



UNIVERSITAS INDONESIA

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

SKRIPSI

**DHIAN CHITRA AYU F.S.
0806453131**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH PENAMBAHAN TEPUNG JANGKRIK 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

**DHIAN CHITRA AYU F.S.
0806453131**

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

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Dhian Chitra Ayu F. S.
NPM : 0806453131
Tanda tangan : 
Tanggal : 26 Juni 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Dhian Chitra Ayu F. S.
NPM : 0806453131
Program Studi : S1 Biologi
Judul Skripsi : Pengaruh Penambahan Tepung Jangkrik pada
Medium Pertumbuhan terhadap Kemampuan
Metarhizium majus UICC 295 Menginfeksi Larva
Oryctes rhinoceros Linnaeus

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Ariyanti Oetari, Ph.D

(.....
Ariyanti Oetari)

Penguji I : Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D.

(.....
Wellyzar Sjamsuridzal)

Penguji II : Dr. Adi Basukriadi, M.Sc

(.....
Adi Basukriadi)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 26 Juni 2012

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala anugrah, 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, dan Dr. Abinawanto selaku Penasihat Akademik atas perhatian dan dukungannya.
5. Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. dan Drs. Iman Santoso, M.Phil, yang telah memberikan saran-saran dan bimbingan kepada penulis.
6. Seluruh staf pengajar Departemen Biologi FMIPA UI atas bekal ilmu yang penulis terima.
7. Ahmad Supriyadi S.Pi, Asri Martini S.Si, Pak Ana, Pak Ono, bu A'am, dan seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA UI atas semua bantuan yang diberikan.
8. Kedua orang tuaku tersayang, Ramadhin Syarif dan Yanuk Isnarty atas do'a, kasih sayang, pengertian, pengorbanan, serta dukungan moril dan materil yang selalu diberikan hingga skripsi ini dapat diselesaikan.
9. Kakak-kakakku tersayang, Dhion Toradan dan Dhien Yanuar atas do'a, dukungan, semangat, dan kebersamaan yang selalu menjadi motivasi bagi penulis.
10. Sahabatku tersayang, Cinthya Karlina Wijaya yang selalu menjadi sahabat baik serta memberikan semangat, perhatian, dan dukungan kepada penulis selama penyusunan skripsi.

11. Teman-teman tersayang, CANNON (Oktarina Sumandari, Nur Amalina Khodijah, dan Grand Septia Yama) dan Putri Pratiwi Setyaningsih selaku teman seperjuangan yang selalu bersama dalam suka maupun duka selama masa penelitian dan penulisan skripsi.
12. Tante Nita, Om Alexander, Evelyne, dan Jovi atas bantuan, dukungan, dan semangat yang telah diberikan selama ini.
13. Bapak Endi dan Bapak Sangsang yang telah membantu menyediakan larva yang digunakan dalam penelitian.
14. Bapak Yaya dan keluarga fotokopi Cenat-cenut yang telah banyak membantu penulis selama penyusunan skripsi.
15. Teman-teman di Laboratorium Mikrobiologi, DIVAS (Dhila, 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, dan NADIN (Hanna dan Muhabidin) yang telah banyak membantu dan memberi masukan dalam menyelesaikan penelitian.
16. Teman-teman Biologi khususnya BIOSENTRIS (*Biology Two Thousand and Eight Truly Inspiring*) atas pertemanan yang tak akan terlupakan.
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.

Penulis
2012

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

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

Nama : Dhian Chitra Ayu F.S.
NPM : 0806453131
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 Jangkrik 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



(Dhian Chitra Ayu F.S.)

ABSTRAK

Nama : Dhian Chitra Ayu F. S.
Program Studi : Biologi
Judul : Pengaruh Penambahan Tepung Jangkrik pada Medium Pertumbuhan terhadap Kemampuan *Metarhizium majus* UICC 295 Menginfeksi Larva *Oryctes rhinoceros* Linnaeus.

Metarhizium majus UICC 295 adalah kapang entomopatogen. Penelitian bertujuan mengetahui pengaruh penambahan tepung jangkrik 10% (b/v) pada medium pertumbuhan *M. majus* UICC 295 terhadap kemampuan menginfeksi larva *O. rhinoceros* serta mengetahui pengaruh preservasi pada suhu -80° C menggunakan protektan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan trehalosa 5% (b/v) terhadap viabilitas *M. majus* UICC 295. Konidia/hifa dari *Saboraud Dextrose with Yeast Extract Agar* (SDYA) dengan penambahan tepung jangkrik 10% (b/v) mampu membunuh larva 6,6--100% dalam 8--11 hari. Konidia/hifa yang dipreservasi selama 30 hari pada suhu -80° C menggunakan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) + trehalosa 5% (b/v) mengalami penurunan viabilitas. Konidia/hifa yang dipreservasi bersama kadaver larva selama 30 hari pada suhu -80° C menggunakan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan trehalosa 5% (b/v) mampu dipertahankan viabilitasnya.

Kata kunci: entomopatogen, *freezing*, *Metarhizium majus*, *Oryctes rhinoceros*, preservasi, tepung jangkrik, trehalosa, viabilitas.

xv + 80 halaman; 16 gambar; 5 tabel; 20 lampiran
Daftar Referensi: (1976--2011)

ABSTRACT

Name : Dhian Chitra Ayu F. S.
Study Program : Biology
Title : The Effect of Cricket Powder in Growth Medium on the Pathogenicity of *Metarhizium majus* UICC 295 to Infect *Oryctes rhinoceros* Linnaeus Larvae.

Metarhizium majus UICC 295 is an entomopathogenic fungus. This research aimed to investigate the effect of 10% (w/v) cricket powder in growth medium on the pathogenicity of *M. majus* UICC 295 to infect *O. rhinoceros* larvae and to investigate the effect of freezing in -80°C using 10% (v/v) glycerol and 10% (v/v) glycerol with 5% (w/v) trehalose on its viability. The conidia/hyphae from *Saboraud Dextrose Agar with Yeast Extract* (SDAY) with 10% (w/v) cricket powder was able to kill larvae 6.6%--100% in 8--11 days. Viability of conidia/hyphae after being preserved for 30 days in -80°C with 10% (v/v) glycerol and 10% (v/v) glycerol with 5% (w/v) trehalose was decreased. The conidia/hyphae on cadaver was still viable after being preserved at -80°C with 10% (v/v) glycerol and 10% (v/v) glycerol with 5% (w/v) trehalose.

Keyword: cricket powder, entomopathogen, freezing, *Metarhizium majus*, *Oryctes rhinoceros*, preservation, trehalose, viability.

xv + 80 pages; 16 pictures; 5 tables; 20 attachments
Bibliography: (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
1. PENDAHULUAN.....	1
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Kapang Entomopatogen.....	6
2.2 Kapang <i>Metarhizium majus</i>	7
2.3 <i>Oryctes rhinoceros</i> Linnaeus (Kumbang Badak).....	10
2.4 Medium Pertumbuhan.....	11
2.5 Tepung Jangkrik.....	13
2.6 Aplikasi Konidia Kapang pada Serangga.....	15
2.6 Preservasi Kapang.....	16
3. METODOLOGI PENELITIAN.....	18
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	18
3.2 Alat dan Bahan.....	18
3.2.1 Alat.....	18
3.2.2 Bahan.....	19
3.2.2.1 Mikroorganisme.....	19
3.2.2.2 Larva <i>Oryctes rhinoceros</i>	19
3.2.2.3 Jangkrik.....	19
3.2.2.4 Medium.....	19
3.2.2.5 Bahan Kimia.....	19
3.2.2.6 Bahan Habis Pakai.....	20
3.3 Cara Kerja.....	20
3.3.1 Pembuatan Medium SDYA.....	20
3.3.2 Pembuatan Tepung Jangkrik.....	20
3.3.3 Pemeliharaan isolat <i>M. majus</i> UICC 295.....	21
3.3.4 Pengamatan Morfologi Kapang.....	22
3.3.5 Enumerasi Konidia/Hifa Kapang.....	22
3.3.6 Persiapan Larva untuk Pengujian.....	24
3.3.7 Pembuatan Larutan Triton X-100 0,05% Steril.....	24
3.3.8 Pengujian Konidia/Hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada Larva <i>O. rhinoceros</i> dengan Metode Kontak Langsung.....	24

3.3.9	Preservasi Kapang <i>M. majus</i> UICC 295 dalam Larutan Gliserol 10% dan Gliserol 10% dengan Penambahan Trehalosa 5% pada Suhu -80° C.....	25
3.3.10	Penghitungan viabilitas <i>M. majus</i> UICC 295 dan <i>M. majus</i> UICC 295 pada kadaver setelah preservasi.....	27
3.3.11	Pengolahan dan Analisis Data.....	27
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
4.1	Pengaruh penambahan tepung jangkrik pada medium pertumbuhan....	29
4.2	Pengujian Suspensi Konidia/Hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada Larva <i>O. rhinoceros</i>	38
4.3	Preservasi kapang.....	44
5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	51
	DAFTAR REFERENSI.....	52
	LAMPIRAN.....	58



