan *M. majus* UICC 295 secara makroskopik, *full sporulation M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting lebih cepat sebelas hari dibandingkan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA. Jumlah konidia dan produksi pigmen meningkat ketika *M. majus* UICC 295 ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting. Tepung cangkang kepiting mengandung karbohidrat, lipid, protein, dan asam nukleat yang menjadi sumber karbon dan nitrogen. Selain itu, kitin yang terkandung dalam tepung cangkang kepiting juga merupakan sumber karbon dan nitrogen. Kedua unsur tersebut merupakan unsur utama pembangun struktur sel. Karbon dan nitrogen akan diasimilasi kembali menjadi karbohidrat, protein, lipid, dan asam nukleat. Molekul-molekul tersebut merupakan molekul pembangun struktur *conidiogenous cell*. Semakin banyak *conidiogenous cell* terbentuk, maka semakin banyak konidia yang dihasilkan. Selain itu, medium yang kaya akan karbon menstimulasi produksi pigmen oleh kapang. Peningkatan jumlah konidia dan produksi pigmen dalam konidia mengindikasikan kapang mengalami *full sporulation*. Shah dkk. (2005: 262 & 264) melaporkan bahwa jumlah konidia *M. anisopliae* paling banyak dihasilkan pada medium SDA dengan ratio C:N (35:1). Jumlah konidia *M. anisopliae* V245 pada medium SDA dengan ratio C:N (35:1) adalah  $1,6 \times 10^9$  konidia/ml, sedangkan pada medium SDA dengan ratio C:N (10:1) adalah  $8 \times 10^7$  konidia/ml. Menurut Jackson dan Jaronski (2009: 845), mikrosklerotia *M. anisopliae* paling banyak dihasilkan pada medium yang kaya akan karbon dengan rasio C:N adalah 30:1 dan 50:1. Produksi melanin lebih banyak dihasilkan oleh mikrosklerotia pada medium dengan rasio C:N (50:1) dibandingkan medium dengan rasio C:N yang rendah (C:N = 10:1).

Tabel 4.1.1. Hasil pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 secara makroskopik dalam medium SDYA umur 18 hari dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 5%, 10%, dan 15% umur 10 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap

Karakteristik	SDYA	Tepung cangkang kepiting 5%	Tepung cangkang kepiting 10%	Tepung cangkang kepiting 15%
Warna	<i>Olive green</i>	<i>Sea green</i>	<i>Sea green</i>	<i>Sea green</i>
Diameter koloni	2,09 cm	2,89 cm	2,97 cm	2,87 cm
Warna sebalik koloni	Hialin	Hialin	Hialin	Hialin
Tekstur	<i>Granular</i>	<i>Granular</i>	<i>Granular</i>	<i>Granular</i>
<i>Exudate drops</i>	Ada	Ada	Ada	Ada
<i>Zonasi</i>	Ada	Ada	Ada	Ada
<i>Radial furrow</i>	Ada	Ada	Ada	Ada
<i>Growing zone</i>	Ada	Ada	Ada	Ada

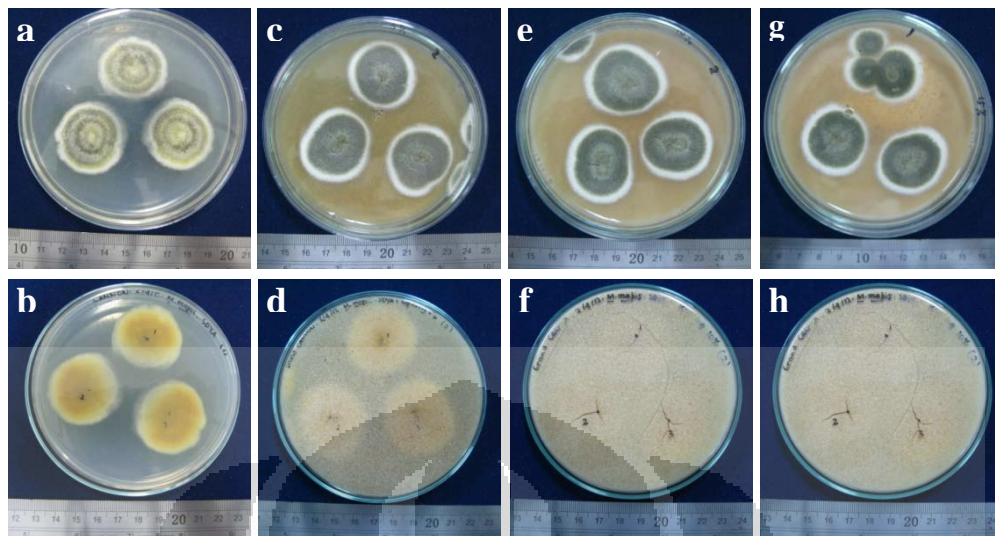
Hasil pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 secara makroskopik menunjukkan bahwa diameter koloni kapang pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) lebih besar dibandingkan dengan ukuran diameter koloni kapang, baik pada medium SDYA, maupun SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 5% (b/v) dan 15% (b/v) (Tabel 4.1.2) (Gambar 4.1.2). Peningkatan diameter koloni mengindikasikan peningkatan pertumbuhan hifa. Cangkang kepiting mengandung kitin, protein, karbohidrat, lipid, dan asam nukleat yang menjadi sumber karbon dan nitrogen, serta mengandung beberapa mineral, yaitu kalsium, kalium, seng, dan magnesium. Unsur-unsur tersebut merupakan unsur pembentuk hifa. Menurut Walker dan White (2001: 11), karbon, nitrogen, potasium (kalium), dan magnesium merupakan makronutrien, sedangkan kalsium dan seng merupakan mikronutrien. Kalium berperan menjaga keseimbangan ion. Magnesium merupakan unsur pembentuk struktur sel dan organel sel dan berperan dalam aktivitas enzim. Berdasarkan Carlile dkk. (2001: 112), pertumbuhan hifa kapang melibatkan pemanjangan dinding sel. Pemanjangan dinding sel disebabkan oleh biosintesis kitin yang merupakan komponen pembentuk dinding sel. Biosintesis kitin

melibatkan konversi glukosa-6-fosfat menjadi prekursor kitin, yaitu Uridin difosfat N-asetilglukosamin (UDP-GlcNAc). Uridin difosfat N-asetilglukosamin (UDP-GlcNAc) diubah menjadi kitin dengan bantuan enzim kitin sintase. Enzim kitin sintase membutuhkan magnesium untuk aktivitas enzim tersebut. Enzim tersebut berikatan dengan UDP-GlcNAc dan menghasilkan rantai kitin yang masuk ke dalam dinding sel yang sedang berkembang.



Gambar 4.1.2. Diagram persentase kenaikan diameter koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) dibandingkan pada medium SDYA

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Keterangan:

- a. Koloni *M. majus* UICC 295 pada SDYA umur 18 hari
- b. Sebalik koloni *M. majus* UICC 295 pada SDYA umur 18 hari
- c. Koloni *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 5% (b/v) umur 10 hari
- d. Sebalik koloni *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 5% (b/v) umur 10 hari
- e. Koloni *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) umur 10 hari
- f. Sebalik koloni *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) umur 10 hari
- g. Koloni *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 15% (b/v) umur 10 hari
- h. Sebalik koloni *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 15% (b/v) umur 10 hari

Gambar 4.1.3. Koloni *M. majus* UICC 295 pada suhu inkubasi 28° C dengan kondisi gelap

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

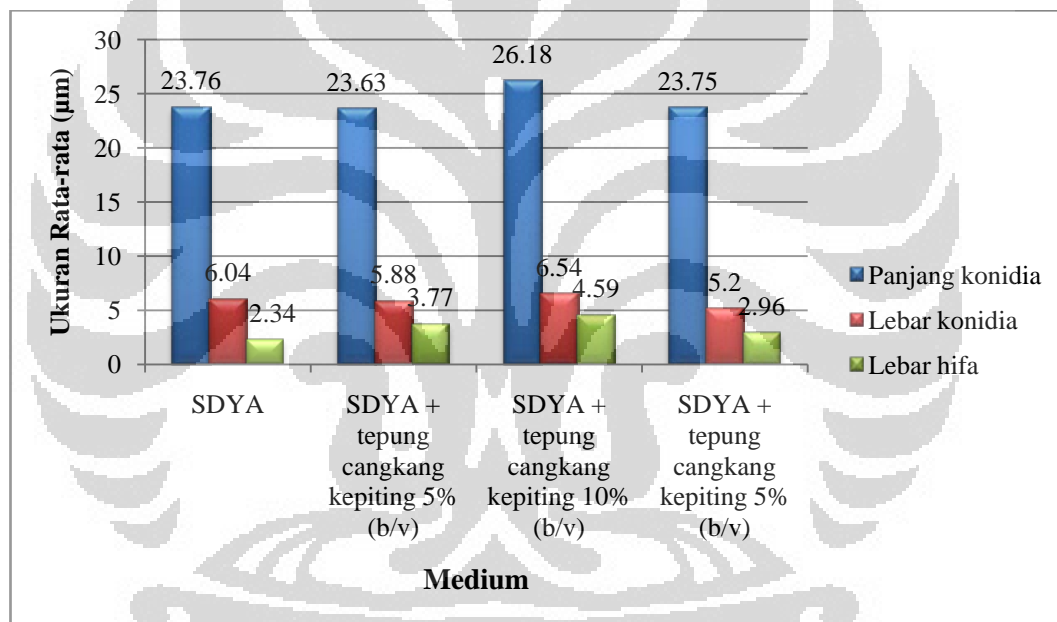
Tabel 4.1.2. Ukuran hifa dan konidia *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA umur 21 hari dan *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) umur 14 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap

Karakter Morfologi	SDYA	SDYA + Tepung cangkang kepiting			
		5% (b/v)	10% (b/v)	15% (b/v)	
Hifa	Septum	Ada	Ada	Ada	Ada
	Percabangan	Ada	Ada	Ada	Ada
	Kisaran lebar (µm)	1,84--2,91	2,68--4,95	3,25--6,59	2,30--3,79
	Rata-rata lebar (µm)				
	± SD	2,34 ± 0,38	3,77 ± 0,68	4,59 ± 0,93	2,96 ± 0,41
Konidia	Bentuk	Silindris	Silindris	Silindris	Silindris
	Kisaran panjang (µm)	19,32--26,44	21,16--25,56	24,08--27,66	21,20--25,66
	Rata-rata panjang (µm) ± SD	23,76 ± 2,11	23,78 ± 1,17	26,18 ± 1,18	23,95 ± 1,18
	Kisaran lebar (µm)	4,60--7,49	4,95--6,63	5,20--7,61	5,36--6,96
	Rata-rata lebar (µm)				
	± SD	6,04 ± 0,73	6,08 ± 0,48	6,54 ± 0,71	6,10 ± 0,48

Hasil pengamatan morfologi kapang secara mikroskopik menunjukkan bahwa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) memiliki hifa bercabang dan berseptum (Tabel 4.1.2) (Gambar 4.1.5). Kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 5% (b/v) dan 15% (b/v) mengalami kenaikan ukuran konidia dan hifa dibandingkan dengan *M. majus* UICC 295 pada SDYA (Gambar 4.1.4). Panjang konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 5% (b/v) (Lampiran 11), 10% (b/v) (Lampiran 12), dan 15% (b/v) (Lampiran 13) masing-masing menjadi lebih besar 0,08%, 9,24%, dan 0,79% (Tabel 4.1.2). Lebar konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) masing-masing menjadi lebih besar 0,65%, 7,64%, dan 0,98%. Lebar hifa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) masing-masing menjadi lebih besar 37,93%, 49,01%, dan 20,94%. Berdasarkan uji statistik *Analysis of Variance* (ANOVA), terdapat perbedaan panjang konidia (Lampiran 14), lebar konidia (Lampiran 16), dan lebar

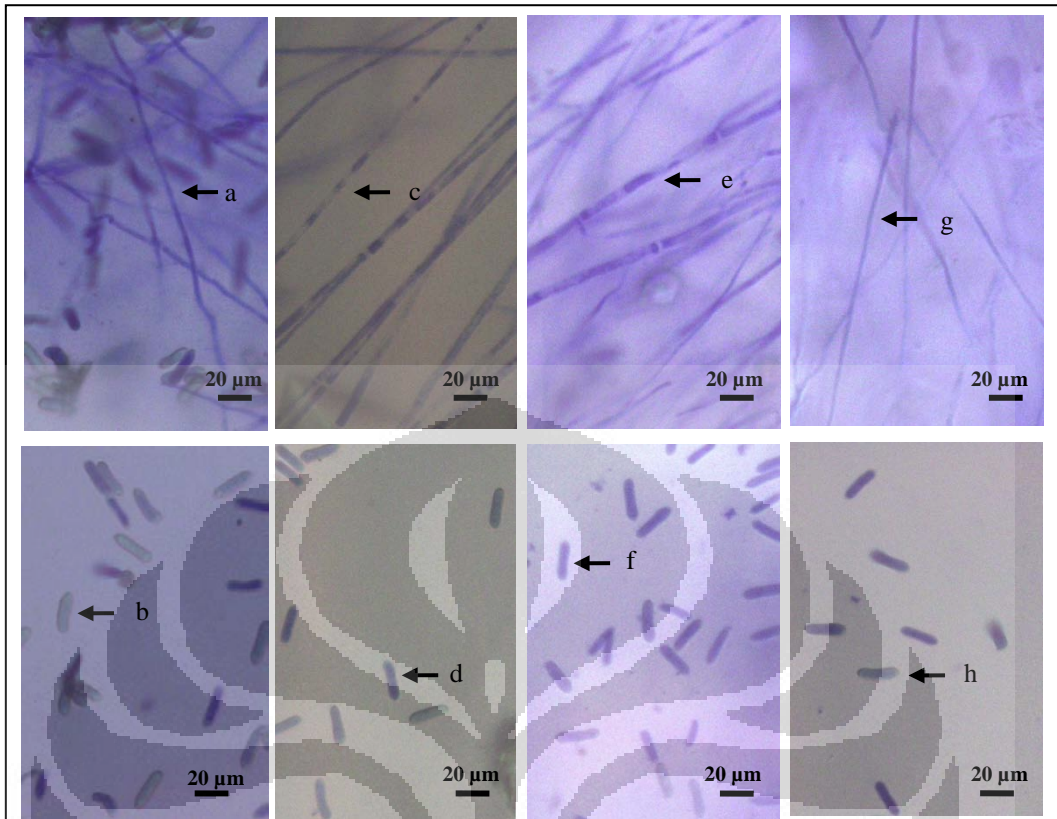


hifa (Lampiran 18) *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dibandingkan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v). Akan tetapi, berdasarkan uji statistik Tukey, panjang konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) berbeda nyata dibandingkan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 5% (b/v) dan 15% (b/v) (Lampiran 15). Selain itu, lebar hifa *M. majus* UICC 295 pada empat medium berbeda nyata (Lampiran 19), sedangkan lebar konidia *M. majus* UICC 295 pada empat medium tidak berbeda nyata (Lampiran 17).