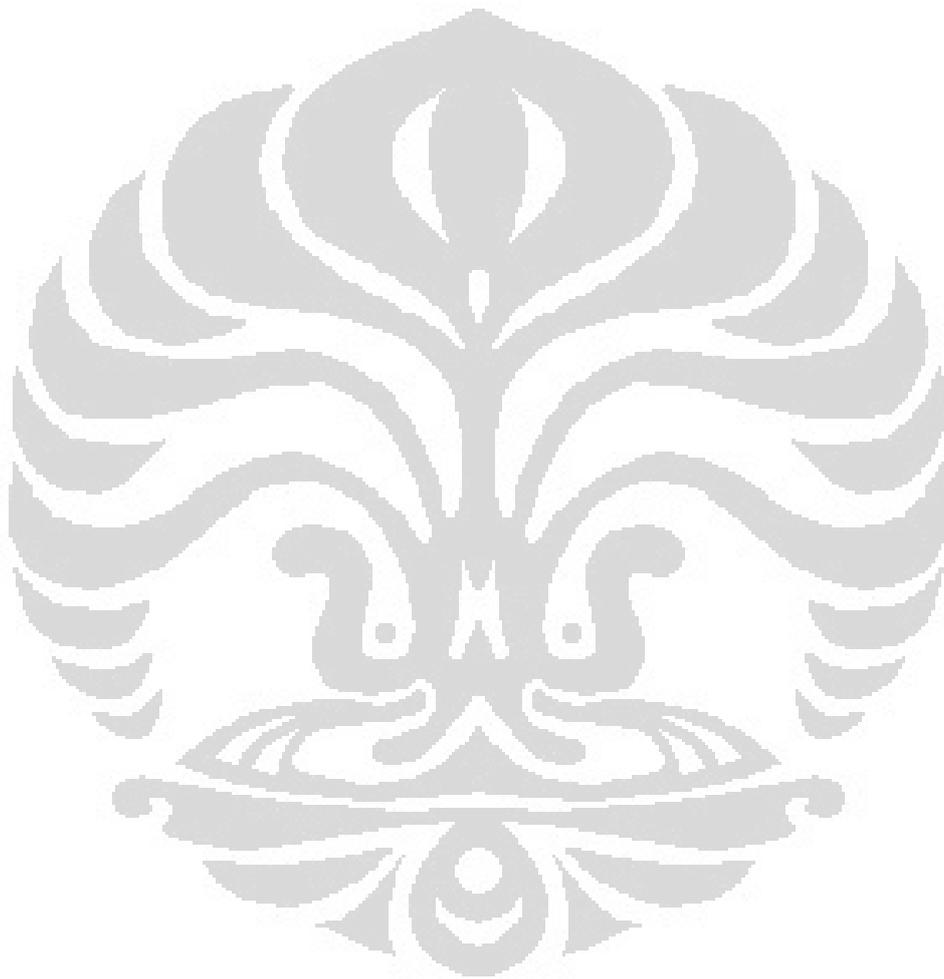
DAFTAR TABEL

Tabel 4.1.1	Hasil pengamatan morfologi <i>M. majus</i> UICC 295 secara makroskopik koloni umur 18 hari dalam medium SDYA dan koloni umur 10 hari dalam medium SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) pada suhu 28° C dengan kondisi gelap.....	29
Tabel 4.1.2	Diameter koloni rata-rata <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) umur 10 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap.....	31
Tabel 4.1.3	Ukuran hifa dan konidia <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dan pada medium SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) umur 10 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap	33
Tabel 4.2.2	Persentase jumlah larva yang mati selama 15 hari pengamatan pada pengujian suspensi konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.....	39
Tabel 4.3.7	Hasil perhitungan jumlah konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 setelah preservasi.....	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.2.1	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i>	8
Gambar 2.2.2	<i>Cordyceps brittlebankisoides</i>	9
Gambar 2.3	Siklus hidup <i>Oryctes rhinoceros</i>	11
Gambar 4.1.1	Tepung jangkrik.....	29
Gambar 4.1.2	Grafik persentase diameter koloni rata-rata <i>M. majus</i> UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) dibandingkan dengan kontrol umur 10 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap.....	30
Gambar 4.1.3	Hasil pengamatan morfologi secara makroskopik <i>M. majus</i> UICC 295 pada SDYA umur 18 hari dan SDYA dengan tepung jangkrik 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) umur 10 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap.....	31
Gambar 4.1.4	Grafik ukuran hifa dan konidia <i>M. majus</i> UICC 295 pada SDYA umur dan pada SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) umur 10 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap.....	34
Gambar 4.1.5	Hasil pengamatan morfologi secara mikroskopik <i>M. majus</i> UICC 295 pada SDYA umur 21 hari dan SDYA dengan tepung jangkrik 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) umur 18 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap	33
Gambar 4.2.1	Grafik persentase jumlah kematian larva <i>O. rhinoceros</i> setiap hari selama 15 hari pengamatan setelah pengujian suspensi konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 dari SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 10%.....	40
Gambar 4.2.2	Grafik berat larva rata-rata yang masih setelah aplikasi pada pengujian suspensi konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 10% (b/v).....	41
Gambar 4.2.3	Pertumbuhan <i>M. majus</i> UICC 295 dari SDYA dengan tepung jangkrik 10% (b/v) pada larva <i>O. rhinoceros</i> mati..	42
Gambar 4.3.1	Grafik persentase jumlah konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi menggunakan akuades, gliserol 10% (v/v), dan gliserol 10% (v/v) dengan trehalosa 5% (b/v)	45
Gambar 4.3.2	Grafik persentase jumlah konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dengan tepung jangkrik 10% (b/v) setelah preservasi menggunakan akuades, gliserol 10% (v/v), dan gliserol 10% (v/v) + trehalosa 5% (b/v).....	46
Gambar 4.3.3	Kontaminan pada koloni <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi satu hari dengan kadaver larva.....	48

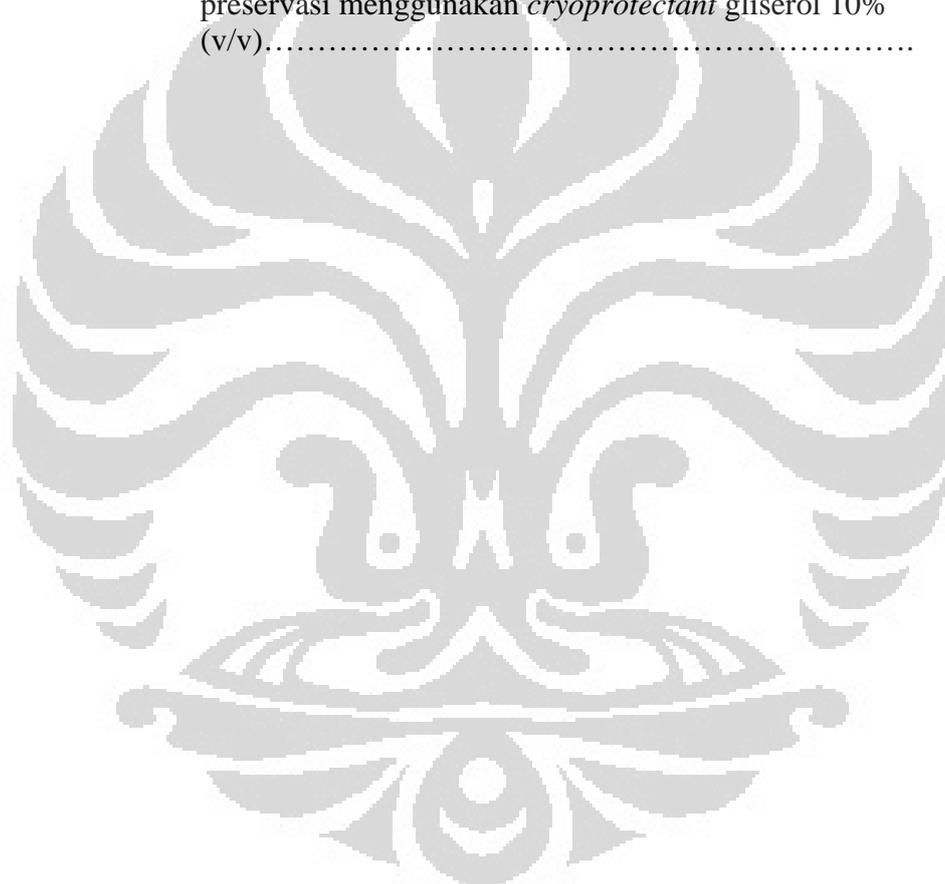
Gambar 4.3.4	Kontaminan pada koloni <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dengan tepung jangkrik 10% setelah preservasi satu hari dengan kadaver larva.....	49
Gambar 4.3.5	Konidia <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dengan tepung jangkrik 10% pada kadaver larva.....	50



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Skema kerja penelitian.....	58
Lampiran 2	Skema pembuatan tepung jangkrik.....	59
Lampiran 3	Cara kerja aplikasi kontak langsung kapang <i>M. majus</i> UICC 295 terhadap larva <i>Oryctes rhinoceros</i>	59
Lampiran 4	Cara kerja preservasi kapang <i>M. majus</i> UICC 295 pada gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan trehalosa 5% (b/v) terhadap larva <i>Oryctes rhinoceros</i> ..	60
Lampiran 5	Cara kerja preservasi kapang <i>M. majus</i> UICC 295 pada cadaver larva dengan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan trehalosa 5% (b/v) terhadap larva <i>Oryctes rhinoceros</i>	60
Lampiran 6	Standar warna Faber Castell.....	61
Lampiran 7	Hasil pengukuran konidia dan hifa <i>M. majus</i> UICC 295 umur 21 hari dalam medium SDYA tanpa penambahan substrat kitin pada suhu 28° C.....	62
Lampiran 8	Hasil pengamatan morfologi <i>M. majus</i> UICC 295 secara mikroskopik koloni umur 14 hari dalam medium SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 5% (b/v) pada suhu 28° C dengan kondisi gelap.....	63
Lampiran 9	Hasil pengamatan morfologi <i>M. majus</i> UICC 295 secara mikroskopik koloni umur 10 hari dalam medium SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 10% (b/v) pada suhu 28° C dengan kondisi gelap.....	64
Lampiran 10	Hasil pengamatan morfologi <i>M. majus</i> UICC 295 secara mikroskopik koloni umur 10 hari dalam medium SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 15% (b/v) pada suhu 28° C dengan kondisi gelap.....	65
Lampiran 11	Hasil analisa ANOVA dan Tukey panjang konidia, lebar konidia dan lebar hifa kapang <i>M. majus</i> UICC 295 pada SDYA dengan tepung jangkrik 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v).....	66
Lampiran 12	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 kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.....	67
Lampiran 13	Berat badan larva (g) yang masih hidup pada kelompok kontrol.....	68
Lampiran 14	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...	69
Lampiran 15	Berat larva yang masih hidup setelah aplikasi pada pengujian suspensi konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 dalam SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 10% pada suhu 28 °C kondisi gelap (g).....	70
Lampiran 16	Hasil TPC <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi menggunakan akuades (kontrol).....	71