Gambar 4.1.4. Diagram perbandingan ukuran konidia dan hifa ( $\mu\text{m}$ ) *M. majus* UICC 295 pada SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Keterangan:

- a. Hifa *M. majus* UICC 295 pada SDYA umur 21 hari
- b. Konidia *M. majus* UICC 295 pada SDYA umur 21 hari
- c. Hifa *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 5% (b/v) umur 14 hari
- d. Konidia *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 5% (b/v) umur 14 hari
- e. Hifa *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) umur 14 hari
- f. Konidia *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) umur 14 hari
- g. Hifa *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 15% (b/v) umur 14 hari
- h. Konidia *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 15% (b/v) umur 14 hari

Gambar 4.1.5. Hasil pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 secara mikroskopik pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting pada suhu inkubasi 28° C dengan kondisi gelap

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Ukuran hifa dan konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) lebih besar dibandingkan dengan ukuran hifa dan konidia kapang, baik pada medium SDYA, maupun pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 5% (b/v) dan 15% (b/v). Peningkatan diameter koloni dan ukuran hifa serta konidia mengindikasikan peningkatan pertumbuhan kapang. Penambahan tepung cangkang kepiting menjadi sumber karbon dan nitrogen tambahan yang dapat memicu pertumbuhan kapang. Karbon dan nitrogen akan diasimilasi menjadi komponen-komponen pembangun struktur sel dan menyebabkan konidia dan hifa kapang terbentuk. Hal tersebut menyebabkan terjadi pertambahan ukuran sel yang mengindikasikan terjadi pertumbuhan konidia. Menurut Walker dan White (2005: 11 & 21--22), karbon diasimilasi melalui proses anabolisme menjadi senyawa polimer protein, karbohidrat, lipid, asam nukleat, kitin, dan glukukan. Nitrogen diasimilasi menjadi asam amino, asam amino kemudian diasimilasi menjadi protein. Senyawa-senyawa polimer protein, karbohidrat, lipid, dan asam nukleat merupakan komponen-komponen pembentuk struktur sel atau organel sel, seperti dinding sel, membran sel, nukleus, mitokondria, retikulum endoplasma, badan golgi, vakuola, dan peroksisom. Kitin yang juga merupakan senyawa polimer hasil asimilasi karbon dan nitrogen merupakan komponen utama pembentuk dinding sel fungi.

Hasil pengamatan morfologi secara mikroskopik menunjukkan bahwa ukuran hifa dan konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) lebih besar dibandingkan dengan ukuran hifa dan konidia kapang pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 15% (b/v). Penambahan tepung cangkang kepiting dengan konsentrasi yang terlalu tinggi dapat menghambat pertumbuhan hifa dan konidia kapang. Cangkang kepiting mengandung polimer kitin. Kitin akan dikatabolisme menghasilkan monomer-monomer dan energi. Diduga kitin pada konsentrasi tinggi akan dikatabolisme menghasilkan katabolit yang berlebih, sehingga terjadi represi katabolit. Katabolit tersebut akan menekan ekspresi gen yang mengkode sintesis enzim proteolitik dan kitinolitik. Oleh karena itu, produksi enzim proteolitik dan kitinolitik menjadi terhambat. Enzim tersebut

merupakan enzim yang terlibat dalam proses penyerapan nutrisi oleh kapang. Kapang menghasilkan enzim proteolitik dan kitinolitik untuk mengurai eksoskeleton serangga, sehingga kapang dapat menyerap hasil penguraian tersebut sebagai nutrisi. Sel kapang melakukan metabolisme terhadap sumber nutrisi untuk mendapatkan energi, kemudian melakukan biosintesis molekul-molekul pembangun struktur sel. Oleh karena itu, pertumbuhan kapang dapat terhambat karena terjadi penekanan pada produksi enzim proteolitik dan kitinolitik. Menurut Li dan Roseman (2004: 627), kitin akan dikatabolisme menjadi fruktosa-6-fosfat, asetat, dan  $\text{NH}_3$ . Dhar dan Kaur (2010: 8098) melaporkan bahwa katabolit glukosa dapat menekan ekspresi gen pengkode enzim yang terlibat dalam proses glikolisis, glukoneogenesis, siklus Krebs, penyerapan nutrisi oleh fungi, dan metabolisme sumber karbon selain dari glukosa. Penambahan koloidal kitin 2% yang mengandung N-asetil-glukosamin menginduksi ekspresi gen pengkode sintesis enzim kitinase, tetapi N-asetil-glukosamin pada konsentrasi tinggi akan dikatabolisme menghasilkan katabolit yang menekan ekspresi gen pengkode sintesis enzim kitinase, sehingga produksi enzim tersebut terhambat. Penambahan sumber karbon dari dekstrosa ke dalam medium yang mengandung koloidal kitin 2% juga dapat menekan ekspresi gen pengkode sintesis enzim kitinase.

Hasil menunjukkan bahwa konsentrasi tepung cangkang kepiting 10% (b/v) merupakan konsentrasi yang paling mendukung pertumbuhan kapang *M. majus* UICC 295. Oleh karena itu, *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) digunakan pada pengujian suspensi kapang dalam menginfeksi larva.

#### **4.2. PENGUJIAN SUSPENSIFUNGSI KONIDIA/HIFA *M. majus* UICC 295 TERHADAP LARVA *O. rhinoceros***

Perhitungan jumlah konidia menggunakan hemositometer pada penelitian bertujuan untuk mempersiapkan inokulum kapang *M. majus* UICC 295 dengan jumlah konidia yang sama untuk diaplikasikan terhadap larva *O. rhinoceros*. Jumlah konidia kapang *M. majus* UICC 295 yang diaplikasikan terhadap larva

*O. rhinoceros* dapat menentukan keberhasilan infeksi kapang pada larva. Hasil perhitungan jumlah konidia *M. majus* UICC 295 berumur 23 hari masing-masing pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% menggunakan hemositomometer adalah  $8,7 \times 10^6$  konidia/ml dan  $1,54 \times 10^7$  konidia/ml (Tabel 4.2.1). Jumlah konidia *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) yang digunakan pada saat aplikasi adalah  $1 \times 10^7$  konidia/ml. Perhitungan jumlah konidia/hifa kapang *M. majus* UICC 295 menggunakan metode TPC dilakukan untuk memperoleh jumlah konidia/hifa kapang yang viabel. Hasil enumerasi *M. majus* UICC 295 berumur 23 hari pada medium SDYA berkisar  $(6,20--7,00) \times 10^6$  CFU/ml (Tabel 4.2.2), sedangkan jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 berumur 23 hari pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) berkisar  $(1,02--1,77) \times 10^6$  CFU/ml (Tabel 4.2.3). Menurut Gopal dkk. (2006: 1804), pengujian *M. anisopliae* dengan jumlah konidia  $1 \times 10^5$  konidia/10 g dapat membunuh larva *O. rhinoceros* dalam waktu delapan hari.

Tabel 4.2.1. Jumlah konidia (konidia/ml) *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) umur 23 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap

Ruang	Jumlah konidia			
	<i>M. majus</i> (SDYA)		<i>M. majus</i> (SDYA + Cangkang Kepiting)	
	Ulangan ke-1	Ulangan ke-2	Ulangan ke-1	Ulangan ke-2
1	35	33	55	77
2	25	39	63	68
3	45	31	50	66
4	44	28	75	57
5	37	31	44	62
Σ konidia	186	162	287	330
Rata-rata	174		308,5	
Σ konidia/ml	$8,7 \times 10^6$		$1,54 \times 10^7$	

Tabel 4.2.2. Hasil TPC *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA umur 23 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap

Kapang	Pengenceran	pengulangan	$\Sigma$ koloni 6 hari	$\Sigma$ CFU (CFU/ml)	$\Sigma$ CFU rata-rata (CFU/ml) $\pm$ SD
<i>M. majus</i> UICC 295	10 <sup>-4</sup>	1	55	6,20 x 10 <sup>6</sup>	6,62 $\pm$ 0,40 x 10 <sup>6</sup>
		2	56		
		3	75		
	10 <sup>-5</sup>	1	10	7,00 x 10 <sup>6</sup>	
		2	5		
		3	6		
	10 <sup>-6</sup>	1	1	6,70 x 10 <sup>6</sup>	
		2	0		
		3	1		

Tabel 4.2.3. Hasil TPC *M. majus* UICC 295 dalam medium SDYA umur 23 hari dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) pada suhu 28° C dengan kondisi gelap

Kapang	Pengenceran	pengulangan	$\Sigma$ koloni 6 hari	$\Sigma$ CFU (CFU/ml)	$\Sigma$ CFU rata-rata (CFU/ml) $\pm$ SD
<i>M. majus</i> UICC 295	10 <sup>-3</sup>	1	108	1,02 x 10 <sup>6</sup>	1,36 $\pm$ 0,38 x 10 <sup>6</sup>
		2	103		
		3	96		
	10 <sup>-4</sup>	1	14	1,77 x 10 <sup>6</sup>	
		2	20		
		3	19		
	10 <sup>-5</sup>	1	2	1,30 x 10 <sup>6</sup>	
		2	1		
		3	1		

Gejala infeksi *M. majus* UICC 295 terhadap larva *O. rhinoceros* terlihat pada seluruh larva dari kelompok perlakuan. Gejala awal pada larva setelah aplikasi adalah gerakan larva menjadi lambat, warna tubuh menjadi kusam, dan

muncul bercak-bercak coklat di sekitar permukaan tubuh larva. Infeksi kapang juga menyebabkan penurunan nafsu makan pada larva. Penurunan nafsu makan menyebabkan larva kekurangan nutrisi, sehingga energi yang dihasilkan dari proses metabolisme berkurang. Hal tersebut menyebabkan gerakan larva menjadi lambat. Menurut Sambiran dan Hosang (2007: 7) gejala awal larva *O. rhinoceros* yang terinfeksi *M. anisopliae* adalah tubuh larva menjadi kusam, nafsu makan larva berkurang, dan gerakan larva menjadi lambat.

Gejala awal yang terlihat pada larva setelah aplikasi, yaitu muncul bercak coklat pada permukaan tubuh larva (Gambar 4.2.1). Bercak coklat mulai terlihat pada tujuh larva pada hari kelima setelah aplikasi, 10 larva pada hari keenam setelah aplikasi, 23 larva pada hari ketujuh, dan 30 larva pada hari kedelapan. Bercak tersebut terlihat pada tubuh larva bagian bawah, dekat anus, dan antar segmen tubuh. Bercak coklat tersebut adalah melanin yang merupakan respon pertahanan tubuh serangga. Berdasarkan Capinera (2008: 1941--1943) produksi melanin menyebabkan tubuh serangga menjadi gelap. Melanin diproduksi ketika terjadi konversi fenoloksidase menjadi profenoloksidase oleh *proteolytic cascade system* (proPO-system). Menurut Samson dkk. (1988: 136) granulosit yang mengandung proPO-system melepaskan komponen dari proPO-system ketika konidia masuk ke dalam *haemocoel* dan mengalami kontak dengan hemosit. Hal tersebut memicu aktivasi proPO-system.



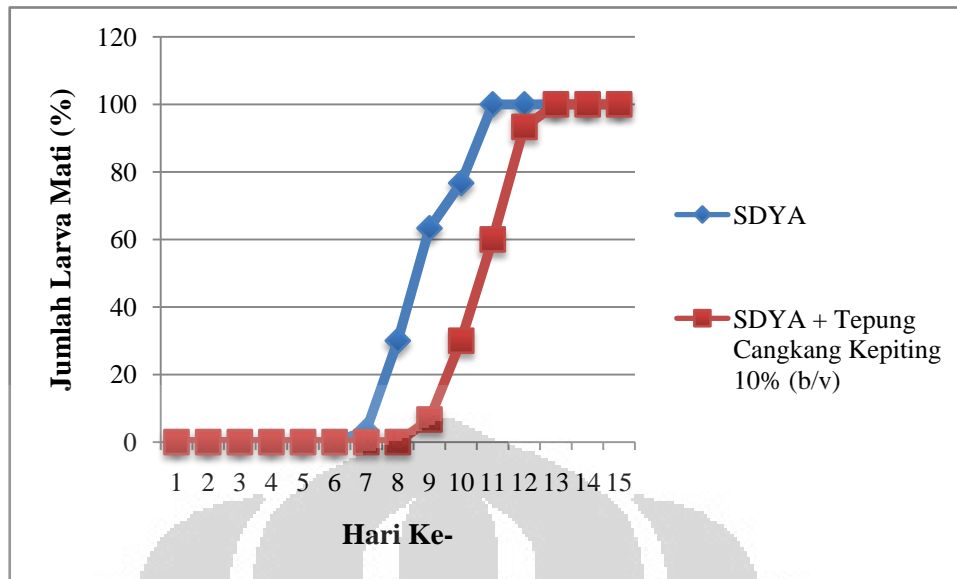
Gambar 4.2.1. Bercak coklat pada tubuh larva  
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) mampu membunuh larva 6,67%--100% dalam waktu 9--13 hari setelah aplikasi (Lampiran 21) (Gambar 4.2.2), sedangkan pada medium SDYA mampu membunuh larva 3,33%--100% dalam waktu 7--11 hari setelah aplikasi (Lampiran 20) (Gambar 4.2.2). Larva pada kelompok kontrol tidak mengalami kematian. Hasil pengamatan menunjukkan persentase kematian larva terkoreksi adalah 100%. Berdasarkan hasil pengamatan, *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) mampu membunuh larva 100% dalam waktu 5 hari sejak hari awal kematian. Namun demikian, terdapat perbedaan, yaitu larva yang diaplikasikan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA mengalami kematian awal dua hari lebih cepat dibandingkan dengan larva yang diaplikasikan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v). Diduga *M. majus* UICC 295 yang berasal dari medium SDYA melakukan infeksi pada larva lebih cepat dibandingkan dengan *M. majus* UICC 295 yang berasal dari medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting. Konidia *M. majus* UICC 295 yang berasal dari medium SDYA setelah diaplikasikan pada larva, akan bergeminasi membentuk *germ tube*, dan selanjutnya membentuk apresorium. Ketika *germ tube* terbentuk, maka dihasilkan enzim-enzim seperti kitinolitik dan proteolitik yang membantu kapang entomopatogen melakukan penetrasi pada kutikula larva. Medium SDYA tidak mengandung kitin, sehingga ketika konidia diaplikasikan pada larva, maka kitin pada kutikula larva akan menginduksi ekspresi gen pengkode sintesis enzim-enzim tersebut. Hal tersebut menyebabkan penetrasi konidia kapang pada kutikula larva menjadi lebih cepat dan mempercepat hari awal kematian larva. Konidia kapang yang berasal dari medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v), setelah diaplikasikan pada larva, akan berada pada kondisi kelebihan kitin. Hal tersebut menyebabkan kitin pada kutikula larva menekan ekspresi gen pengkode sintesis enzim-enzim kitinolitik dan proteolitik, sehingga memperlambat waktu penetrasi kapang ke dalam kutikula larva, dan memperlambat hari awal kematian larva. Menurut Dhar dan Kaur (2010: 8098), N-asetil-glukosamin (GlcNAc) pada konsentrasi tinggi akan dikatabolisme



menghasilkan katabolit yang berlebih, sehingga katabolit tersebut akan menekan ekspresi gen pengkode sintesis enzim. Berdasarkan Ali dkk. (2011: 1209), aktivitas enzim Pr1 oleh *M. anisopliae* pada medium pertumbuhan dengan penambahan kutikula *diamondback* lebih tinggi dibandingkan pada medium pertumbuhan dengan penambahan kutikula *diamondback* dan GlcNAc 1%.

Suhu ruang larva rata-rata adalah 27,84° C dengan kelembaban relatif ruangan rata-rata adalah 86,86 % (Lampiran 20 dan Lampiran 21). Suhu dan kelembaban ruangan tersebut termasuk suhu dan kelembaban yang dapat mendukung pertumbuhan *M. majus* UICC 295. Ruang larva yang ditutupi dengan kertas karbon bertujuan agar ruang larva tidak terpapar oleh cahaya matahari. Pertumbuhan *M. majus* UICC 295 akan terhambat bila terpapar ultra violet dari cahaya matahari. Hal tersebut disebabkan ultraviolet dari cahaya matahari akan merusak struktur DNA. Kapang akan mengalami perubahan pada struktur DNA. Perubahan struktur DNA dapat menyebabkan sintesis enzim yang terlibat dalam metabolisme tidak terjadi. Hal tersebut menyebabkan metabolisme kapang terhambat, sehingga menghambat pertumbuhan kapang. Menurut Prayogo dkk. (2005: 20), keefektifan kapang dalam menginfeksi larva juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan, seperti suhu dan kelembaban. Menurut Arthurs dan Thomas (2001: 60 & 62), suhu dan kelembaban relatif yang mendukung pertumbuhan *M. anisopliae* var. *acridum* masing-masing adalah 20--30° C dan 80--100%. Leland (2001: 6) melaporkan bahwa paparan ultraviolet dari cahaya matahari dapat menghambat germinasi *Metarhizium* spp. Paparan ultraviolet dari cahaya matahari dapat merusak protein dan asam nukleat, sehingga mengakibatkan kerusakan DNA. Replikasi DNA menjadi terhambat karena terjadi DNA repair untuk memperbaiki kerusakan DNA. hal tersebut dapat menghambat germinasi konidia kapang.

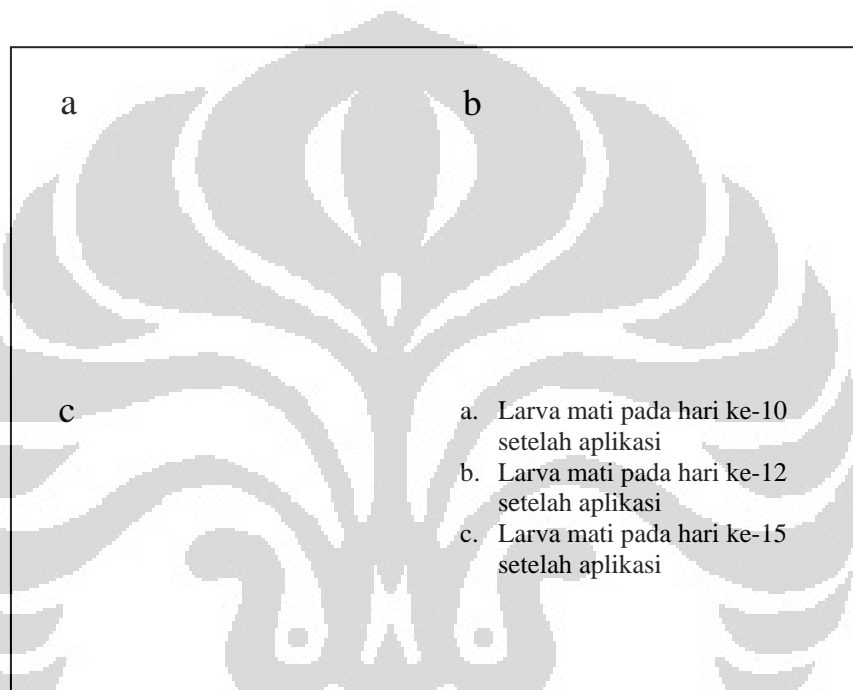


Gambar 4.2.2. Grafik Jumlah kematian larva selama 15 Hari pada pengujian suspensi konidi/hifa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v)

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Larva *O. rhinoceros* yang diinokulasikan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA mulai mati pada hari ketujuh setelah aplikasi. Tubuh larva mulai mengeras dan berwarna kusam setelah larva mati. Hifa kapang mulai tumbuh di permukaan tubuh larva pada hari ketiga setelah larva mati. Kapang mulai bersporulasi pada hari keempat setelah larva mati. Konidia kapang yang berwarna hijau menutupi seluruh bagian tubuh larva pada hari kelima setelah larva mati. Larva *O. rhinoceros* yang diinokulasikan dengan *M. majus* UICC 295 dari medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) mulai mati pada hari kesembilan setelah aplikasi. Tiga hari setelah kematian larva, hifa kapang mulai tumbuh pada permukaan tubuh larva. Empat hari setelah larva mati, kapang mulai bersporulasi. Enam hari setelah larva mati, konidia kapang menutupi seluruh bagian tubuh larva (Gambar 4.2.3). Konidia berhasil menembus integumen serangga, sehingga berkembang di dalam *haemocoel* serangga dan menghasilkan toksin. Toksin yang dihasilkan kapang menyebabkan serangga mati. Kapang kemudian menyerap cairan tubuh larva, sehingga tubuh larva menjadi kaku. Berdasarkan Samson dkk. (1988: 137), toksin berupa destruksin

yang dikeluarkan kapang di dalam *haemocoel* menyebabkan depolarisasi membran otot serangga dan menyebabkan kelumpuhan pada serangga. Hal tersebut menyebabkan kematian pada serangga. Menurut Prayogo dkk. (2005: 21), cairan tubuh serangga yang telah mati dimanfaatkan oleh kapang sebagai nutrisi, sehingga menyebabkan tubuh serangga menjadi kaku seperti mumi. Kapang berkembang menjadi hifa menembus integumen serangga dan menghasilkan konidia ketika kondisi lingkungan menguntungkan bagi kapang.



Gambar 4.2.3. Pertumbuhan *M. majus* UICC 295 dari SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) pada larva *O. rhinoceros* mati

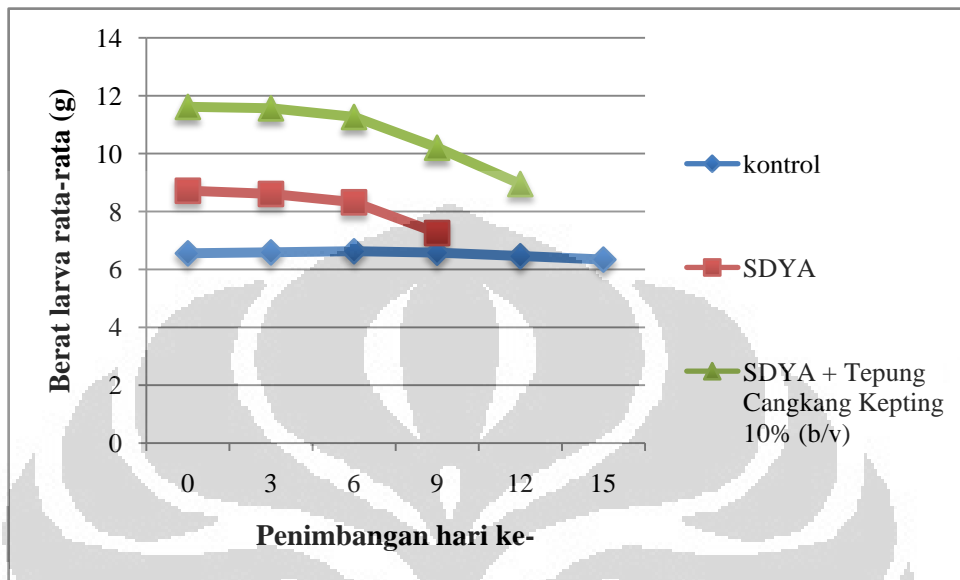
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Perhitungan berat badan larva setelah aplikasi bertujuan untuk mengetahui pengaruh infeksi *M. majus* UICC 295 terhadap berat badan larva. Berat badan larva rata-rata dari kelompok perlakuan yang diaplikasikan dengan *M. majus* UICC 295 pada SDYA (KP S) (Lampiran 23) dan dari kelompok perlakuan yang diaplikasikan dengan *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) (KP CK) (Lampiran 24) menurun setiap penimbangan tiga hari sekali selama 15 hari (Gambar 4.2.4). Hal tersebut terjadi

karena kapang yang menginfeksi larva menyerap cairan tubuh larva sebagai sumber nutrisi. Sumber nutrisi dari larva berasal dari hemolimfa larva, yaitu karbohidrat, protein, lipid, dan kitin. Larva yang terinfeksi kapang juga mengalami penurunan nafsu makan, sehingga menyebabkan berat badan larva juga menurun. Diduga saluran pencernaan mengalami gangguan karena otot pada saluran pencernaan mengalami kelumpuhan. Kelumpuhan otot pada saluran pencernaan disebabkan otot mengalami kontraksi terus menerus karena destruksi yang dihasilkan oleh kapang menyebabkan depolarisasi membran otot. Hal tersebut menyebabkan larva tidak dapat menyerap nutrisi, sehingga larva akan kekurangan nutrisi. Larva menjadi lemah dan gerakan larva menjadi lambat. Menurut Samuels (1998: 230 & 234), destruksi merupakan toksin neuromuskular yang menyebabkan depolarisasi membran otot sehingga dengan mempengaruhi transpor ion  $Ca^{2+}$ . Campbell dkk. (2008: 1108) menyatakan bahwa depolarisasi menyebabkan  $Ca^{2+}$  channel terbuka, sehingga konsentrasi  $Ca^{2+}$  di dalam sitosol meningkat. Ion-ion  $Ca^{2+}$  di dalam sitosol terikat dengan kompleks troponin dan menyebabkan tropomiosin bergerak, sehingga situs pengikat miosin terbuka. Hal tersebut menyebabkan aktin dan miosin berikatan, sehingga terjadi kontraksi. Kontraksi secara terus menerus dapat menyebabkan kelumpuhan pada otot. Berdasarkan Prayogo dkk. (2005: 21), cairan tubuh serangga yang telah mati dimanfaatkan oleh kapang sebagai nutrisi, sehingga menyebabkan berat badan larva menurun. Berdasarkan Samson dkk. (1988: 128), kutikula serangga mengandung kitin, protein, dan lipid. Gullan dan Cranston (2010: 69) melaporkan bahwa hemolimfa serangga mengandung lipid, karbohidrat, asam amino, protein, dan asam organik.

Larva dari kelompok perlakuan yang diaplikasikan dengan *M. majus* UICC 295 pada SDYA (KP S) (Lampiran 23) dan dari kelompok perlakuan yang diaplikasikan dengan *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) (KP CK) (Lampiran 24) juga mengalami kenaikan berat badan pada hari ke-3 setelah aplikasi. Hal tersebut kemungkinan disebabkan proses penetrasi kapang *M. majus* UICC 295 berlangsung lama. Dugaan lain adalah belum banyak hifa yang berkembang menjadi *yeast-like-cell* di dalam *haemocoel*. Menurut Samson dkk. (1988: 133), penetrasi *germ tube*

berlangsung lama karena prokutikula pada integumen serangga memiliki struktur tebal dan keras. Berdasarkan Gullan dan Cranston (2010: 26), prokutikula serangga mengandung kitin.



Gambar 4.2.4. Grafik berat larva rata-rata yang masih hidup setelah aplikasi pada pengujian suspensi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v)

Hasil pengujian memperlihatkan bahwa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) mampu membunuh larva *O. rhinoceros* 100%, sama seperti *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA. Hal tersebut menunjukkan bahwa medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting dapat dimanfaatkan sebagai medium pertumbuhan *M. majus* UICC 295. Cangkang kepiting merupakan limbah, sehingga medium pertumbuhan untuk *M. majus* UICC 295 dapat diperoleh dengan biaya rendah.

#### 4.3. PRESERVASI SUSPENSI HIFA/KONIDIA *M. majus* UICC 295

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa *M. majus* UICC 295, baik pada medium SDYA (Gambar 4.3.1), maupun SDYA dengan penambahan tepung

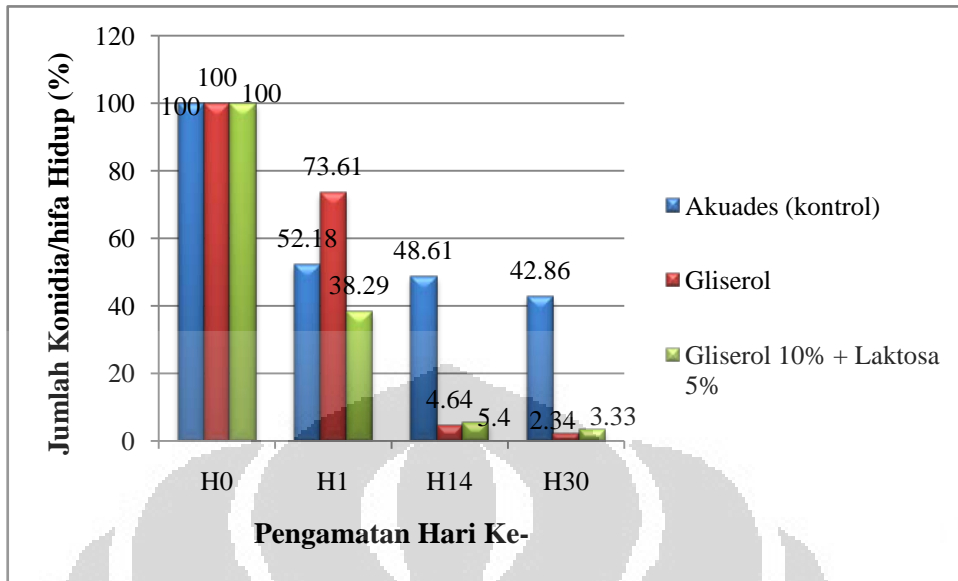
cangkang kepiting 10% (b/v) (Gambar 4.3.2) memiliki viabilitas lebih tinggi setelah dipreservasi menggunakan akuades dibandingkan menggunakan gliserol 10% (v/v) maupun gliserol (v/v) dengan penambahan laktosa (b/v) (Tabel 4.3). Jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 yang hidup setelah preservasi selama satu hari menggunakan gliserol 10% (v/v) lebih banyak dibandingkan menggunakan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan laktosa 5% (b/v). Jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 menurun setelah preservasi menggunakan *cryoprotectant*. *Cryoprotectant*, seperti gliserol dan laktosa menyebabkan konsentrasi larutan bagian ekstraseluler menjadi tinggi, sehingga keadaan menjadi hipertonik. Oleh karena itu, sel membutuhkan waktu ekuilibrase yang tepat agar *cryoprotectant* masuk ke dalam sel, sehingga keadaan menjadi isotonik. Waktu ekuilibrase gliserol yang digunakan pada penelitian adalah satu jam, sedangkan gliserol membutuhkan waktu lebih dari satu jam untuk mencapai bagian intraseluler. Waktu ekuilibrase yang tidak tepat menyebabkan gliserol masih berada pada bagian ekstraseluler ketika *freezing*, sehingga tekanan osmotik ekstraseluler lebih tinggi daripada intraseluler. Hal tersebut menyebabkan cairan bagian intraseluler keluar ke bagian ekstraseluler, sehingga sel mengalami *osmotic shock*. Kapang yang dipreservasi pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  ketika sedang mengalami *osmotic shock* menyebabkan sel kapang juga mengalami *cold shock*. *Cold shock* menyebabkan kristal es yang kasar terbentuk, sehingga merusak membran sel dan menyebabkan sel kapang mati. Menurut Hubalek (2003: 216), *penetrating cryoprotectant* membutuhkan waktu dan suhu ekuilibrase untuk mencapai intraseluler sebelum *freezing*. Terdapat dua sifat *cryoprotectant* berdasarkan waktu ekuilibrase, yaitu *penetrating cryoprotectant* lambat dan *penetrating cryoprotectant* cepat. Gliserol merupakan *penetrating cryoprotectant* yang lambat. Waktu ekuilibrase untuk gliserol adalah 1--4 jam dengan suhu ekuilibrase yang tinggi dan sesuai dengan suhu optimum masing-masing jenis mikroorganisme. Berdasarkan Prayogo dkk. (2005: 20), suhu yang mendukung pertumbuhan *M. anisopliae* adalah  $22\text{--}27^{\circ}\text{C}$ .

Kapang *M. majus* UICC 295 yang dipreservasi menggunakan akuades memiliki viabilitas lebih tinggi dibandingkan menggunakan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan laktosa 5% (b/v) (Tabel 4.3)

(Lampiran 25 dan Lampiran 28). Kapang entomopatogen, seperti *M. majus* diduga menghasilkan *compatible solute* yang dapat berfungsi sebagai *cryoprotectant*, sehingga mampu melindungi sel dari kerusakan akibat *freezing*. *Compatible solute* akan mempertahankan keadaan antara intraseluler dan ekstraseluler tetap isotonik. *Compatible solute* yang dihasilkan di dalam sel menyebabkan tekanan osmotik intraseluler menjadi naik dan *freezing* pada  $-80^{\circ}\text{C}$  menyebabkan tekanan osmotik ekstraseluler juga naik, sehingga keadaan intraseluler dan ekstraseluler menjadi isotonik. Mokiou dan Magan (2008: 1065) menyatakan bahwa preservasi jangka panjang dapat mempertahankan viabilitas mikroorganisme. Hal tersebut disebabkan dalam kondisi *physiology stress* dapat meningkatkan sintesis *compatible solute* oleh mikroorganisme, seperti trehalosa dan gula alkohol (eritriol dan gliserol). Menurut Madigan dkk. (1997: 171), *compatible solute* merupakan zat terlarut yang terakumulasi di sitoplasma sel untuk penyesuaian *water activity* ( $a_w$ ) tanpa menghambat proses biokimia sel, sehingga keadaan intraseluler dan ekstraseluler tetap isotonik. Berdasarkan Leland (2001: 9--10), dalam kondisi yang tidak menguntungkan menyebabkan *M. anisopliae* var. *acidum* akan memproduksi *compatible solute*, yaitu gula alkohol (gliserol, eritriol, arabitol, dan manitol) dan disakarida (trehalosa) untuk melapisi konidia dan melindungi konidia dari kekeringan.