Lampiran 17	Hasil TPC <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi menggunakan <i>cryoprotectant</i> gliserol 10% (v/v).....	73
Lampiran 18	Hasil TPC <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi menggunakan <i>cryoprotectant</i> gliserol 10% (v/v) dengan penambahan trehalosa 5% (b/v).....	75
Lampiran 19	Hasil TPC <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 10% (b/v) setelah preservasi menggunakan akuades (kontrol).....	76
Lampiran 20	Hasil TPC <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 10% (b/v) setelah preservasi menggunakan <i>cryoprotectant</i> gliserol 10% (v/v).....	78



BAB 1

PENDAHULUAN

Kapang entomopatogen adalah kapang yang dapat menginfeksi dan menyebabkan kematian pada serangga. Kapang entomopatogen umumnya memiliki enzim-enzim seperti kitinase dan protease yang mampu mencerna bahan yang terkandung pada kutikula serangga (Bidochka & Small 2005: 29--30).

Kapang *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin merupakan salah satu kapang entomopatogen yang digunakan untuk pengendalian serangga hama (Prayogo dkk. 2005: 20). *Metarhizium anisopliae* terbagi menjadi dua varian berdasarkan ukuran konidia yaitu varian *anisopliae* dan varian *majus*. Kapang *M. anisopliae* var. *majus* merupakan anamorf dari *Cordyceps brittlebankisoides* (Liu dkk. 2001: 180). *Metarhizium anisopliae* varian *majus* saat ini dikenal sebagai *Metarhizium majus* (Johnst.) Bisch., Rehner & Humber (Bischoff dkk. 2009: 512 & 520). Salah satu jenis serangga yang dapat terinfeksi oleh *Metarhizium majus* adalah *Oryctes rhinoceros* Linnaeus. *Oryctes rhinoceros* dikenal sebagai kumbang badak dan merupakan hama yang banyak menyerang perkebunan kelapa dan kelapa sawit di Indonesia (Pracaya 2008: 115). Hama tersebut dapat mengakibatkan penurunan produksi buah kelapa sawit hingga 69% dan mematikan tanaman muda hingga 25% (Siregar 2010: 4).

Hama *O. rhinoceros* menyebabkan kerusakan daun kelapa yang akan terlihat setelah pelepah daun terbuka. Selain itu, kumbang dewasa akan menggerek ke dalam batang sehingga menyebabkan kerusakan pada batang (Departemen Pertanian 1993: 4). Serangan kumbang badak tersebut dapat menghambat pertumbuhan dan jika sampai menyerang titik tumbuh dapat menyebabkan kematian tanaman (Siregar 2010: 3).

Kapang *M. anisopliae* mampu membunuh larva *O. rhinoceros* dengan aplikasi kontak langsung. Aplikasi kontak langsung dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu menyemprotkan suspensi konidia kapang ke permukaan tubuh serangga dan mencelupkan tubuh serangga ke dalam suspensi konidia kapang (Foster dkk. 2010: 304). Metode kontak langsung bertujuan agar konidia kapang dapat langsung mengenai tubuh serangga. Konidia dapat dengan cepat

bergerminasi dan berpenetrasi menembus kutikula serangga, sehingga proses infeksi dapat dimulai dengan cepat (Desyanti dkk. 2007: 69 & 74--75).

Kapang entomopatogen menginfeksi inang melalui 2 tahap yaitu penempelan (*adhesion*) dan germinasi. Germinasi konidia pada kutikula inang memicu pembentukan *germ tube* pada rongga *hemocoel* serangga. Kapang tersebut menginfeksi serangga dengan memproduksi toksin neuromuskular berupa destruksin yang dapat menyebabkan kematian bagi serangga (Hirsch & Grund 2010: 11).

Kemampuan kapang entomopatogen dalam menginfeksi inangnya dipengaruhi oleh kandungan nutrisi yang terdapat pada medium (Shah dkk. 2005: 264). Namun demikian, kemampuan menginfeksi tersebut dapat menurun jika kapang entomopatogen terus menerus ditumbuhkan pada medium dengan kandungan nutrisi yang sangat berbeda dengan inangnya (Magan 2001: 239). Oleh karena itu, penambahan sumber karbon dan nitrogen pada medium pertumbuhan dapat dilakukan untuk mempertahankan kemampuan kapang entomopatogen dalam menginfeksi inang. Penambahan sumber karbon, seperti kitin pada medium pertumbuhan dapat membantu menjaga kemampuan infeksi kapang entomopatogen karena dapat mengaktifkan enzim kitinase yang penting dalam proses penetrasi ke kutikula inang (Kang 1998: 280). Selain itu, penambahan sumber protein pada medium juga dapat dilakukan (Herlinda dkk. 2006:76). Kadar protein yang tinggi pada medium dapat mempercepat germinasi konidia kapang entomopatogen. Semakin cepat germinasi konidia kapang, maka akan semakin cepat kapang menginfeksi inangnya (Shah dkk. 2005: 264).

Medium pertumbuhan kapang entomopatogen dapat diberi penambahan substrat yang mengandung protein dan kitin seperti serangga. Jangkrik (*Gryllidae: Orthoptera*) merupakan serangga yang mengandung protein dan kitin. Jangkrik mengandung protein sebesar 58,3% dan kitin sebesar 8,7% dalam 100 gram berat kering (Wang dkk. 2005: 670). Herlinda dkk. (2006:70 & 73) melakukan penelitian penambahan tepung jangkrik pada medium pertumbuhan *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Penambahan tepung jangkrik sebanyak 0,5% (b/v) pada medium *Saboraud Dextrose Broth* (SDB) dapat meningkatkan kemampuan kapang entomopatogen *B. bassiana* dalam menginfeksi larva *Plutella*

xylostella (Linn). Hal tersebut ditandai dengan peningkatan kematian larva *P. xylostella* yang terinfeksi *B. Bassiana* sebesar 18,36% setelah penambahan tepung jangkrik pada medium pertumbuhan. Tepung jangkrik mengandung kitin dan protein yang dapat merangsang pembentukan kitinase dan protease yang penting dalam proses degradasi kutikula serangga, sehingga kapang entomopatogen dapat melakukan penetrasi ke dalam tubuh serangga.

Kapang-kapang spesifik yang memiliki potensi seperti kapang entomopatogen perlu disimpan untuk menjaga kemampuan kapang tersebut dalam menginfeksi inangnya. Preservasi adalah suatu upaya untuk menjaga viabilitas, kestabilan morfologi, fisiologi, dan genetik kapang. Beberapa metode preservasi telah berhasil dikembangkan untuk menyimpan kapang-kapang yang spesifik seperti kapang patogen. Preservasi dilakukan dengan cara menyimpan kapang dalam keadaan dorman atau memperlambat proses pertumbuhan kapang (Nakasone dkk. 2006: 39 & 40).

Berdasarkan lama penyimpanan preservasi dibagi menjadi dua, yaitu preservasi jangka pendek dan preservasi jangka panjang. Salah satu contoh preservasi jangka pendek adalah *continous growth*, yaitu menumbuhkan kapang pada medium agar dan menyimpannya di suhu 5--20° C dalam waktu satu tahun. Salah satu metode preservasi kapang jangka panjang adalah *freezing*, yaitu menyimpan biakan kapang dalam *freezer* dengan suhu -80° C. Metode *freezing* dapat digunakan untuk menyimpan kapang dalam waktu satu hingga lima tahun. Penambahan protektan umum dilakukan pada preservasi dengan metode *freezing*. Pemberian protektan bertujuan untuk menjaga sel hidup dari dehidrasi dan kerusakan selama proses *freezing*. Salah satu contoh protektan adalah gliserol. Gliserol merupakan protektan yang dapat mencegah kerusakan akibat kristal es secara ekstraseluler dan intraseluler (Nakasone dkk. 2006: 37 & 41). Selain gliserol, gula sakarida dapat digunakan sebagai protektan. Trehalosa merupakan disakarida yang dapat menjaga struktur membran sel dengan cara mengganti fungsi air di dalam membran sehingga dapat ditambahkan sebagai protektan (Bhandal dkk. 1985: 430).

Kapang dapat dipreservasi bersama substrat atau inangnya. Contoh kapang yang disimpan bersama inang atau substratnya adalah *Pyrenochaeta* De

Not. dan *Thielaviopsis* Went yang disimpan bersama akar tanaman yang merupakan inangnya (Nakasone dkk. 2006: 39 & 40).