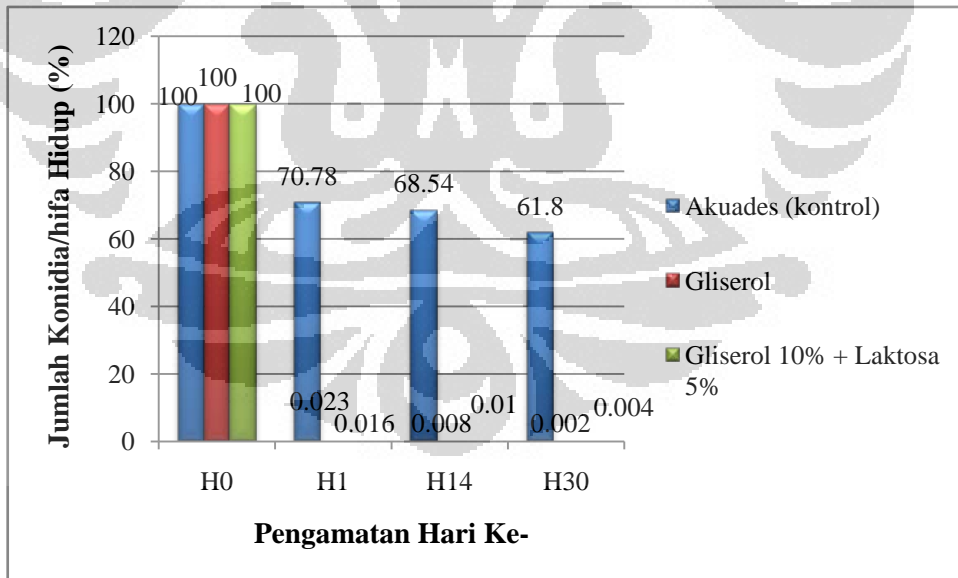
Tabel 4.3. Hasil perhitungan jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 setelah preservasi

<i>M. majus</i> UICC 295	<i>Cryoprotectant</i>	$\Sigma$ konidia/hifa hidup (CFU/ml)				$\Sigma$ konidia/hifa hidup (%)		
		(H <sub>0</sub> )	(H <sub>1</sub> )	(H <sub>14</sub> )	(H <sub>30</sub> )	(H <sub>1</sub> )	(H <sub>14</sub> )	(H <sub>30</sub> )
	Akuades (Kontrol)	5,04 x 10 <sup>6</sup>	2,63 x 10 <sup>6</sup>	2,45 x 10 <sup>6</sup>	2,16 x 10 <sup>6</sup>	52,18	48,61	42,86
SDYA	Gliserol 10%	5,04 x 10 <sup>6</sup>	3,71 x 10 <sup>6</sup>	2,34 x 10 <sup>5</sup>	1,18 x 10 <sup>5</sup>	73,61	4,64	2,34
	Glisero 10% + Laktosa 5%	5,04 x 10 <sup>6</sup>	1,93 x 10 <sup>6</sup>	2,72 x 10 <sup>5</sup>	1,68 x 10 <sup>5</sup>	38,29	5,40	3,33
SDYA + tepung cangkang keping 10%	Akuades (Kontrol)	1,78 x 10 <sup>6</sup>	1,26 x 10 <sup>6</sup>	1,22 x 10 <sup>6</sup>	1,11 x 10 <sup>6</sup>	70,78	68,54	61,80
	Gliserol 10%	1,78 x 10 <sup>6</sup>	4,06 x 10 <sup>2</sup>	1,40 x 10 <sup>2</sup>	43,3	0,023	0,008	0,002
	Glisero 10% + Laktosa 5%	1,78 x 10 <sup>6</sup>	2,94 x 10 <sup>2</sup>	1,78 x 10 <sup>2</sup>	64,85	0,016	0,010	0,004



Gambar 4.3.1. Diagram jumlah konidia/hifa hidup *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

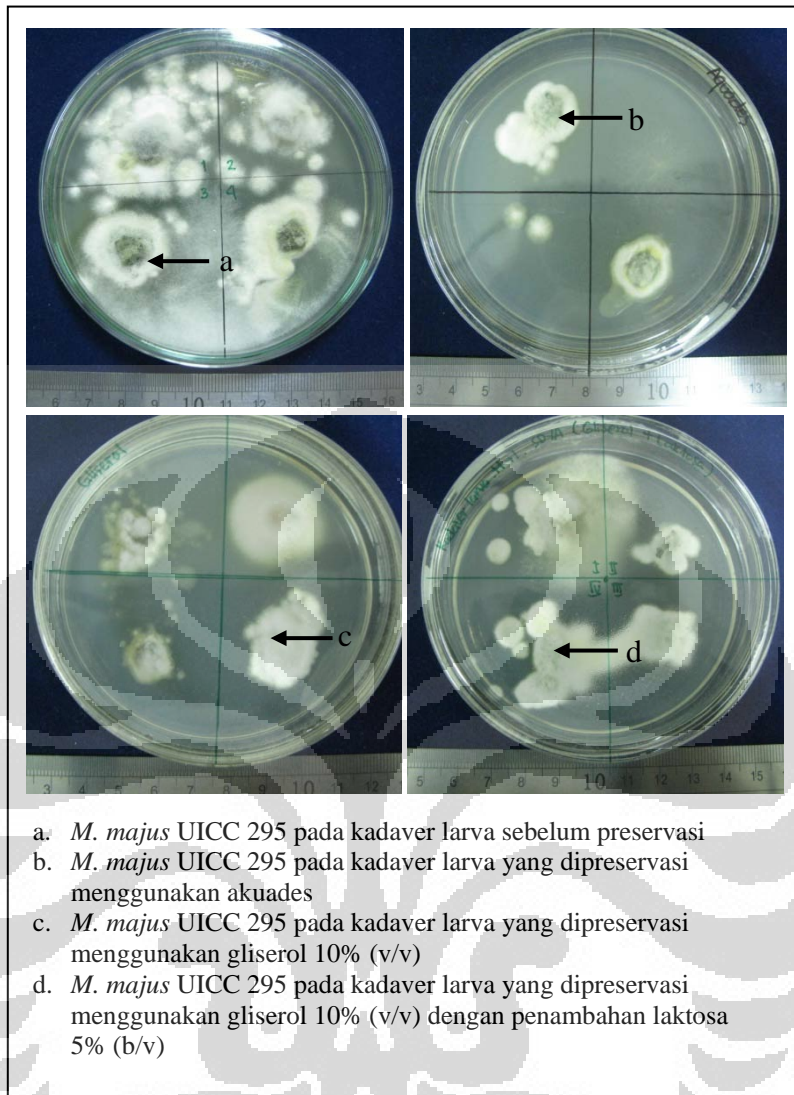


Gambar 4.3.2. Diagram jumlah konidia/hifa hidup *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) setelah preservasi

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



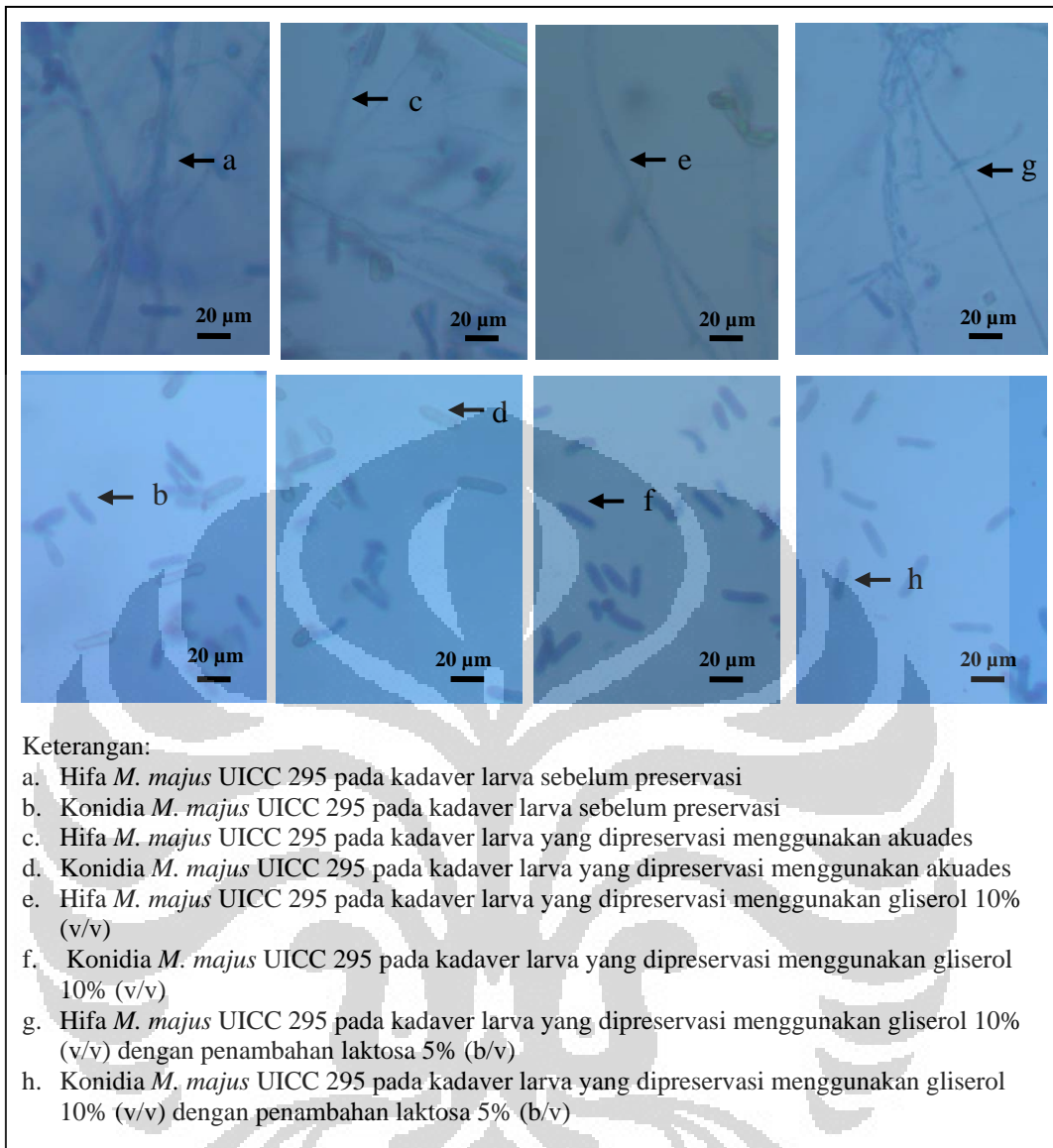
Berdasarkan hasil pengamatan, *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA tetap viabel setelah preservasi selama 30 hari, baik menggunakan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan laktosa 5% (b/v), maupun menggunakan akuades (kontrol) (Tabel 4.3). Jumlah konidia/hifa hidup pada medium tersebut termasuk banyak, yaitu memiliki kisaran  $10^5$ -- $10^6$  CFU/ml. Kapang *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang 10% (b/v) juga tetap viabel setelah preservasi selama 30 hari, walaupun jumlah konidia/hifa hidup yang dipreservasi menggunakan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan laktosa 5% (b/v) sangat kecil. Gliserol merupakan salah satu *cryoprotectant* yang melindungi bagian ekstraseluler dan intraseluler. Laktosa merupakan *cryoprotectant* yang melindungi bagian ekstraseluler. Menurut Hubalek (2003: 218 & 220), gliserol merupakan salah satu *penetrating cryoprotectant*. *Penetrating cryoprotectant* dapat mengikat air di dalam sel, sehingga mencegah dehidrasi yang berlebihan, mengurangi konsentrasi garam dan mencegah pembentukan kristal es kasar pada bagian ekstraseluler dan intraseluler. *Penetrating cryoprotectant* dapat menstimulasi pembentukan kristal es yang halus, sehingga tidak merusak membran sel. *Non-penetrating cryoprotectant*, seperti laktosa mampu menghambat pembentukan kristal es pada bagian ekstraseluler dengan meningkatkan kekentalan larutan. Peningkatan kekentalan larutan mengindikasikan kandungan air bagian ekstraseluler rendah, sehingga kristal es menjadi bentuk yang halus.



- a. *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva sebelum preservasi
- b. *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva yang dipreservasi menggunakan akuades
- c. *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva yang dipreservasi menggunakan gliserol 10% (v/v)
- d. *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva yang dipreservasi menggunakan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan laktosa 5% (b/v)

Gambar 4.3.3. Koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi satu hari dengan kadaver larva

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



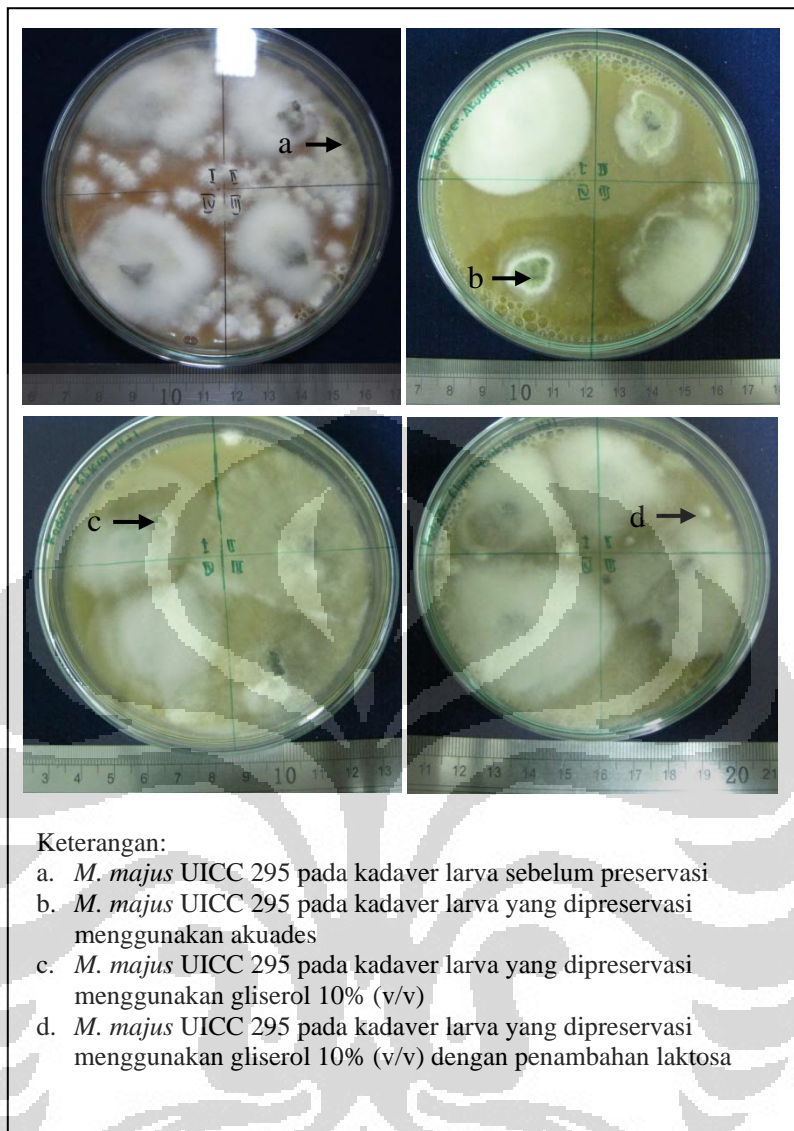
Gambar 4.3.4. Hasil pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 secara mikroskopik pada medium SDYA setelah dipreservasi bersama kadaver selama satu hari