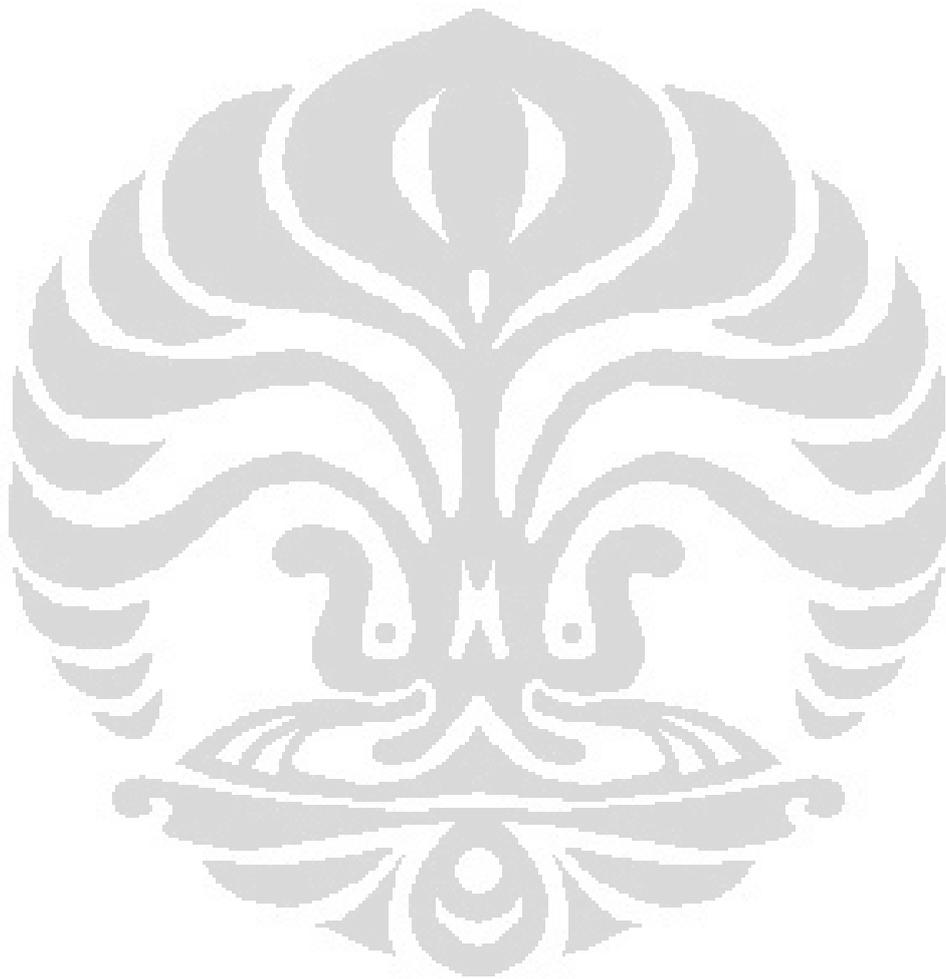
Pengujian pertumbuhan kapang *M. majus* UICC 295 umur 27 hari pada medium *Saboraud Dextrose with Yeast Extract Agar* (SDYA) dengan dengan penambahan tepung jangkrik 10% (b/v) telah dilakukan pada saat pra-penelitian. Hasil yang diperoleh dari pengujian tersebut adalah terjadi peningkatan panjang hifa sebanyak 9,1%, lebar konidia 1,9%, dan panjang konidia 9,5% (b/v) dibandingkan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA sebagai kontrol.

Kapang *M. majus* UICC 295 dapat membunuh larva *O. rhinoceros* 100% dalam waktu 14 hari setelah aplikasi (Rosadi 2011: 26 dan 33). Namun demikian, belum diketahui pengaruh penambahan tepung jangkrik terhadap kemampuan *M. majus* UICC 295 dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros*. Selain itu, penyimpanan kapang *M. majus* UICC 295 dan potongan larva *O. rhinoceros* yang mati karena terinfeksi menggunakan gliserol 10% (v/v) yang ditambahkan trehalosa 5% (b/v) pada suhu -80° C belum dilakukan. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh penambahan tepung jangkrik terhadap kemampuan *M. majus* UICC 295 dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros* dan pengaruh preservasi menggunakan gliserol 10% (v/v) yang ditambahkan trehalosa 5% (b/v) pada suhu -80° C dalam menjaga viabilitas konidia *Metarhizium majus* UICC 295.

Hipotesis penelitian adalah tepung jangkrik dapat digunakan sebagai tambahan dalam medium pertumbuhan yang mampu meningkatkan kemampuan kapang *M. majus* UICC 295 dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros*. Penyimpanan kapang *M. majus* UICC 295 selama satu bulan dengan metode *freezing* pada suhu -80° C menggunakan gliserol 10% (v/v) yang ditambahkan trehalosa 5% (b/v) dapat menjaga viabilitas kapang.

Hasil yang diharapkan adalah diperoleh medium pertumbuhan yang mampu menjaga viabilitas dan kemampuan kapang *Metarhizium majus* sebagai bioinsektisida bagi *Oryctes rhinoceros*. Penggunaan medium pertumbuhan kapang entomopatogen yang murah dan mudah diperoleh diharapkan dapat meningkatkan penggunaan kapang *M. majus* UICC 295 sebagai bioinsektisida. Bioinsektisida yang mengandung kapang *M. majus* diharapkan dapat menjadi

pengganti penggunaan insektisida sintetik dalam mengendalikan hama *O. rhinoceros*.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 KAPANG ENTOMOPATOGEN

Fungi adalah mikroorganisme eukariotik, kemoheterotrof, saprofit, dapat berbentuk multiseluler atau uniseluler, berdinding sel dari kitin dan glukukan, dan bereproduksi secara seksual maupun aseksual (Deacon 2006: 4--5). Fungi adalah mikroorganisme kemoheterotrof yang dapat bersifat saprofit atau parasit (Talaro 2009: 134). Berdasarkan alat reproduksi seksualnya, fungi terbagi menjadi lima filum yaitu *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* dan *Basidiomycota* (Sumbali & Mehrotra 2009: 430). Secara morfologi, fungi dibagi menjadi tiga kelompok yaitu khamir (*yeast*), kapang (*mould*), dan cendawan (*mushroom*). Khamir merupakan fungi uniseluler dan dapat bersifat dimorfik (Gandjar dkk. 2006: 72). Cendawan merupakan fungi multiseluler yang memiliki karpus atau tubuh buah yang besar (Hogg 2005: 205).

Kapang merupakan fungi multiseluler dan terdiri atas miselium. Miselium merupakan kumpulan hifa yang membentuk suatu jala. Kapang bereproduksi secara aseksual maupun seksual. Berdasarkan ada tidaknya alat reproduksi seksual, bentuk kapang terbagi menjadi dua yaitu anamorf dan teleomorf. Kapang yang telah diketahui alat reproduksi seksualnya disebut teleomorf, sedangkan kapang yang belum diketahui alat reproduksi seksualnya disebut anamorf (Webster & Weber 2007: 32).

Kapang entomopatogen adalah kapang yang dapat menginfeksi dan menyebabkan kematian pada serangga. Kapang entomopatogen umumnya memiliki enzim-enzim yang mampu mendegradasi bahan yang terkandung pada kutikula serangga seperti kitinase untuk mendegradasi kitin dan protease untuk mendegradasi protein. Kapang entomopatogen menginfeksi inang melalui 2 tahap yaitu penempelan (*adhesion*) dan germinasi. Konidia dapat menempel pada kulit inang karena adanya interaksi hidrofobik antara hidrofobin konidia dan permukaan kutikula inang. Pada genus *Metarhizium*, enzim protease Pr1 diproduksi untuk mendegradasi kutikula inang (Bidochka & Small 2005: 29--30).

Germinasi konidia pada kutikula inang memicu pembentukan *germ tube* pada rongga *hemocoel* serangga. Kapang tersebut kemudian menginfeksi serangga dengan memproduksi toksin berupa destruksin yang berbahaya bagi serangga (Hirsch & Grund 2010: 11).

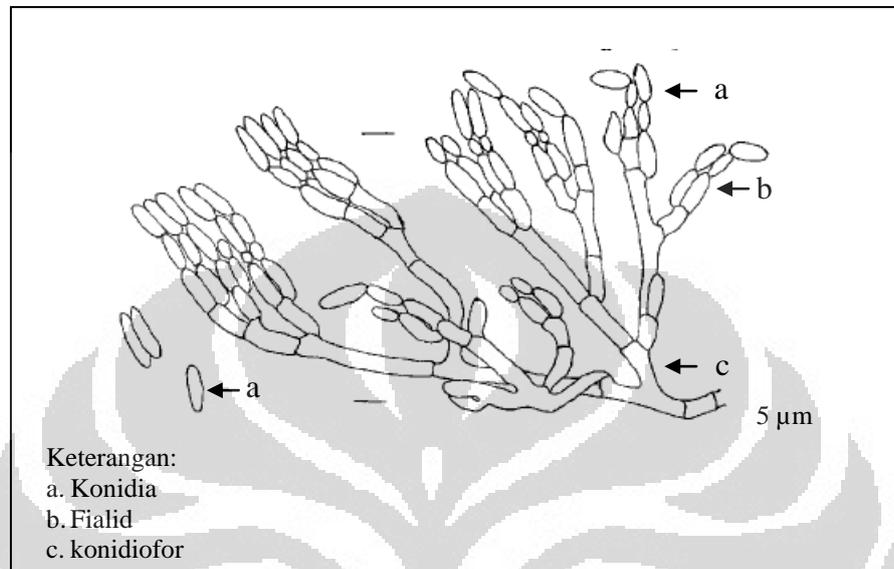
Destruksin merupakan senyawa metabolit yang diproduksi oleh kapang entomopatogen dari genus *Metarhizium* Sorokin. Destruksin terdiri dari asam α -hidroksilasil dan enam residu asam amino seperti prolin, isoleusin, valin, metil-valin, metal-alanin, dan β -alanin. Destruksin dikelompokkan ke dalam enam bentuk, yaitu destruksin A, B, C, E, dan *desmethyldestruxin* B atau B₂. Destruksin merupakan toksin neuromuskular yang dapat menginduksi depolarisasi membran otot serangga sehingga menyebabkan kelumpuhan otot serangga tersebut (Male dkk. 2009: 1447--1448).