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Pengujian viabilitas *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva *O. rhinoceros* setelah preservasi dilakukan secara kualitatif, yaitu melihat adanya pertumbuhan *M. majus* UICC 295 ketika ditumbuhkan pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v). Pertumbuhan *M. majus* UICC 295 juga dibuktikan dengan melakukan pengamatan kapang secara mikroskopik. Kapang *M. majus* UICC 295 bersama kadaver ditumbuhkan pada kedua medium

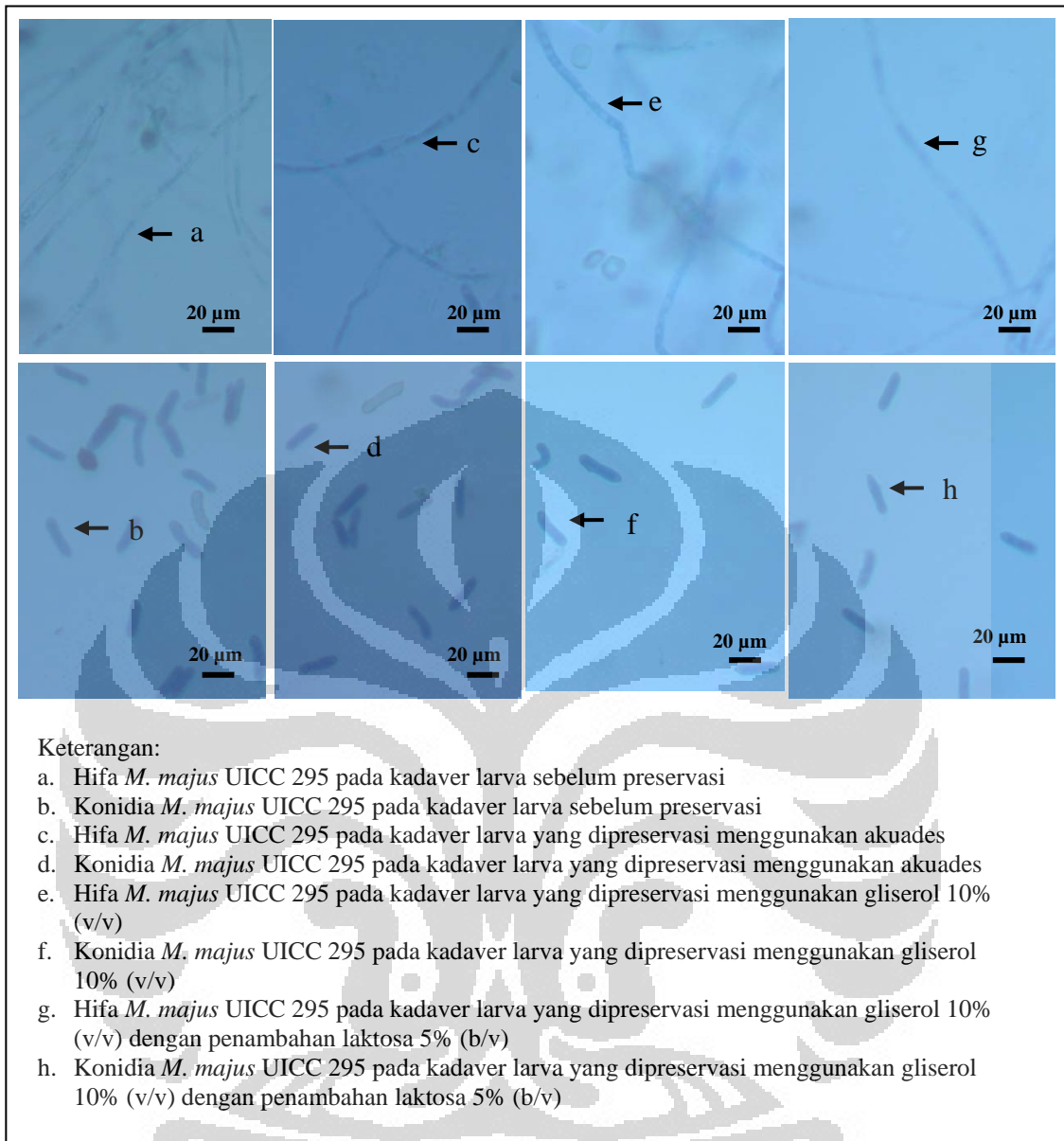
sebelum preservasi untuk mengetahui pertumbuhan awal kapang. Hasil setelah preservasi menunjukkan bahwa *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA (Gambar 4.3.3) dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) (Gambar 4.3.5) bersama kadaver tetap viabel. Pertumbuhan *M. majus* UICC 295 pada medium terlihat dengan adanya pertumbuhan hifa dan sporulasi, tetapi pertumbuhan kapang lain dan khamir juga ditemukan pada medium (Gambar 4.3.3 dan Gambar 4.3.5). Hal tersebut mengindikasikan bahwa kadaver larva mengandung berbagai macam mikroorganisme. Pertumbuhan kapang juga dibuktikan dari hasil pengamatan morfologi kapang secara mikroskopik yang menunjukkan bahwa kapang tersebut adalah *M. majus* UICC 295, yaitu kapang memiliki hifa bercabang dan berseptum, serta memiliki konidia berbentuk silindris (Gambar 4.3.4 dan Gambar 4.3.6). Menurut Bischoff dkk. (2009: 525), *M. majus* memiliki konidia berbentuk silindris. Berdasarkan Tzean dkk. (1997: 150), *M. anisopliae* var. *majus* memiliki hifa bercabang. Berdasarkan Rosadi (2011: 27) *M. majus* memiliki hifa berseptum.

Kapang *M. majus* UICC 295 yang dipreservasi bersama kadaver larva pada  $-80^{\circ}$  C tetap viabel. Hal tersebut disebabkan larva *O. rhinoceros* merupakan substrat alami bagi *M. majus* UICC 295. Beberapa jenis kapang entomopatogen tetap memiliki viabilitas setelah dipreservasi bersama inang yang merupakan substrat alami. Berdasarkan Smith dan Onions (1994: 68), fungi dari marga *Fusarium* tetap viabel setelah dipreservasi dengan substrat berupa tanah selama sepuluh tahun. Menurut Nakasone dkk. (2004: 39--40), fungi seperti *Sclerotinia*, *Magnaporthe*, dan *Leptosphaeria* yang dipreservasi pada biji gandum mampu bertahan hidup selama sepuluh tahun. *Neozygites fresenii* tetap viabel setelah dipreservasi bersama inang fungi tersebut, yaitu kutu daun.



Gambar 4.3.5 Koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) setelah preservasi satu hari dengan kadaver larva

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.3.6. Hasil pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 secara mikroskopik pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) setelah dipreservasi bersama kadaver selama satu hari

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Hasil dari penelitian ini memperlihatkan bahwa medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) dapat dimanfaatkan sebagai medium pertumbuhan *M. majus* UICC 295. Kapang *M. majus* UICC 295 pada medium tersebut memiliki potensi sebagai bioinsektisida yang mampu membunuh



larva *O. rhinoceros* 100%. Kapang *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v), baik dalam bentuk suspensi, maupun pada kadaver larva, tetap viabel setelah preservasi selama 30 hari menggunakan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan laktosa 5% (b/v). Akan tetapi, kapang yang dipreservasi dalam bentuk suspensi menggunakan kedua *cryoprotectant* tersebut mengalami penurunan viabilitas. Oleh karena itu, penelitian lebih lanjut mengenai preservasi *M. majus* UICC 295 menggunakan gliserol dengan waktu dan suhu ekuilibrisasi yang tepat untuk mempertahankan viabilitas dan kemampuan kapang dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros* perlu dilakukan.



## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 KESIMPULAN

1. *Metarhizium majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA mampu membunuh larva 3,33%--100% dalam waktu 7--11 hari setelah aplikasi, sedangkan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) mampu membunuh larva 6,67%--100% dalam waktu 9--13 hari setelah aplikasi.
2. Viabilitas *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) yang dipreservasi pada suhu -80° C menggunakan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan laktosa 5% (b/v) lebih rendah dibandingkan menggunakan akuades.
3. Preservasi *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva *O. rhinoceros* pada suhu -80° C mampu mempertahankan viabilitas kapang.

#### 5.2 SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai preservasi *M. majus* UICC 295 menggunakan *cryoprotectant* dengan waktu dan suhu ekuilibrase yang tepat untuk mengetahui pengaruh preservasi terhadap viabilitas kapang.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai preservasi *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva *O. rhinoceros* steril untuk mengetahui pengaruh preservasi terhadap viabilitas kapang.
3. Perlu dilakukan lebih lanjut penelitian mengenai kemampuan *M. majus* UICC 295 setelah dipreservasi dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros* untuk mengetahui patogenisitas kapang.



## DAFTAR REFERENSI

- Ali, S., Z. Huang, W. QeZang, & S.X. Ren. 2011. Production and regulation of extracelullar proteases from the entomophatogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (*Cordycipitaceae; Hypocreales*) in the presence of diomondback moth cuticle. *Pakistan Journal Zoology* **43**(6): 1203--1213.
- Atlas, R.M. 2010. *Microbiological media*. 4th ed. CRS Press, Boca Raton: iii + 2036 hlm.
- Arthurs, S & M. B. Thomas. 2001. Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. *Journal of invertebrate Pathology* **78**: 59--65.
- Benson. 2001. *Microbiological application: Laboratory manual in general microbiology*. 8th ed. The McGraw-Hill Companies, New York: xi + 478 hlm.
- Bischoff, J.F., S.A. Rehner & R.A. Humber. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* **101**: 512--530.
- Campbell, N.A., J.B. Reece, L.A. Urry, M.L. Cain, S.A. Wasserman, P.V. Minorsky, & R.B. Jackson. *Biology*. 8th ed. Benjamin Cummings, San Francisco: xlvi + 1418 hlm.
- Capinera, J.L. 2008. *Encyclopedia of entomology*. 2nd. Springer, Florida: lxiv + 4345 hlm.
- Cappuccino, J.G. & N. Sherman. 2001. *Microbiology: A laboratory manual*. Benjamin Cummings, San Francisco: xvi + 491 hlm.
- Carlile, M.J., S.C. Watkinson, & G.W. Gooday. 2001. *The fungi*. Academic Press, London: xix + 588 hlm.
- Chan, E. & C.R. Elevitch. 2006. *Cocos nucifera* (coconut). *Permanent Agriculture Resources* **2.1**: 1--27.
- 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, R-C & P. Quinn. 2010. *Fertility cryopreservation*. Cambridge University Press, New York: xiv + 271 hlm.

- Dasari, R.K., & R.E. Berson. 2007. The effect of particle size on hydrolysis reaction rate and rheological properties in cellulosic slurries. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **137--140**(1--12): 289--299.
- Deacon, J.W. 2006. *Fungal biology*. 4th ed. Blackwell Publishing, Oxford: vii + 371 hlm.
- Departemen Pertanian. 1993. *Baku operasional pengendalian terpadu hama kumbang kelapa (Oryctes rhinoceros L.)*. Direktorat Bina Perlindungan Tanaman Perkebunan, Jakarta: iv + 17 hlm.
- Desyanti, Y.S. Hadi, S. Yusuf, & T. Santoso. 2007. Keefektifan beberapa spesies cendawan entomopatogen untuk mengendalikan rayap tanah *Coptotermes gestroi* WASMANN (Isoptera: Rhinotermitidae) dengan metode kontak dan umpan. *Jurnal Ilmu & Teknologi Kayu Tropis* **5**(2): 68--77.
- Dhar, P & G, Kaur. 2010. Effect of carbon and nitrogen sources on the induction and repression of chitinase enzymes from *Beauveria bassiana* isolates. *African Journal of Biotechnology* **9**(47): 8092--8099.
- Digital. 2008. Colour chart for Faber Castell polychromos pencils and pastels. <http://www.drawinganddrafting.com/au/category2471.htm>, 18 April 2012, pk. 19.30.
- Ellouze, M., F. Aloui, & S. Sayadi. 2009. Effect of high ammonia concentrations on fungal treatment of Tunisian landfill leachates. *Desalination* **248**: 147--156.
- Gandjar, I., W. Sjamsuridzal, & A. Oetari. 2006. *Mikologi dasar dan terapan*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta: xi + 238 hlm.
- Gopal, M., A. Gupta, & G.V. Thomas. 2006. Prospects of using *Metarhizium anisopliae* to check the breeding of insect pest, *Oryctes rhinoceros* L. in coconut leaf vermicomposting sites. *Bioresource Technology* **97**: 1801--1806.
- Gullan, P.J & P.S Cranston. 2010. *The insect: An outline of entomology*. 4th ed. Wiley-Blackwell, Canberra: xvi + 565 hlm.
- Gusmana, P.H. 2011. Pembuatan dan pengujian formula *Metarhizium majus* UICC 295 dengan media pembawa substrat beras (*Oryza sativa*) terhadap larva *Oryctes rhinoceros*. Skripsi Sarjana Departemen Biologi FMIPA-UI, Depok: xiii + 63 hlm.

- Hanson, J.R. 2008. *The chemistry of fungi*. The Royan Society of Chemistry, Cambridge: xi + 221 hlm.
- Hashim, N. & Y.B. Ibrahim. 2003. Efficacy of entomopathogenic fungi, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Beauveria bassiana*, and *Metarhizium anisopliae* var. *majus* against *Crocidolomia binotalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Pertanika Journal Tropical Agricultural Science*. **26**(2): 103--108.
- 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 Horticultural* **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.). *J. HPT 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.
- Hoe, P-K, C-F.J. Boong, K. Jugah, & A. Rajan. 2009. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycete) isolates and their effects on subterranean termite *Coptotermes curvignathus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* **4**(4): 289--297.
- 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.
- Huger, A.M. 2005. The *Oryctes* virus: Its detection, identification, and implementation in biological control of the coconut palm rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Invertebrate Pathology* **89**(1): 78--84.
- 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.
- Jackson, M. A. & S. T. Jaronski. 2009. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological Research* **113**: 842--850.
- Kang, S.C., S. Park, & D.G Lee. 1999. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **73**, 276--281.
- Kendrick, B. 2000. *The fifth kingdom*. 3rd ed. Focus, Newburyport: xii + 373 hlm.
- Leger, R. J. St., M. J. Bidochka, & D. W. Roberts. 1994. Germination triggers of *Metarhizium anisopliae* conidia are related to host species. *Microbiology* **140**: 1651--1660.
- Leland, J. E. 2001. Environmental-stress tolerant formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* for control of African desert locust (*Schistocerca gregaria*). Dissertation submitted to the Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor Philosophy in Entomology, Virginia: xviii + 173 hlm.
- Li, X. & S. Roseman. 2004. The chitinolytic cascade in vibrios is regulated by chitin oligosaccharides and a two-component chitin catabolic sensor/kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**(2): 627--631.
- Liu, Z.Y., Z.Q. Liang, A.J.S. Whalley, A.J. Yao & A.Y Liu. 2001. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *Journal of Invertebrata Pathology* **78**: 178--182.
- Male, K.B., Y-M. Tzeng, J. Montes, B-L. Liu, W-C. Liao, A. Kamen, & J.H.T. Luong. 2009. Probing inhibitory effects of destruxins from *Metarhizium anisopliae* using insect cell based impedance spectroscopy: Inhibition vs chemical structure. *Analyst* **134**: 1447--1452.
- Matsumoto, Y., G. Saucedo-Castaneda, S. Revah & K. Shirai. 2003. Production of  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and

inducer. 26 Juni 2003: 6 hlm.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959203001407>,

02 Desember 2011, pk 19.00.

Matsumoto, K.S. 2006. Fungal chitinase. *Enzyme* **661**(186): 289--304.