2.2 *Metarhizium majus* (Johnst.) Bisch., Rehner & Humber

Kapang *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin merupakan salah satu kapang entomopatogen yang digunakan untuk pengendalian serangga hama. Kapang *M. anisopliae* dapat ditemukan di permukaan tanah dan pada tubuh serangga. Kapang tersebut menyerang larva maupun serangga dewasa dari ordo *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Homoptera*, *Hemiptera*, dan *Isoptera* (Prayogo dkk. 2005: 20).

Metarhizium anisopliae terbagi menjadi dua varian berdasarkan ukuran konidia yaitu varian *anisopliae* dan varian *majus*. Varian *majus* memiliki ukuran konidia yang lebih besar dibandingkan dengan varian *anisopliae* (Nishi dkk. 2010: 19). *Metarhizium anisopliae* var. *majus* saat ini dikenal sebagai *Metarhizium majus* (Johnst.) Bisch., Rehner & Humber berdasarkan penelitian yang dilakukan Bischoff dkk. (2009: 512 & 520). Penelitian tersebut bertujuan untuk mengevaluasi hubungan filogenetik antara varian *M. anisopliae*. Hasil dari penelitian tersebut adalah terdapat enam varian *M. anisopliae* yang kemudian dijadikan spesies, yaitu *M. anisopliae*, *M. guizhouense* Q.T Chen & H.L. Guo, *M. pingshaense* Q.T Chen & H.L. Guo, *M. acridum* (Driver & Milner) J.F. Bisch., Rehner & Humber, *M. lepidiotae* (Driver & Milner) J.F. Bisch., Rehner &

Humber dan *M. majus* UICC 295. Selain itu, ditemukan juga spesies baru dari *Metarhizium* yaitu *M. bruneum* Petch, *M. globosum* J.F. Bisch., Rehner & Humber, dan *M. robertsii* J.F. Bisch., Rehner & Humber.



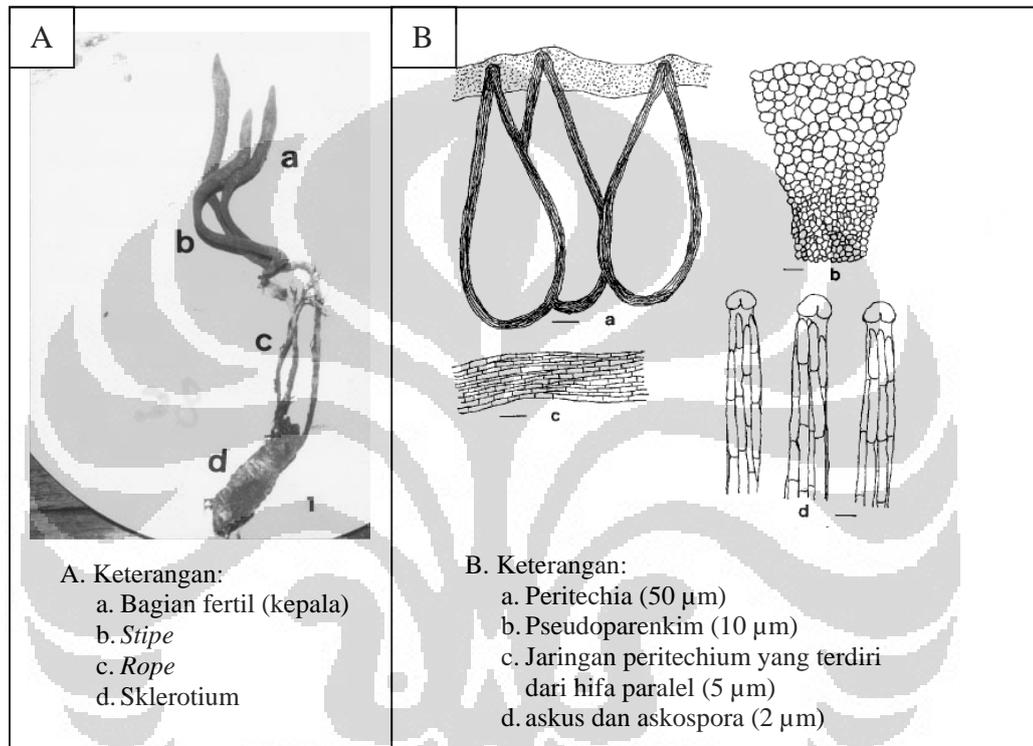
Gambar 2.2.1 *Metarhizium anisopliae* var. *majus*
[Sumber: Liu dkk. 2001: 180]

Berdasarkan Bischoff dkk. (2009: 524 & 528) *Metarhizium majus* yang diisolasi dari tanah dan ditumbuhkan pada medium *Saboraud Dextrose with Yeast Extract Agar* (SDYA) selama 14 hari memiliki karakter morfologi yaitu miselium berwarna putih, warna koloni *olive*, dan konidia berbentuk silindris dengan panjang 8,3--14,5 μm dan lebar 2,5--5,0 μm . Rosadi (2011: 26) mendeskripsikan bahwa kapang *M. majus* UICC 295 yang berumur 18 hari dan ditumbuhkan pada medium SDYA pada suhu 22--25 $^{\circ}\text{C}$ dengan kondisi gelap memiliki koloni berwarna *olive green*, miselium berwarna putih, sebalik koloni berwarna hialin, tekstur granular, memiliki *growing zone*, dan *exudate drops* yang berwarna kuning kecokelatan, namun tidak memiliki zonasi dan *radial furrow*. Hifa kapang tersebut memiliki kisaran lebar 1,49--2,47 μm dan konidia berbentuk silindris dengan kisaran panjang 8,26--11,13 μm dan lebar 2,42--3,37 μm .

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

Kingdom : *Eumycota*
Filum : *Ascomycota*

Subfilum : *Ascomycotina*
 Kelas : *Sordariomycetes*
 Ordo : *Hypocreales*
 Suku : *Clavicipitaceae*
 Marga : *Metarhizium*
 Jenis : *Metarhizium majus* (Johnst.) Bisch., Rehner & Humber



Gambar 2.2.2 *Cordyceps brittlebankisoides*
 [Sumber: Liu dkk. 2001: 180]

Metarhizium anisopliae var. *majus* merupakan anamorf dari *Cordyceps brittlebankisoides* Liu, Liang, Whalley, Yao, & Liu. Liu dkk. (2001) melakukan penelitian dengan mengambil spesimen kumbang (*Coleoptera: Scarabaeidae*) yang mati terinfeksi kapang di gunung Wawu, Sichuan, Cina. Dari spesimen tersebut diperoleh sklerotium, askospora, stroma dan hifa. Askospora dan hifa kemudian ditumbuhkan pada medium *Potato dextrose agar* selama 14 hari dengan suhu 23°C. Hasil pengamatan morfologi menunjukkan bahwa *Cordyceps brittlebankisoides* memiliki ukuran konidia yang lebih kecil dibandingkan *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. Selain itu, hasil pengamatan secara genetik

menunjukkan bahwa *Cordyceps brittlebankisoides* dan *Metarhizium anisopliae* var. *majus* memiliki gen yang identik.

2.3 KUMBANG BADAQ (*Oryctes rhinoceros*)

Oryctes rhinoceros Linn. (*Coleoptera: Dynastidae*) yang dikenal sebagai kumbang badak merupakan hama yang banyak menyerang perkebunan kelapa di Indonesia (Pracaya 2008: 115). Hama tersebut menyerang pucuk dan pangkal daun muda yang belum membuka dan merusak jaringan aktif untuk pertumbuhan, menyebabkan kerusakan daun yang akan terlihat setelah pelepah daun terbuka (Departemen Pertanian 1993: 4).