Mokiou, S. & N. Magan. 2008. Physiological manipulation and formulation of the biocontrol yeast *Pichia anomala* for control of *Penicillium verrucosum* and ochratoxin A contamination of moist grain. *Biocontrol Science and Technology* **18**(10): 1063--1073.

Murjito, N. 2010. Penggunaan metode *freezing* (-4°C) dan metode *liquid-drying* untuk preservasi strain-strain khamir *Basidiomycota* koleksi University of Indonesia Culture Collection (UICC). Skripsi Sarjana Departemen Biologi FMIPA-UI, Depok: xv + 60 hlm.

Mustafa, U. & G. Kaur. 2009. Effects of carbon and nitrogen sources and ratio on the germination, growth, and sporulation characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates. *African Journal of Agricultural Research* **3**(10): 922--930.

Nakasone, K.K., S.W. Peterson, & S-C. Jong. 2004. Preservation and distribution of fungal cultures. *Dalam*: Mueller, G.M., G.F. Bills, & M.S. Foster. *Biodiversity of fungi*. Elsevier Academic Press, USA: xviii + 777 hlm.

Natasasmita, S. & Sunarto, T. 2004. Pengendalian NSK (Nematoda Sista Kuning) dengan bahan alami berkhitin. Laporan Penelitian Jurusan Hama dan Penyakit, Fakultas Pertanian-UNPAD, Bandung: 19 hlm.

Nayar, K.K., T.N. Ananthkrishnan & B.V. David. 1976. *General and applied entomology*. Tata McGraw-Hill, New Delhi: xii + 589 hlm.

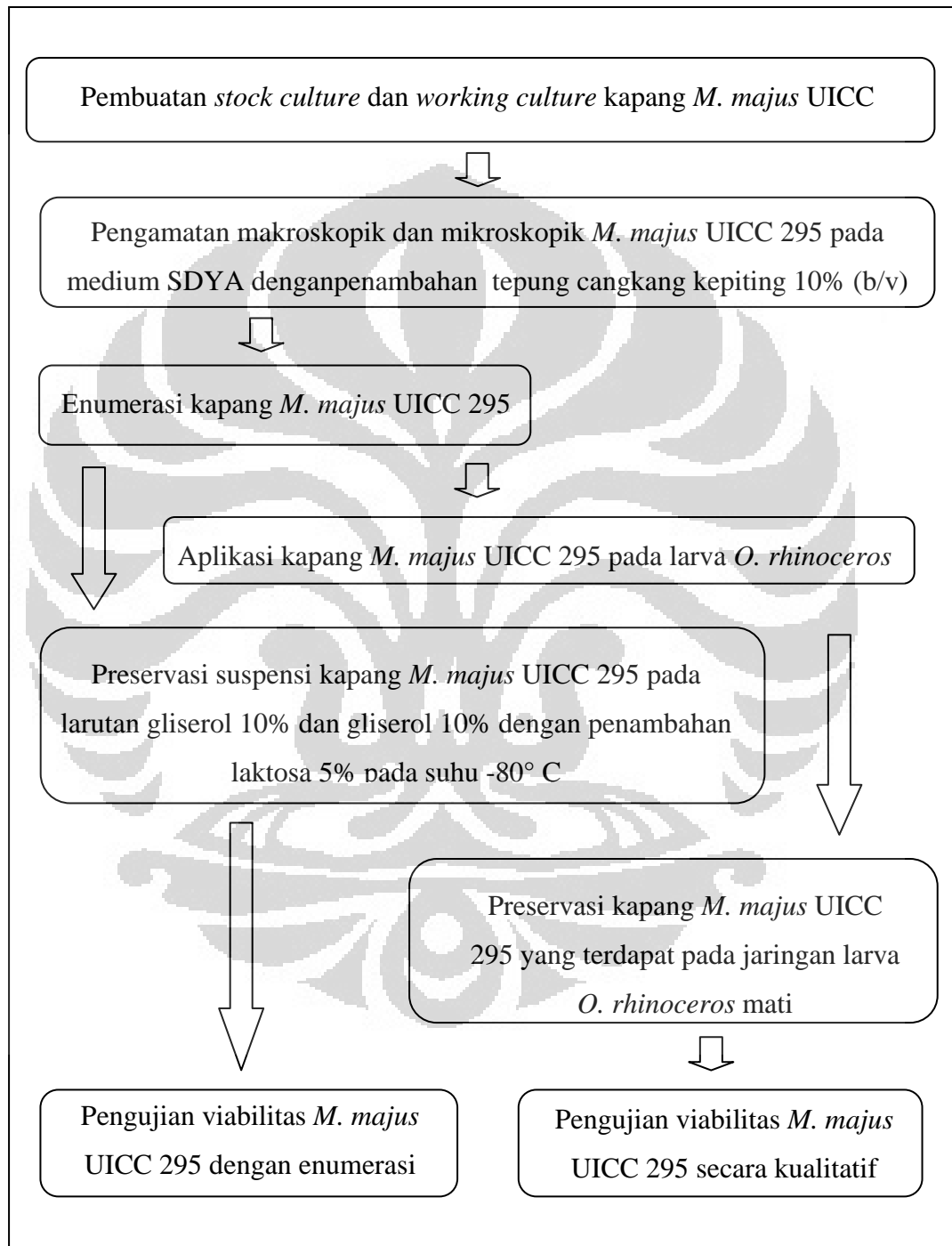
Pasaribu, H. & R.D. de Cheon. 2005. Strategi pengendalian hama *Oryctes rhinoceros* di PT. Tolan Tiga Indonesia (Sipef Group). *Dalam*: Susanto, A., L. Erningpraja, E.S. Sutarta, C. Utomo, I.Y. Harahap, A.E. Prasetyo, A.P. Dongoran, & A.F. Lubis. *Pertemuan teknis kelapa sawit 2005: Pemeliharaan kesehatan tanaman kelapa sawit melalui pengendalian terkini hama, penyakit dan gulma serta aplikasi pemupukan*. Pusat Penelitian Kelapa Sawit, Medan: xii + 200 hlm.

- Pavasonic, M. 2004. Digestive profile and capacity of the mud crab (*Scylla serrata*). Thesis submitted for the degree of Master of Applied Science at The Queensland University of Technology, Brisbane: ix + 78 hlm.
- Pracaya. 2008. *Pengendalian hama dan penyakit tanaman secara organik*. Kanisius, Yogyakarta: 308 hlm.
- Pracaya. 2009. Hama dan penyakit tanaman (edisi revisi). Penebar Swadaya, Depok: iv + 428 hlm.
- Prayogo, Y., W. Tengkano, & Marwoto. 2005. Prospek cendawan entomopatogen *Metarhizium anisopliae* untuk mengendalikan ulat grayak *Spodoptera litura* pada kedelai. *Jurnal Litbang Pertanian* **24**(1): 19--26.
- Prayogo, Y. 2006. Upaya mempertahankan keefektifan cendawan entomopatogen untuk mengendalikan hama tanaman pangan. *Jurnal Litbang Pertanian* **25**(2): 47--54.
- Puspawati, N.M. & I.N. Simpen. 2010. Optimasi deasetilasi khitin dari kulit udang dan cangkang kepiting limbah restoran *seafood* menjadi khitosan melalui variasi konsentrasi NaOH. *Jurnal Kimia* **4**(1): 79--90.
- Robinson-Lora, M.A. & R.A Brennan. 2009. The use of crab shell chitin for biological denitrification: *Batch* and column tests. *Bioresource Technology* **100**: 534--541.
- 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.
- Samuels, R.I. 1998. Systematics, morphology and physiology: A sensitive bioassay for destruxins, cyclodepsipeptides from the culture filtrates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil* **27**(2): 229--235.

- Shah, F. A., C. S. Wang, & T. R. Butt. 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* **251**(2): 259--266.
- Skropek, 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.
- Smith, D & A.H.S. Onions. 1994. The preservation and maintenance of living fungi. 2nd ed. Cab International, UK: vii + 122 hlm.
- Sumbali, G & R.S. Mehrotra. 2009. *Principle of microbiology*. The Tata McGraw-Hill Companies, Delhi: xxii + 924 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 & R. Weber. 2007. *Introduction to fungi*. 3rd ed. Cambridge University Press, New York: xix + 841 hlm.

## LAMPIRAN

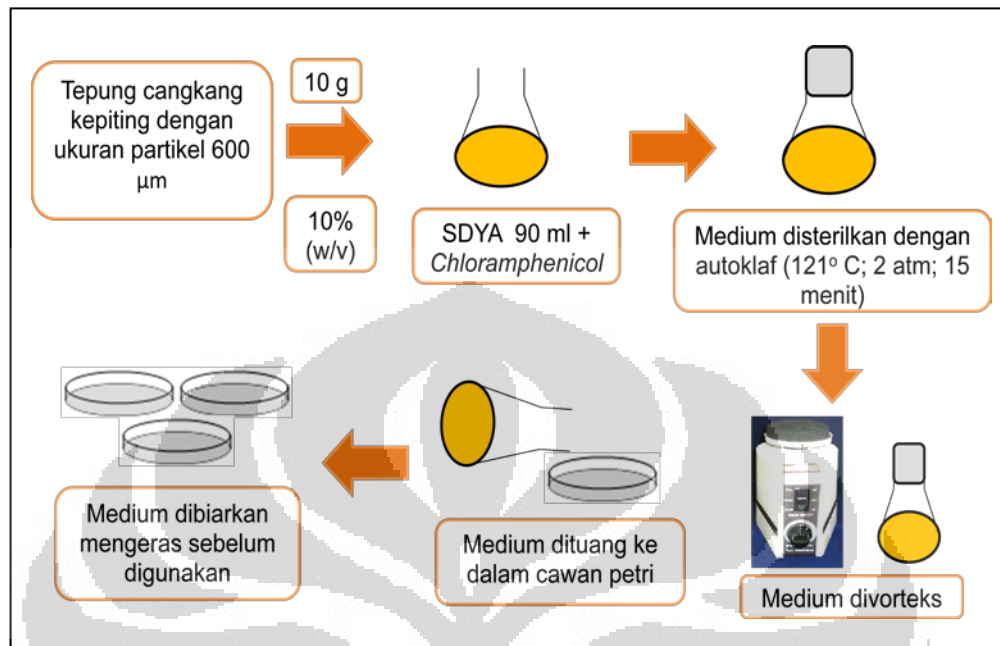
### Lampiran 1 Skema kerja penelitian





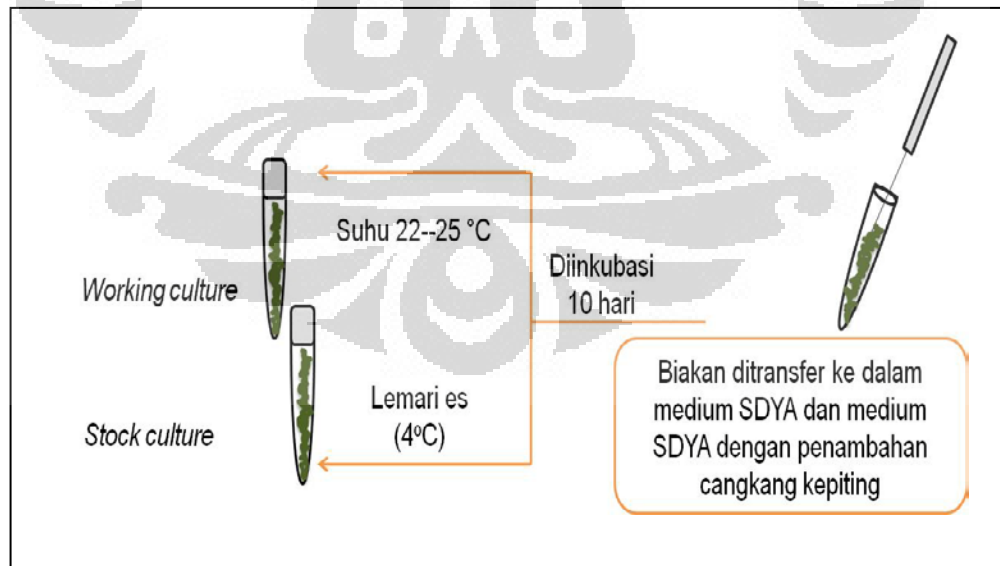
## Lampiran 2

### Pembuatan medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting



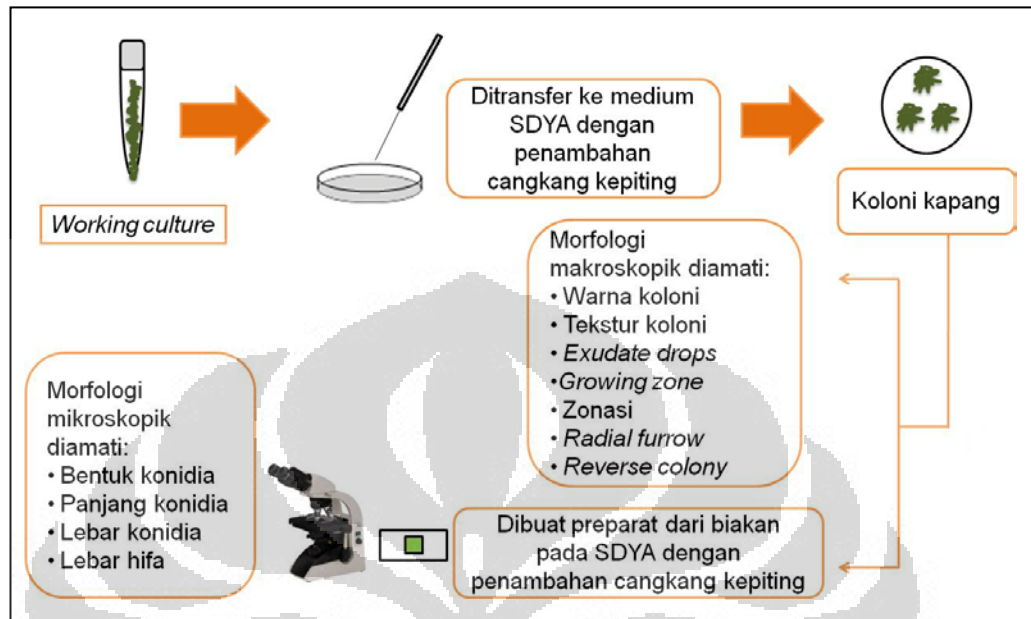
## Lampiran 3

### Pembuatan *stock culture* dan *working culture* kapang *M. majus* UICC 295



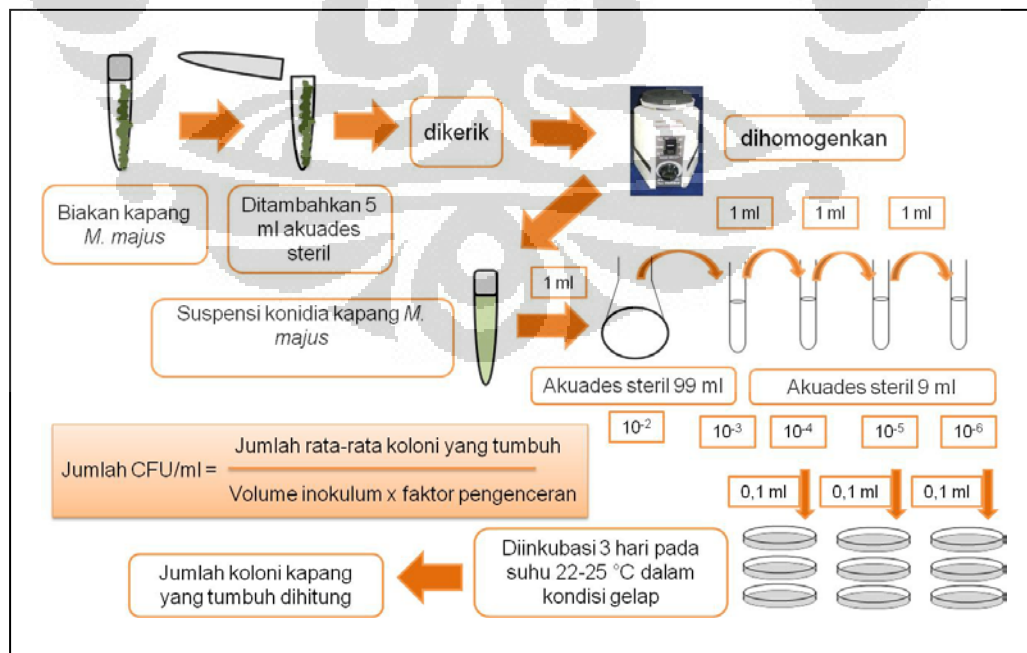
## Lampiran 4

### Pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295



## Lampiran 5

### Enumerasi konidia/hifa *M. majus* UICC 295



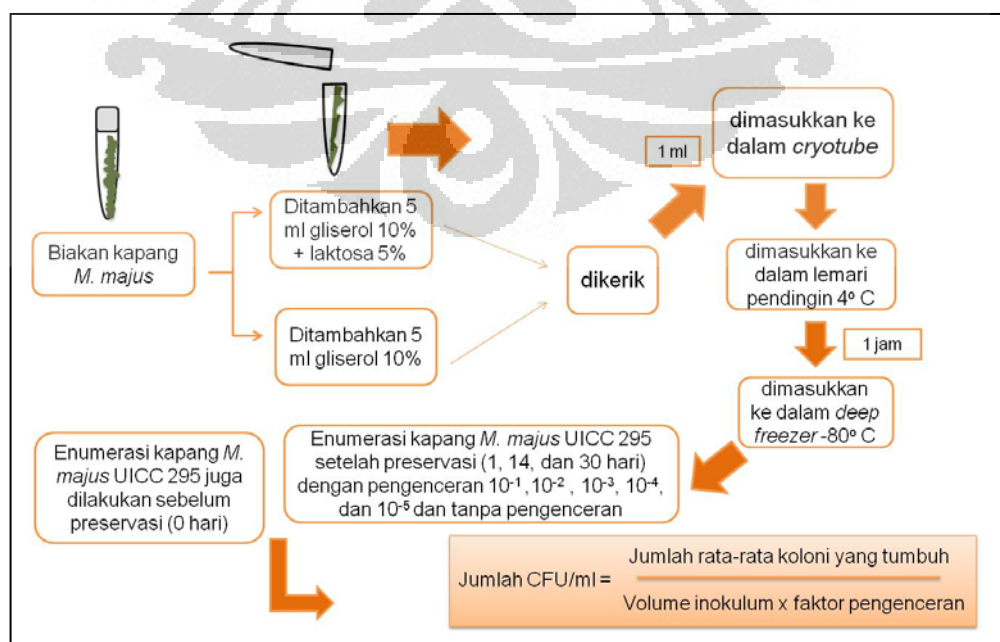
### Lampiran 6

Aplikasi kontak langsung konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada larva *O. rhinoceros*



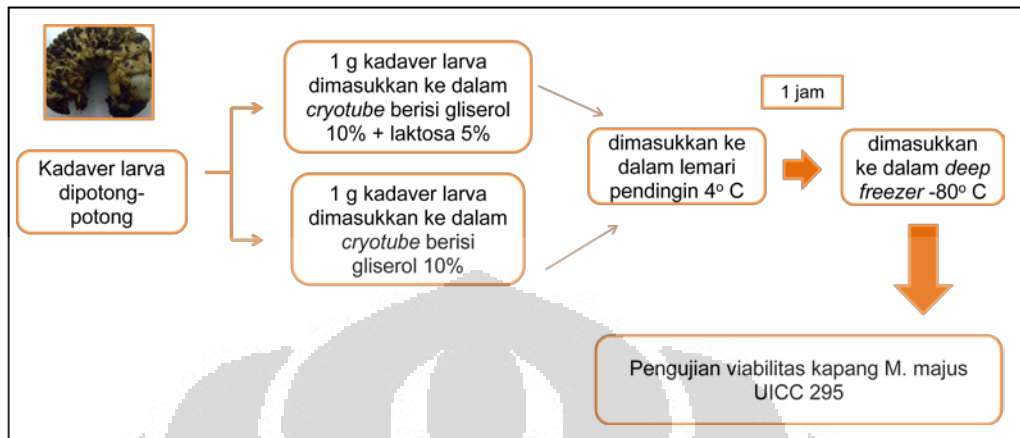
### Lampiran 7

Preservasi suspensi konidia/hifa *M. majus* UICC 295



## Lampiran 8

### Preservasi *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva



## Lampiran 9. 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 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 ( $\mu\text{m}$ )
	Panjang ( $\mu\text{m}$ )	Lebar ( $\mu\text{m}$ )	
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	23,76	6,04	2,34
SD	2,11	0,73	0,38

### Lampiran 11

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

Ulangan ke-	Konidia		Lebar hifa (µm)
	Panjang (µm)	Lebar (µm)	
1	25,11	6,63	3,59
2	21,85	6,19	3,50
3	23,27	5,69	3,09
4	23,00	4,95	4,74
5	24,21	5,54	3,71
6	21,93	6,59	4,60
7	23,22	6,46	3,71
8	24,89	6,63	3,96
9	24,84	6,52	4,89
10	23,74	5,89	3,90
11	24,40	6,51	4,34
12	25,56	5,36	3,96
13	23,51	5,76	4,95
14	23,50	6,26	3,25
15	21,16	6,44	2,68
16	23,16	6,00	3,22
17	24,74	6,36	2,95
18	24,21	6,06	3,32
19	24,48	6,24	2,95
20	24,73	5,52	4,14
Kisaran	21,16--25,56	4,95--6,63	2,68--4,95
Rata-rata	23,78	6,08	3,77
SD	1,17	0,48	0,68



Lampiran 12

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

Ulangan ke-	Konidia		Lebar hifa (µm)
	Panjang (µm)	Lebar (µm)	
1	25,73	6,70	5,98
2	27,25	7,59	4,53
3	27,32	6,90	3,50
4	26,79	6,41	4,11
5	27,66	5,98	5,76
6	26,45	6,17	4,55
7	26,11	7,04	3,25
8	26,68	7,33	4,11
9	25,15	6,84	3,25
10	25,16	5,60	3,71
11	27,33	6,44	6,59
12	25,44	6,96	4,24
13	24,08	7,48	4,53
14	27,11	5,98	5,06
15	27,00	5,24	5,08
16	24,10	7,27	4,36
17	25,03	7,04	3,68
18	27,45	5,20	4,60
19	27,20	5,98	5,82
20	24,55	6,59	5,08
Kisaran	24,08--27,66	5,20--7,61	3,25--6,59
Rata-rata	26,18	6,54	4,59
SD	1,18	0,71	0,93



Lampiran 13

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

Ulangan ke-	Konidia		Lebar hifa (µm)
	Panjang (µm)	Lebar (µm)	
1	25,66	6,96	2,80
2	21,20	6,11	2,91
3	25,16	5,98	2,80
4	23,55	5,98	3,79
5	25,40	6,14	2,95
6	25,05	6,20	3,09
7	25,26	6,76	3,25
8	22,01	5,62	3,25
9	24,45	6,05	2,80
10	22,43	6,69	3,25
11	23,45	5,56	2,76
12	22,92	5,60	3,25
13	25,00	5,54	2,60
14	23,53	5,52	2,30
15	23,29	5,36	2,30
16	23,87	6,41	3,09
17	23,65	6,36	2,48
18	23,78	5,90	2,80
19	24,11	6,56	3,79
20	25,15	6,71	2,95
Kisaran	21,20--25,66	5,36--6,96	2,30--3,79
Rata-rata	23,95	6,10	2,96
SD	1,22	0,48	0,41

Lampiran 14  
 Hasil uji anova panjang konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting

SDYA + Tepung Cangkang	Rata-rata	SD	P value
0% (Kontrol)	23,76	2,11	0,0005
5%	23,78	1,17	
10 %	26,18	1,18	
15 %	23,95	1,22	

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

Lampiran 15  
 Hasil uji tukey panjang konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting

Perlakuan	Perbedaan rata-rata	P value
Kontrol	5%	-0,0185
	10%	-2,4225
	15%	-0,1890
5%	Kontrol	0,0185
	10%	-2,4040
	15%	-0,1705
10%	Kontrol	2,4225
	5%	2,4040
	15%	2,2335
15%	Kontrol	0,1890
	5%	0,1705
	10%	-2,2335

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

Lampiran 16  
 Hasil uji anova lebar konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting

SDYA + Tepung Cangkang	Rata-rata	SD	P value
0% Kontrol	6,04	0,73	0,04
5%	6,08	0,48	
10 %	6,54	0,71	
15 %	6,10	0,48	

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

Lampiran 17  
 Hasil uji tukey lebar konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA  
 dengan penambahan tepung cangkang kepiting

Perlakuan		Perbedaan Rata-rata	P value
Kontrol	5%	-0,0395	0,997
	10%	-0,4965	0,058
	15%	-0,0600	0,990
5%	Kontrol	0,0395	0,997
	10%	-0,4570	0,093
	15%	-0,0205	1,000
10%	Kontrol	0,4965	0,058
	5%	0,4570	0,093
	15%	0,4365	0,118
15%	Kontrol	0,0600	0,990
	5%	0,0205	1,000
	10%	-0,4365	0,118

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

Lampiran 18  
 Hasil uji anova lebar hifa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA  
 dengan penambahan tepung cangkang kepiting

SDYA + Tepung Cangkang	Rata-rata	SD	P value
0% Kontrol	2,34	0,38	0,0005
5%	3,77	0,68	
10 %	4,59	0,93	
15 %	2,96	0,41	

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

Lampiran 19  
 Hasil uji tukey lebar hifa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA  
 dengan penambahan tepung cangkang kepiting

Perlakuan		Perbedaan Rata-rata	P value
Kontrol	5%	-1,430	0,000
	10%	-2,246	0,000
	15%	-0,618	0,016
5%	Kontrol	1,430	0,000
	10%	-0,817	0,001
	15%	0,812	0,001
10%	Kontrol	2,246	0,000
	5%	0,817	0,001
	15%	1,629	0,000
15%	Kontrol	0,618	0,016
	5%	-0,812	0,001
	10%	-1,629	0,000

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

Lampiran 20

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

Hari ke-	Jumlah larva yang mati				$\Sigma$ larva mati per hari	Kelembaban relatif (%)	Suhu ruang ( $^{\circ}$ C)
	Kelompok perlakuan			Kelompok kontrol			
	1	2	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	-	-	1	74	28,1
8	2	1	5	-	8	90	28,2
9	5	4	1	-	10	88	28
10	2	1	1	-	4	88	27,5
11	1	3	3	-	7	88	28,1
12	-	-	-	-	-	90	27,2
13	-	-	-	-	-	90	27,1
14	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-
Total	10	10	10	-	30		
	Rata-rata					86,86 $\pm$ 5,40	27,84 $\pm$ 0,39

Lampiran 21

Jumlah larva yang mati, kelembaban relatif, dan suhu ruang selama 15 hari pengamatan pada pengujian suspensi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v)

Hari ke-	Jumlah larva yang mati			Kelompok kontrol	$\Sigma$ larva mati per hari	Kelembaban relatif (%)	Suhu ruang ( $^{\circ}$ C)
	Kelompok perlakuan						
	1	2	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	1	1	-	-	2	88	28,0
10	2	5	-	-	7	88	27,5
11	3	2	4	-	9	88	28,1
12	4	2	4	-	10	90	27,2
13	-	-	2	-	2	90	27,1
14	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-
Total	10	10	10		30		
	Rata-rata					86,86 $\pm$ 5,40	27,84 $\pm$ 0,39

Lampiran 22  
Berat badan (g) larva yang masih hidup pada kelompok kontrol

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

Keterangan: KK = Kelompok Kontrol

Lampiran 23

Berat larva (g) yang masih hidup setelah aplikasi pada pengujian suspensi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 dalam SDYA pada suhu 28 °C dengan kondisi gelap

Kode Larva	Aplikasi dilakukan	penimbangan ke-				
		1	2	3	4	5
	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	hari ke-12	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±0,20	9,14±0,37	8,93±0,82	6,99±3,65	0,00	0,00
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±0,12	8,55±0,29	8,11±0,89	7,63±4,07	0,00	0,00
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±0,25	8,14±0,22	7,93±0,85	7,20±3,72	0,00	0,00

Keterangan: KP S = Kelompok larva yang diinokulasikan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA



Lampiran 24

Berat larva (g) yang masih hidup setelah aplikasi pada pengujian suspensi *M. majus* UICC 295 dalam SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) pada suhu 28 °C dengan kondisi gelap

Kode Larva	Aplikasi dilakukan	penimbangan ke-				
		1	2	3	4	5
	Hari ke-0	Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	hari ke-12	Hari ke-15
KP CK 1.1	11,99	10,89	8,85	7,19	mati	mati
KP CK 1.2	11,95	11,90	11,86	11,20	mati	mati
KP CK 1.3	11,92	11,90	10,40	9,53	mati	mati
KP CK 1.4	11,91	11,78	11,52	10,40	mati	mati
KP CK 1.5	11,87	11,64	11,58	11,01	9,40	mati
KP CK 1.6	11,86	11,98	12,23	10,86	mati	mati
KP CK 1.7	11,81	11,78	11,65	11,10	mati	mati
KP CK 1.8	11,80	11,97	11,68	10,19	mati	mati
KP CK 1.9	11,76	11,91	11,89	10,96	mati	mati
KP CK 1.10	11,74	11,94	12,12	11,36	mati	mati
Rata-rata	11,86±0,08	11,77±0,33	11,38±1,02	10,38±1,25	9,40±2,97	0,00
KP CK 2.1	11,72	11,60	10,96	10,53	mati	mati
KP CK 2.2	11,67	11,33	10,14	9,78	mati	mati
KP CK 2.3	11,66	11,41	9,88	7,86	mati	mati
KP CK 2.4	11,61	11,52	11,14	10,68	mati	mati
KP CK 2.5	11,58	11,48	11,16	8,90	mati	mati
KP CK 2.6	11,54	11,61	11,30	11,15	mati	mati
KP CK 2.7	11,54	11,68	11,77	10,98	mati	mati
KP CK 2.8	11,52	11,57	11,67	11,37	mati	mati
KP CK 2.9	11,51	11,60	11,51	10,97	mati	mati
KP CK 2.10	11,51	11,44	11,27	11,10	8,50	mati
Rata-rata	11,59±0,08	11,52±0,11	11,08±0,62	10,33±1,14	8,50±2,69	0,00
KP CK 3.1	11,51	11,62	11,79	9,90	mati	mati
KP CK 3.2	11,51	11,75	11,91	mati	mati	mati
KP CK 3.3	11,45	11,45	11,35	10,24	mati	mati
KP CK 3.4	11,44	11,50	11,77	9,85	mati	mati
KP CK 3.5	11,41	11,56	11,66	11,31	mati	mati
KP CK 3.6	11,40	11,38	11,44	mati	mati	mati
KP CK 3.7	11,39	11,37	11,32	9,33	mati	mati
KP CK 3.8	11,38	11,40	11,47	9,96	mati	mati
KP CK 3.9	11,36	11,04	9,67	7,92	mati	mati
KP CK 3.10	11,34	11,21	11,04	10,24	mati	mati
Rata-rata	11,42±0,06	11,43±0,20	11,34±0,64	8,75±4,24	0,00	0,00

Keterangan: KP CK = Kelompok larva yang diinokulasikan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v)

Lampiran 25  
 Hasil TPC *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi  
 menggunakan akuades (kontrol)