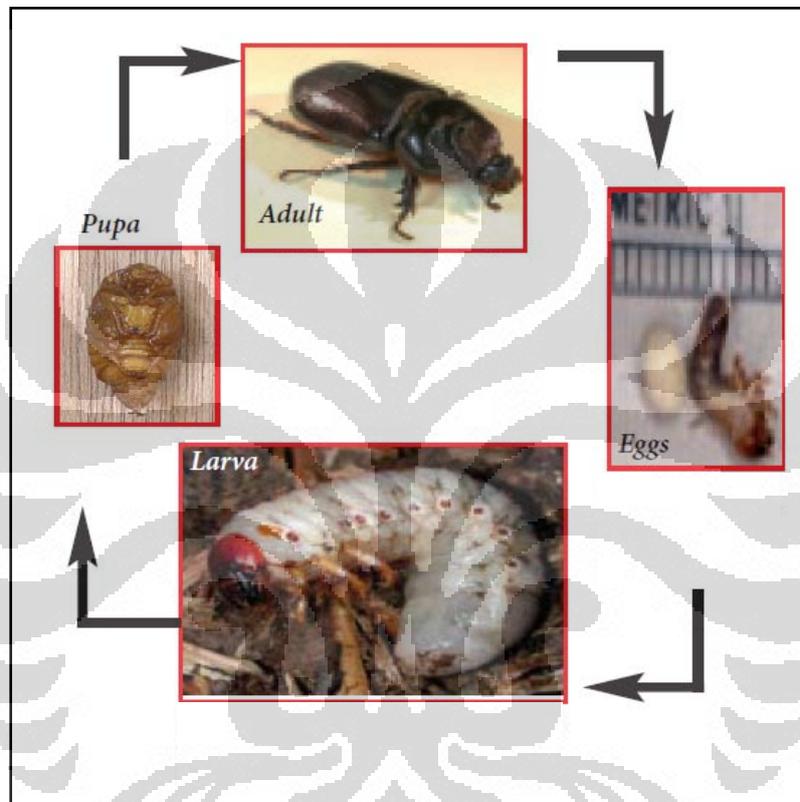
Kumbang *Oryctes rhinoceros* betina bertelur sekitar 50 telur setiap siklus. Telur-telur tersebut akan menetas menjadi larva setelah 8--12 hari. Larva yang baru keluar berwarna putih dan bagian mulut merah kecokelatan (Swamy & Deesh 2011:2). Panjang tubuh larva yang baru menetas adalah 7--8 mm. Panjang tubuh larva yang sudah dewasa dapat mencapai 60--105 mm dengan lebar 25 mm. Bentuk badan larva membengkok dengan bagian abdomen membentuk kantong. Badan larva ditumbuhi rambut-rambut pendek (Departemen Pertanian 1993: 1--2). Larva *O. rhinoceros* digunakan pada penelitian pengendalian hama karena larva, terutama instar I, memiliki lapisan integumen yang masih sangat tipis sehingga kapang entomopatogen mudah melakukan penetrasi (Prayogo dkk. 2005: 23).

Pupa *O. rhinoceros* berwarna coklat dengan panjang 45--50 mm dan lebar 22 mm. Lama stadium pupa adalah 19--27 hari. Kumbang jantan mempunyai tanduk yang lebih panjang dari kumbang betina. Umur kumbang dapat mencapai 4--4,5 bulan (Departemen Pertanian 1993: 2).

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

Kingdom : *Animalia*
 Filum : *Arthropoda*
 Kelas : *Insecta*
 Bangsa : *Coleoptera*

Subbangsa : *Polyphaga*
 Supersuku : *Scarabaeoidea*
 Suku : *Dynastidae*
 Marga : *Oryctes*
 Jenis : *Oryctes rhinoceros* Linnaeus



Gambar 2.3 Siklus hidup *Oryctes rhinoceros*
 [Sumber: Swamy & Deesh 2011: 2.]

Mekanisme pertahanan tubuh serangga terhadap infeksi kapang adalah koagulasi, fagositosis, pembentukan nodul dan enkapsulasi. Mekanisme pertahanan tersebut melibatkan hemosit yang berfungsi sebagai sel fagosit. Sel fagosit menelan dan mendegradasi partikel-partikel asing dengan mekanisme fagositosis (Wang & Leger 2005: 6647). Nodul merupakan kumpulan partikel asing yang diperangkap di dalam hemosit untuk dikeluarkan dari hemolimfa. Enkapsulasi merupakan mekanisme yang terjadi jika partikel asing yang masuk ke dalam tubuh serangga berukuran terlalu besar untuk ditanggulangi oleh mekanisme fagositosis dan pembentukan nodul. Enkapsulasi merupakan

mekanisme pembentukan granuloma, yaitu struktur yang terdiri atas banyak hemosit yang memipih dan menyelubungi kapang yang berukuran besar. Sel kapang di dalam granuloma akan diselubungi oleh lapisan melanin yang tebal. Mekanisme enkapsulasi diawali dengan pengenalan sel kapang oleh hemosit (Samson dkk. 1988: 135--137).

Sel kapang dapat dikenali dari struktur β -1,3-glukan pada dinding sel kapang. Keberadaan sel kapang yang mengandung β -1,3-glukan pada dinding selnya akan menginduksi aktivasi enzim fenol oksidase pada serangga. Enzim fenol oksidase yang telah aktif akan menempel pada kapang di dalam hemocoel. Enzim fenol oksidase mengkatalisis reaksi hidroksilasi monofenol dalam tubuh serangga menjadi quinon. Senyawa quinon berperan dalam proses sklerotisasi dan pigmentasi kutikula serta sebagai prekursor dalam sintesis melanin pada serangga. Melanin kemudian dikeluarkan ke dalam kutikula atau di sekitar luka pada tubuh serangga (Samson dkk. 1988: 135--137).

2.4 MEDIUM PERTUMBUHAN

Medium merupakan suatu substansi yang digunakan untuk menyediakan nutrisi bagi pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroorganisme (Irianto 2006: 281). Medium yang baik bagi pertumbuhan mikroorganisme adalah yang mengandung nutrisi-nutrisi penting yang dibutuhkan baik makronutrisi maupun mikronutrisi. Mikronutrisi umumnya berfungsi sebagai kofaktor enzim (Hogg 2005: 79). Medium untuk kultur mikroorganisme juga harus mengandung sumber karbon seperti contohnya glukosa dan asam amino (Atlas 2010: 1).

Berdasarkan wujudnya, medium dapat dibagi menjadi dua jenis, yaitu medium cair dan medium padat. Medium cair umumnya berupa *broth* yang tidak mengandung agen pematat (*solidifying agent*). Medium padat merupakan medium cair yang diberi agen pematat (*solidifying agent*) seperti agar, gelatin, atau *silica gel*. Agen pematat yang baik adalah yang tidak menghambat pertumbuhan mikroorganisme dan tidak mencair di suhu ruang (Atlas 2010: 1).

Salah satu medium yang digunakan untuk kultur kapang adalah *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) (Benson 2001: 52). Beberapa penelitian melaporkan

penambahan *yeast extract* sehingga menjadi *Saboraud Dextrose with Yeast Extract Agar* (SDYA). Komposisi medium SDYA yaitu dekstrosa, pepton, *yeast extract*, dan agar (Desyanti dkk. 2007: 69). Glukosa merupakan sumber karbohidrat dalam bentuk monosakarida. Pepton merupakan protein yang mengandung nitrogen dan karbon (Atlas 2010: 1). Ekstrak khamir (*yeast extract*) mengandung polisakarida, protein, glukan, dan kitin (Murphy & Horgan 2005: 138--139).

Unsur lain seperti kitin dan protein dapat ditambahkan dalam medium untuk mengaktifasi enzim-enzim penting yang terdapat pada kapang yang akan dibiakkan. Kapang entomopatogen umumnya memiliki beberapa jenis enzim seperti kitinase dan protease yang bekerja saat proses penetrasi miselium pada kulit serangga (Bidochka & Small 2005: 30). Penambahan kitin pada medium dapat mengaktifkan enzim kitinase pada kapang entomopatogen sehingga kapang mampu mencerna kitin yang merupakan bahan penyusun eksoskeleton serangga (Herlinda dkk. 2010: 138).

2.5 TEPUNG JANGKRIK

Kemampuan kapang entomopatogen dalam menginfeksi inangnya dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, salah satunya adalah kandungan nutrisi pada substrat. Substrat yang banyak mengandung protein dapat mempercepat proses germinasi konidia kapang entomopatogen (Shah dkk. 2005: 264). Kecepatan germinasi konidia sangat penting dalam menginfeksi inang. Pergantian kulit serangga dan perubahan stadium instar yang cepat mempengaruhi perilaku dan mekanisme pertahanan diri serangga terhadap kapang entomopatogen. Semakin cepat konidia bergerminasi, maka akan semakin cepat kapang entomopatogen menginfeksi inangnya. Selain itu, jumlah konidia akan menentukan kemampuan kapang entomopatogen dalam membunuh serangga. Semakin banyak konidia yang diproduksi, maka akan semakin besar kemungkinan konidia kapang entomopatogen menempel pada serangga (Prayogo 2006: 48).

Medium yang digunakan dalam pertumbuhan kapang entomopatogen dapat mempengaruhi kemampuan kapang entomopatogen dalam menginfeksi

inang. Medium yang digunakan sangat mempengaruhi laju pembentukan koloni dan produksi konidia (Prayogo dkk. 2005: 22). Namun demikian, kemampuan kapang entomopatogen dalam menginfeksi inangnya dapat menurun jika terus menerus dibiakkan pada medium dengan kandungan nutrisi yang sangat berbeda dengan inangnya (Magan 2001: 239). Oleh karena itu, penambahan sumber karbon seperti glukosa, kitin, pati, dan nitrogen pada medium pertumbuhan dapat dilakukan untuk mempertahankan kemampuan kapang entomopatogen dalam menginfeksi inang. Kang (1998: 280) melaporkan bahwa penambahan sumber karbon pada medium pertumbuhan dapat membantu menjaga kemampuan infeksi kapang entomopatogen, seperti penambahan kitin koloidal untuk membantu mengaktifkan enzim kitinase pada kapang entomopatogen *M. anisopliae*.

Salah satu serangga yang dapat ditambahkan ke dalam medium pertumbuhan kapang entomopatogen adalah jangkrik. Jangkrik (*Gryllidae: Orthoptera*) merupakan salah satu serangga yang banyak ditemukan di alam. Jangkrik dapat menjadi hama bagi perkebunan maupun predator bagi hama yang lebih kecil seperti belalang dan ulat bulu (Saeed dkk. 2000: 175). Selain itu, jangkrik dapat digunakan sebagai bahan untuk pakan ternak, unggas, maupun manusia. Berdasarkan Wang dkk. (2005: 669), 100 gram jangkrik mengandung protein sebesar 58,3% dan kitin sebesar 8,7%.

Jangkrik dapat juga dimanfaatkan sebagai substrat bagi pertumbuhan kapang entomopatogen. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Herlinda dkk. (2006:70 & 73) penambahan bubuk jangkrik sebanyak 0,5% (b/v) pada medium *Saboraud Dextrose Broth* (SDB) dapat meningkatkan kemampuan kapang entomopatogen *Beauveria bassiana* dalam menginfeksi larva *Plutella xylostella*. Penumbuhan *B. bassiana* pada medium tanpa penambahan bubuk jangkrik terbukti menurunkan kemampuan infeksi *B. bassiana* dibandingkan dengan biakan yang ditumbuhkan dalam medium dengan penambahan bubuk jangkrik. Kematian larva *P. xylostella* yang terinfeksi *B. bassiana* pada medium dengan penambahan tepung jangkrik meningkat sebesar 18,36%. Hal tersebut dapat terjadi karena tepung jangkrik mengandung kitin dan protein yang dapat merangsang pembentukan protease dan kitinase pada kapang entomopatogen. Enzim protease dan kitinase sangat penting bagi kapang entomopatogen dalam

proses degradasi kutikula serangga. Kadar enzim protease dan kitinase yang tinggi dapat mempercepat degradasi kutikula serangga. Kemampuan degradasi kutikula serangga tersebut sangat dibutuhkan kapang entomopatogen untuk melakukan penetrasi ke dalam tubuh serangga.

2.6 APLIKASI KONIDIA KAPANG PADA SERANGGA

Aplikasi konidia kapang pada serangga dapat dilakukan dengan beberapa metode. Metode aplikasi kapang entomopatogen yang telah berkembang dengan baik di Indonesia adalah metode aplikasi kontak langsung dan metode umpan (Desyanti dkk. 2007: 69). Metode umpan dilakukan dengan cara membuat pakan serangga yang telah dicampur dengan konidia kapang entomopatogen. Pakan tersebut kemudian diletakkan pada tempat-tempat yang dapat menarik perhatian serangga target (Foster dkk. 2010: 304).

Metode kontak langsung dapat dilakukan dengan cara menyemprotkan suspensi konidia kapang ke permukaan tubuh serangga (Foster dkk. 2010: 304). Selain itu, metode kontak langsung dapat dilakukan dengan mencelupkan serangga ke dalam suspensi konidia kapang. Metode kontak langsung memungkinkan konidia langsung mengenai tubuh serangga dalam jumlah yang banyak sehingga konidia dapat dengan cepat melekat, bergerminasi, dan berpenetrasi menembus kutikula serangga (Desyanti dkk. 2007: 69 & 74--75).

Keunggulan metode aplikasi kontak langsung dibandingkan dengan metode umpan adalah kapang dapat masuk melalui celah alami yang terdapat pada tubuh serangga seperti spirakel dan pori-pori pada seluruh organ. Metode umpan memungkinkan konidia masuk ke dalam tubuh serangga melalui saluran pencernaan sehingga perkecambahan konidia dapat dihambat oleh enzim-enzim yang terdapat pada saluran pencernaan. Hal tersebut membuat metode aplikasi kontak langsung lebih unggul dibandingkan dengan metode umpan (Desyanti dkk. 2007: 74--75).

2.7 PRESERVASI KAPANG

Preservasi kapang dilakukan untuk menjaga viabilitas, kestabilan morfologi, fisiologi, dan genetik dengan cara menyimpan kapang dalam keadaan dorman atau memperlambat proses pertumbuhan kapang. Berdasarkan lama penyimpanan, preservasi terbagi menjadi dua yaitu preservasi jangka pendek (*short-term preservation*) dan preservasi jangka panjang (*long-term preservation*). Preservasi jangka pendek dilakukan untuk menyimpan kapang dalam waktu satu bulan hingga satu tahun. Keunggulan dari preservasi jangka pendek adalah mudah dilakukan dan tidak memerlukan peralatan yang mahal. *Continuous growth* merupakan preservasi jangka pendek yang dilakukan dengan cara menumbuhkan kapang pada medium agar dan menyimpannya di suhu 5°--20° C. Kekurangan dari preservasi jangka pendek adalah perlu dilakukan pemeriksaan secara berkala karena rentan kontaminasi (Nakasone dkk. 2006: 37). Selain itu, perlu dilakukan transfer biakan dari medium lama ke medium baru secara berkala. Kualitas dan kestabilan morfologi, fisiologi dan genetik kapang dapat berubah apabila dilakukan transfer berulang kali. Herlinda dkk. (2006: 75) menyatakan terjadi penurunan viabilitas dan kemampuan *B. bassiana* dalam menginfeksi *P. xylostella* akibat transfer berulang kali.

Preservasi jangka panjang digunakan untuk menyimpan kapang dalam waktu lima hingga puluhan tahun. Metode *freezing* merupakan metode preservasi jangka panjang menggunakan suhu dingin. *Cryopreservation* termasuk ke dalam metode preservasi *freezing*. Keunggulan metode *freezing* adalah mampu menjaga kualitas kapang dengan baik dalam waktu yang lama. Kualitas dan kestabilan morfologi, fisiologi dan genetik kapang tidak berubah karena metabolisme kapang melambat saat disimpan di suhu dingin. Selain itu, tidak perlu dilakukan pemeriksaan secara berkala karena kemungkinan kontaminasi yang kecil. Namun demikian, preservasi jangka panjang membutuhkan alat yang mahal sehingga dapat menjadi kendala dalam menggunakan metode tersebut (Nakasone dkk. 2006: 37 & 41).

Preservasi jangka panjang umumnya dilakukan dengan menyimpan kapang pada suhu -80° C dengan penambahan *cryoprotectant*. Pemberian

cryoprotectant bertujuan untuk menjaga sel hidup dari dehidrasi dan kerusakan selama proses *freezing*. *Cryoprotectant* menjaga sel dengan mencegah terbentuknya kristal es kasar sehingga membran sel tidak akan rusak selama proses *freezing*. Terdapat dua jenis *cryoprotectant*, yaitu *penetrating agents* dan *non-penetrating agents*. Contoh *penetrating agents cryoprotectant* adalah gliserol dan *dimethyl sulfoxide* (DMSO) yang mampu menembus membran sel dan menjaga sel bagian intraseluler maupun ekstraseluler. Penyimpanan kapang pada suhu -80°C dengan penambahan gliserol 10% (v/v) terbukti mampu menyimpan kapang dengan baik selama lima tahun. Contoh *non-penetrating agents cryoprotectant* adalah sukrosa, laktosa, glukosa, mannitol, sorbitol, dextran, dan *polyvinyl-pyrrolidone* yang tidak mampu menembus membran sel sehingga hanya menjaga sel bagian ekstraseluler (Nakasone dkk. 2006: 41). Gula sakarida juga dapat digunakan sebagai *cryoprotectant*. Trehalosa merupakan disakarida yang dapat digunakan sebagai protektan. Trehalosa bertindak sebagai pengganti air pada membran yang dapat mencegah dehidrasi dan menjaga struktur membran selama proses *freezing* (Bhandal dkk. 1985: 430).

Kapang dapat disimpan bersama substratnya seperti kayu, tanah, dan potongan daun. Kapang dapat juga disimpan bersama medium pertumbuhannya seperti agar. Selain dapat disimpan bersama medium pertumbuhannya, kapang entomopatogen juga dapat disimpan bersama potongan tubuh inangnya. (Nakasone dkk. 2006: 39 & 40) menyatakan bahwa kapang *Pyrenochaeta* De Not. dan *Thielaviopsis* Went tetap viabel setelah disimpan bersama akar tanaman yang merupakan inangnya.

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

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

3.2 ALAT DAN BAHAN

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah lemari pendingin [GASSIO], kompor listrik [Sanyo], oven [Heraeus], oven kompor [Bima Sakti], 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 stereo [Carl ZEISS], mikroskop trinokular [Carl ZEISS], lemari pendingin [AMB-HI-LO], blender [Miyako BL15], kamera digital [Canon IXY DIGITAL 910iS], *cryotube* [Biologix], *deep freezer* [Sanyo], termometer ruang, kotak plastik dengan panjang 14,5 cm, lebar 9,5 cm dan tinggi 6 cm dengan tutup, *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

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

3.2.2.2 Larva *Oryctes rhinoceros*

Larva *Oryctes rhinoceros* yang digunakan diperoleh dari peternakan sapi milik rakyat di Desa Rajagaluh, Kabupaten Majalengka, Jawa Barat.

3.2.2.3 Jangkrik

Jangkrik yang digunakan merupakan jangkrik ternak dan diperoleh dari toko makanan burung.

3.2.2.4 Medium

Medium yang digunakan adalah *Saboraud Dextrose Yeast Extract Agar* (SDYA). Medium SDYA digunakan untuk penumbuhan, pemeliharaan, dan enumerasi kapang *M. majus* UICC 295.

3.2.2.5 Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah dekstrosa [Conda], pepton [Merck], *yeast extract* [BD], agar [Britania], antibiotik tetrasiklin [Kimia Farma], kloramfenikol [Wako], gliserol [Merck], trehalosa, alkohol teknis 70%, spiritus teknis, *lactofenol cotton blue*, dan aseton teknis.

3.2.2.6 Bahan habis pakai

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

3.3 CARA KERJA

Skema kerja penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1.