Hari ke-	Pengenceran	Pengulangan	Σ Koloni 6 hari		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 <sup>-3</sup>	1	>300	186				
		2	>300	156		1,67		
		3	>300	161		x 10 <sup>6</sup>		
	10 <sup>-4</sup>	1	56	44				
		2	55	45	6,20 x 10 <sup>6</sup>	4,40 x 10 <sup>6</sup>		
		3	75	44			6,63 x 10 <sup>6</sup>	3,45 x 10 <sup>6</sup>
	10 <sup>-5</sup>	1	10	4				
		2	5	5	7,00 x 10 <sup>6</sup>	4,30 x 10 <sup>6</sup>		
		3	6	4				
	10 <sup>-6</sup>	1	1	-				
		2	-	-	6,70 x 10 <sup>6</sup>			
		3	1	-				
1	Tanpa pengenceran	1	-	>300				
		2	-	>300				
		3	-	>300				
	10 <sup>-1</sup>	1	-	>300				
		2	-	>300				
		3	-	>300				
	10 <sup>-2</sup>	1	-	>300				
		2	-	>300				
		3	-	>300			3,7 x 10 <sup>6</sup>	1,56 x 10 <sup>6</sup>
	10 <sup>-3</sup>	1	>300	135				
		2	>300	112		1,29		
		3	>300	139		x 10 <sup>6</sup>		
10 <sup>-4</sup>	1	29	35					
	2	41	20	5,1 x 10 <sup>6</sup>	2,40 x 10 <sup>6</sup>			
	3	84	17					
10 <sup>-5</sup>	1	1	1					
	2	4	1	2,3 x 10 <sup>6</sup>	1,00 x 10 <sup>6</sup>			
	3	2	1					

Lampiran 25  
(Lanjutan)

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

Lampiran 26  
 Hasil TPC *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi  
 menggunakan *cryoprotectant* gliserol 10% (v/v)

Hari ke-	Pengenceran	Pengulangan	Σ Koloni 6 hari		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 <sup>-3</sup>	1	>300	186				
		2	>300	156		1,67		
		3	>300	161		x 10 <sup>6</sup>		
	10 <sup>-4</sup>	1	56	44				
		2	55	45	6,20 x 10 <sup>6</sup>	4,40 x 10 <sup>6</sup>		
		3	75	44			6,63 x 10 <sup>6</sup>	3,45 x 10 <sup>6</sup>
	10 <sup>-5</sup>	1	10	4				
		2	5	5	7,00 x 10 <sup>6</sup>	4,30 x 10 <sup>6</sup>		
		3	6	4				
	10 <sup>-6</sup>	1	1					
		2	-			6,70 x 10 <sup>6</sup>		
		3	1					
1	Tanpa pengenceran	1	-	>300				
		2	-	>300				
		3	-	>300				
	10 <sup>-1</sup>	1	-	>300				
		2	-	>300				
		3	-	>300				
	10 <sup>-2</sup>	1	-	>300				
		2	-	>300				
		3	-	>300				
10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3</sup>	1	160	121				
		2	164	134	1,52 x 10 <sup>6</sup>	1,26 x 10 <sup>6</sup>		
		3	131	124				
	10 <sup>-4</sup>	1	65	32				
		2	75	46	7,03 x 10 <sup>6</sup>	3,76 x 10 <sup>6</sup>	4,63 x 10 <sup>6</sup>	2,78 x 10 <sup>6</sup>
		3	71	35				
	10 <sup>-5</sup>	1	8	5				
		2	2	3	5,33 x 10 <sup>6</sup>	3,33 x 10 <sup>6</sup>		
		3	6	2				

Lampiran 26  
(Lanjutan)

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

Lampiran 27

Hasil TPC *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi menggunakan *cryoprotectant* gliserol 10% (v/v) dengan penambahan laktosa 5% (b/v)

Hari ke-	Pengenceran	Pengulangan	Σ Koloni 6 hari		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 <sup>-3</sup>	1	>300	186					
		2	>300	156		1,67			
		3	>300	161		x 10 <sup>6</sup>			
	10 <sup>-4</sup>	1	56	44					
		2	55	45	6,20 x	4,40			
		3	75	44	10 <sup>6</sup>	x 10 <sup>6</sup>			
	10 <sup>-5</sup>	1	10	9			6,63	3,45	
		2	5	5	7,00 x	4,30	x 10 <sup>6</sup>	x 10 <sup>6</sup>	
		3	6	8	10 <sup>6</sup>				
	10 <sup>-6</sup>	1	1	-					
		2	-	-	6,70 x				
		3	1	-	10 <sup>6</sup>				
	1	Tanpa pengenceran	1	-	>300				
			2	-	>300				
			3	-	>300				
10 <sup>-1</sup>		1	-	>300					
		2	-	>300					
		3	-	>300					
10 <sup>-2</sup>		1	-	>300					
		2	-	>300					
		3	-	>300			2,67	1,19	
10 <sup>-3</sup>		1	169	113			x 10 <sup>6</sup>	x 10 <sup>6</sup>	
		2	209	103	1,93 x	1,04			
		3	202	97	10 <sup>6</sup>	x 10 <sup>6</sup>			
10 <sup>-4</sup>		1	45	10					
		2	40	12	4,07 x	1,20			
		3	37	14	10 <sup>6</sup>	x 10 <sup>6</sup>			
10 <sup>-5</sup>	1	2	1						
	2	2	2	2,00 x	1,33				
	3	2	1	10 <sup>6</sup>	x 10 <sup>6</sup>				

Lampiran 27  
(Lanjutan)

		1	>300	>300				
	Tanpa pengenceran	2	>300	>300				
		3	>300	>300				
		1	>300	>300				
	10 <sup>-1</sup>	2	>300	>300				
		3	>300	>300				
		1	216	138				
	10 <sup>-2</sup>	2	199	157	2,12 x 10 <sup>5</sup>	1,42 x 10 <sup>5</sup>		
		3	221	132				
		1	32	27				
	10 <sup>-3</sup>	2	42	19	3,47 x 10 <sup>5</sup>	2,27 x 10 <sup>5</sup>		
		3	30	22			3,09 x 10 <sup>5</sup>	2,34 x 10 <sup>5</sup>
14		1	6	4				
	10 <sup>-4</sup>	2	2	4	3,67 x 10 <sup>5</sup>	3,33 x 10 <sup>5</sup>		
		3	3	2				
		1	-	-				
	10 <sup>-5</sup>	2	-	-				
		3	-	-				
		1	>300					
	Tanpa pengenceran	2	>300					
		3	>300					
		1	>300					
	10 <sup>-1</sup>	2	>300					
		3	>300					
		1	187	119				
	10 <sup>-2</sup>	2	204	127	1,94 x 10 <sup>5</sup>	1,19 x 10 <sup>5</sup>		
30		3	192	111			2,06 x 10 <sup>5</sup>	1,29 x 10 <sup>5</sup>
		1	14	10				
	10 <sup>-3</sup>	2	22	17	1,90 x 10 <sup>5</sup>	1,37 x 10 <sup>5</sup>		
		3	21	14				
		1	2	2				
	10 <sup>-4</sup>	2	3	1	2,33 x 10 <sup>5</sup>	1,33 x 10 <sup>5</sup>		
		3	2	1				
		1						
	10 <sup>-5</sup>	2						
		3						

Lampiran 28

Hasil TPC *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) setelah preservasi menggunakan akuades (kontrol)

Hari ke-	Pengenceran	Pengulangan	Σ Koloni 5 hari		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 <sup>-3</sup>	1	111	119	1,05 x 10 <sup>6</sup>	1,29 x 10 <sup>6</sup>	1,92 x 10 <sup>6</sup>	1,63 x 10 <sup>6</sup>
		2	103	116				
		3	101	151				
	10 <sup>-4</sup>	1	19	17	2,40 x 10 <sup>6</sup>	1,60 x 10 <sup>6</sup>		
		2	26	17				
		3	27	14				
	10 <sup>-5</sup>	1	1	3	2,30 x 10 <sup>6</sup>	2,00 x 10 <sup>6</sup>		
		2	2	1				
		3	4	2				
1	Tanpa pengenceran	1	-	>300	1,37 x 10 <sup>6</sup>	1,15 x 10 <sup>6</sup>		
		2	-	>300				
		3	-	>300				
	10 <sup>-1</sup>	1	-	>300				
		2	-	>300				
		3	-	>300				
	10 <sup>-2</sup>	1	-	>300				
		2	-	>300				
		3	-	>300				
	10 <sup>-3</sup>	1	123	108			1,20 x 10 <sup>6</sup>	1,08 x 10 <sup>6</sup>
		2	127	112				
		3	111	104				
10 <sup>-4</sup>	1	16	14	1,57 x 10 <sup>6</sup>	1,37 x 10 <sup>6</sup>			
	2	19	10					
	3	12	17					
10 <sup>-5</sup>	1	1	1	1,33 x 10 <sup>6</sup>	1,00 x 10 <sup>6</sup>			
	2	2	2					
	3	1	0					



Lampiran 28  
(Lanjutan)

14	Tanpa pengenceran	1					
		2					
		3					
	10 <sup>-1</sup>	1	>300	>300			
		2	>300	>300			
		3	>300	>300			
	10 <sup>-2</sup>	1	>300	>300			
		2	>300	>300			
		3	>300	>300			
10 <sup>-3</sup>	1	112	93				
	2	105	119	1,11 x 10 <sup>6</sup>	1,14 x 10 <sup>6</sup>		
	3	108	129				
10 <sup>-4</sup>	1	12	16			1,24 x 10 <sup>6</sup> 1,20 x 10 <sup>6</sup>	
	2	10	10	1,27 x 10 <sup>6</sup>	1,47 x 10 <sup>6</sup>		
	3	16	18				
10 <sup>-5</sup>	1	2	1				
	2	1	1	1,33 x 10 <sup>6</sup>	1,00 x 10 <sup>6</sup>		
	3	1	1				
30	Tanpa pengenceran	1	>300				
		2	>300				
		3	>300				
	10 <sup>-1</sup>	1	>300				
		2	>300				
		3	>300				
	10 <sup>-2</sup>	1	>300				
		2	>300				
		3	>300				
10 <sup>-3</sup>	1	119	117			1,17 x 10 <sup>6</sup> 1,03 x 10 <sup>6</sup>	
	2	101	99	1,09 x 10 <sup>6</sup>	1,06 x 10 <sup>6</sup>		
	3	107	101				
10 <sup>-4</sup>	1	20	10				
	2	11	10	1,43 x 10 <sup>6</sup>	1,03 x 10 <sup>6</sup>		
	3	12	11				
10 <sup>-5</sup>	1	1	1				
	2	1	1	1,00 x 10 <sup>6</sup>	1,00 x 10 <sup>6</sup>		
	3	1	1				

Lampiran 29

Hasil TPC *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) setelah preservasi menggunakan *cryoprotectant* gliserol 10% (v/v)

Hari ke-	Pengenceran	Pengulangan	Σ Koloni 5 hari		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 <sup>-3</sup>	1	111	119	1,05 x 10 <sup>6</sup>	1,29 x 10 <sup>6</sup>	1,92 x 10 <sup>6</sup>	1,63 x 10 <sup>6</sup>
		2	103	116				
		3	101	151				
	10 <sup>-4</sup>	1	19	17	2,40 x 10 <sup>6</sup>	1,60 x 10 <sup>6</sup>	1,92 x 10 <sup>6</sup>	1,63 x 10 <sup>6</sup>
		2	26	17				
		3	27	14				
	10 <sup>-5</sup>	1	1	3	2,30 x 10 <sup>6</sup>	2,00 x 10 <sup>6</sup>		
		2	2	1				
		3	4	2				
1	Tanpa pengenceran	1	16	50	1,67 x 10 <sup>2</sup>	6,57 x 10 <sup>2</sup>	1,50 x 10 <sup>2</sup>	6,62 x 10 <sup>2</sup>
		2	16	63				
		3	18	84				
	10 <sup>-1</sup>	1	1	5	1,33 x 10 <sup>2</sup>	6,67 x 10 <sup>2</sup>		
		2	1	5				
		3	2	10				
	10 <sup>-2</sup>	1						
		2						
		3						
10 <sup>-3</sup>	1							
	2							
	3							
10 <sup>-4</sup>	1							
	2							
	3							
10 <sup>-5</sup>	1							
	2							
	3							

Lampiran 29  
(Lanjutan)

		1	11	18		
	Tanpa pengenceran	2	28	18	$1,87 \times 10^2$	$1,77 \times 10^2$
		3	17	17		
		1	2	1		
	$10^{-1}$	2	1	1	$1,67 \times 10^2$	$1,33 \times 10^2$
		3	2	2		
14	$10^{-2}$	1				
		2				
		3				$1,77 \times 10^2$
		1				$1,03 \times 10^2$
	$10^{-3}$	2				
		3				
		1				
	$10^{-4}$	2				
		3				
		1				
	$10^{-5}$	2				
		3				
		1	3	4		
	Tanpa pengenceran	2	2	8	23,3	63,3
		3	2	7		
		1				
	$10^{-1}$	2				
		3				
		1				
	$10^{-2}$	2				
30		3				
		1				23,3
	$10^{-3}$	2				63,3
		3				
		1				
	$10^{-4}$	2				
		3				
		1				
	$10^{-5}$	2				
		3				

Lampiran 30  
 Hasil TPC *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan  
 penambahan tepung cangkang kepiting 10% (b/v) setelah preservasi  
 menggunakan *cryoprotectant* gliserol 10% (v/v) dengan penambahan  
 laktosa 5% (b/v)

Hari ke-	Pengenceran	Pengulangan	Σ Koloni 5 hari		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 <sup>-3</sup>	1	111	119					
		2	103	116	1,05 x 10 <sup>6</sup>	1,29 x 10 <sup>6</sup>			
		3	101	151					
	10 <sup>-4</sup>	1	19	17					
		2	26	17	2,40 x 10 <sup>6</sup>	1,60 x 10 <sup>6</sup>	1,92 x 10 <sup>6</sup>	1,63 x 10 <sup>6</sup>	
		3	27	14					
	10 <sup>-5</sup>	1	1	3					
		2	2	1	2,30 x 10 <sup>6</sup>	2,00 x 10 <sup>6</sup>			
		3	4	2					
	1	Tanpa pengenceran	1	25	33				
			2	32	21	2,73 x 10 <sup>2</sup>	2,67 x 10 <sup>2</sup>		
			3	25	26				
10 <sup>-1</sup>		1	5	2					
		2	6	1	4,67 x 10 <sup>2</sup>	1,67 x 10 <sup>2</sup>			
		3	3	2					
10 <sup>-2</sup>		1							
		2							
		3							
10 <sup>-3</sup>		1					3,70 x 10 <sup>2</sup>	2,17 x 10 <sup>2</sup>	
		2							
		3							
10 <sup>-4</sup>	1								
	2								
	3								
10 <sup>-5</sup>	1								
	2								
	3								

Lampiran 30  
(Lanjutan)

	1	17	18		
Tanpa pengenceran	2	30	22	2,40 x 10 <sup>2</sup>	1,73 x 10 <sup>2</sup>
	3	25	12		
	1	2	2		
10 <sup>-1</sup>	2	1	1	1,33 x 10 <sup>2</sup>	1,67 x 10 <sup>2</sup>
	3	1	2		
	1				
10 <sup>-2</sup>	2				
	3				
	1				
10 <sup>-3</sup>	2				
	3				
	1				
10 <sup>-4</sup>	2			1,86 x 10 <sup>2</sup>	1,70 x 10 <sup>2</sup>
	3				
	1				
10 <sup>-5</sup>	2				
	3				
	1	9	2		
Tanpa pengenceran	2	11	3	103	26,7
	3	11	3		
	1				
10 <sup>-1</sup>	2				
	3				
	1				
10 <sup>-2</sup>	2				
	3				
30	1			103	26,7
	2				
10 <sup>-3</sup>	3				
	1				
	2				
10 <sup>-4</sup>	3				
	1				
	2				
10 <sup>-5</sup>	3				