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

Pembuatan medium *Saboraud Dextrose with Yeast Extract Agar* (SDYA) dilakukan berdasarkan Rosadi (2011: 17). Glukosa sebanyak 10 g, pepton 2,5 g, *yeast extract* 2,5 g, dan agar 20 g ditambahkan akuades hingga volume total mencapai 1000 ml. Medium kemudian dipanaskan hingga larut dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan dua atm selama 15 menit. Medium steril ditambahkan antibiotik tetrasiklin sebanyak 500 mg. Medium dikocok hingga homogen, dituang secara aseptis ke dalam cawan petri, masing-masing sebanyak 20 ml, dan dibiarkan mengeras.

Pembuatan medium SDYA miring dilakukan dengan menambahkan 200 mg/L kloramfenikol yang telah dilarutkan dalam 1 ml alkohol 96% (v/v) ke dalam medium yang telah dididihkan. Medium dipindahkan ke dalam tabung reaksi, masing-masing sebanyak enam ml. Medium kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan dua atm selama 15 menit. Medium steril dalam tabung reaksi kemudian diletakkan pada papan yang dimiringkan, lalu dibiarkan mengeras.

3.3.2 Pembuatan tepung jangkrik

Pembuatan tepung jangkrik dilakukan berdasarkan Herlinda dkk. (2006: 71). Jangkrik dikeringkan menggunakan oven 105° C. Setelah didapat berat

kering, jangkrik kemudian dihaluskan menggunakan mortar dan blender. Tepung jangkrik kemudian disaring menggunakan saringan dengan ukuran 600 μm . Jangkrik yang sudah halus kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi SDYA dengan konsentrasi 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v).

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

Sebanyak 200 mg/L kloramfenikol yang telah dilarutkan dalam satu ml alkohol 96% (v/v) ditambahkan ke dalam medium yang telah dididihkan. Medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan dua atm selama 15 menit. Medium steril dikocok hingga homogen, dituang secara aseptis ke dalam cawan petri, masing-masing sebanyak 20 ml, dan dibiarkan mengeras.

3.3.3 Pemeliharaan kapang *M. majus* UICC 295

Pemeliharaan kapang *M. majus* UICC 295 dilakukan dengan membuat *stock* dan *working culture* berdasarkan Hogg (2005: 89 & 96). Koloni kapang *M. majus* UICC 295 yang telah murni dipindahkan ke dalam dua tabung berisi medium SDYA sebagai control dan SDYA dengan tepung jangkrik sebagai *stock culture* dan *working culture*. *Stock culture* dibuat dengan memindahkan koloni kapang ke dalam tabung pertama menggunakan jarum tanam tajam. Jarum tanam tajam berisi biakan kapang digoreskan secara vertikal dari bagian bawah hingga atas medium. Biakan kapang *stock culture* kemudian disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4° C setelah sporulasi penuh. *Working culture* dibuat

dengan memindahkan koloni kapang ke dalam tabung kedua dengan *streak method* menggunakan jarum tanam bulat (ose). Jarum tanam bulat berisi biakan kapang digoreskan secara vertikal dari bagian bawah hingga atas medium. Biakan kapang *working culture* kemudian disimpan pada suhu 27° C dengan kondisi gelap.

3.3.4 Pengamatan morfologi kapang *M. majus* UICC 295

Pengamatan morfologi kapang *M. majus* UICC 295 dilakukan berdasarkan Rosadi (2011: 26), yaitu dengan mengamati morfologi kapang secara makroskopik dan mikroskopik. Kapang *M. majus* UICC 295 ditumbuhkan pada medium SDYA dan SDYA dengan tepung jangkrik dalam cawan petri dengan teknik *stab*. Pengamatan morfologi secara makroskopik yang dilakukan dengan mengamati warna koloni berdasarkan standar warna Faber Castell, tekstur koloni, diameter koloni, ada atau tidaknya *exudate drop*, zonasi, *growing zone*, warna sebalik koloni, dan *radial furrow*. Pengukuran diameter koloni dilakukan dengan cara mengambil rata-rata dari tiga kali pengukuran. Pengamatan morfologi secara mikroskopik dilakukan dengan mengamati bentuk konidia, mengukur panjang dan lebar konidia, serta diameter hifa. Pengukuran panjang dan lebar konidia serta diameter hifa dilakukan dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 400 kali. Konidia dan hifa diukur menggunakan mikroskop trinokular [Carl ZEISS].

3.3.5 Enumerasi konidia kapang

Enumerasi konidia kapang menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) berdasarkan Hogg (2005: 91--93). Biakan kapang berumur 15 hari pada medium SDYA miring dan medium SDYA dengan tepung jangkrik dibuat suspensi dengan menambahkan 5 ml akuades steril dan dikerik menggunakan jarum tanam bulat (ose). Suspensi kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks. Suspensi konidia kapang diencerkan menggunakan akuades steril hingga faktor pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} dan 10^{-6} . Sebanyak 0,1 ml suspensi konidia dari masing-masing pengenceran disebarkan dengan mikropipet ke permukaan

medium SDYA medium SDYA dengan tepung jangkrik dalam cawan petri dengan tiga pengulangan dan diratakan dengan spatel *Drygalski*. Biakan kemudian diinkubasi selama tiga hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap. Jumlah CFU/ml sampel dihitung berdasarkan Cappuccino dan Sherman (1996: 119) dengan rumus:

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

Perhitungan jumlah konidia juga dilakukan dengan menggunakan 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 jangkrik 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

3.3.6 Persiapan larva untuk pengujian

Larva *O. rhinoceros* dipelihara di dalam ruangan dengan kondisi gelap, suhu berkisar antara 25--27 °C, dan kelembaban 84--97%. Larva *O. rhinoceros* beserta pakan ditempatkan dalam kotak plastik dengan panjang 14,5 cm, lebar 9,5 cm dan tinggi 6 cm dengan tutup yang diberi lubang. Pemberian pakan sebanyak 10 g pada larva dilakukan setiap tiga hari.

Larva dikelompokkan berdasarkan berat awal tubuh larva agar larva pada masing-masing kelompok perlakuan memiliki berat yang seragam. Larva dikelompokkan menjadi tiga kelompok perlakuan dan satu kelompok kontrol. Setiap kelompok terdiri atas 10 ekor larva dengan kisaran berat tertentu.

3.3.7 Pembuatan larutan triton X-100 0,05% (v/v) steril

Sebanyak 50 µl triton X-100 (98--100%) ditambahkan akuades hingga volume mencapai 100 ml, kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks. Larutan triton X-100 0,05% (v/v) tersebut kemudian 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.

3.3.8 Pengujian konidia kapang *M. majus* UICC 295 dari SDYA dengan penambahan tepung jangkrik terhadap larva *O. rhinoceros* dengan aplikasi kontak langsung

Pengujian konidia kapang *M. majus* UICC 295 dari SDYA dengan penambahan tepung jangkrik terhadap larva *O. rhinoceros* diawali dengan pembuatan suspensi kapang. Suspensi dibuat dengan menambahkan lima ml larutan triton X-100 0,05% (v/v) steril pada biakan kapang berumur 15 hari, 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. Aplikasi tersebut dilakukan pada 30 ekor larva dari kelompok

perlakuan. Larva pada kelompok kontrol diinokulasi dengan satu ml larutan triton X-100 0,05% (v/v) steril. Aplikasi 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 3 hari. Larva diletakkan dalam ruangan dengan kondisi gelap dengan suhu ruang. Parameter lingkungan yang diukur adalah kelembaban relatif dan suhu ruang. Kemampuan kapang *M. majus* UICC 295 dengan penambahan tepung jangkrik dalam membunuh larva *O. rhinoceros* akan terlihat bila terjadi kematian pada larva yang diaplikasikan dengan suspensi konidia 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:

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

3.3.9 Preservasi kapang *M. majus* UICC 295 dari SDYA dengan penambahan tepung jangkrik dalam gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan trehalosa 5% (b/v) pada suhu -80° C

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 protektan selain gliserol 10% (v/v) adalah gliserol 10% (v/v) dengan penambahan trehalosa 5% (b/v). Pembuatan larutan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan trehalosa 5% (b/v) diawali dengan pembuatan larutan *stock* gliserol 20% (v/v) dan larutan *stock* trehalosa 10%. Pembuatan larutan *stock* gliserol 20% (v/v) dilakukan dengan menambahkan 21,7 ml gliserol 92,1% ke dalam akuades hingga mencapai volume total 100 ml. Pembuatan larutan *stock* trehalosa 10% (b/v) dilakukan dengan menambahkan 10 g trehalosa ke dalam akuades hingga mencapai volume total 100 ml. Larutan *stock* gliserol 20% (v/v) dan larutan *stock* trehalosa 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* trehalosa 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 trehalosa 5% (b/v).

Penyimpanan kapang dilakukan dengan membuat suspensi. Suspensi dibuat dengan menambahkan 5 ml larutan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan trehalosa 5% (b/v) steril pada biakan kapang berumur 15 hari, kemudian biakan dikerik menggunakan jarum tanam bulat (ose). Suspensi dihomogenkan menggunakan vorteks. Suspensi kemudian dimasukkan ke dalam *cryotube* sebanyak satu ml. *Cryotube* kemudian diinkubasi di lemari pendingin pada suhu 4° C selama satu jam sebelum dimasukkan ke dalam *deep freezer* dengan suhu -80° C.

Penyimpanan kadaver larva yang terinfeksi kapang *M. majus* UICC 295 dari SDYA dengan penambahan tepung jangkrik dilakukan dengan menimbang dan memasukkan potongan larva yang terinfeksi ke dalam *cryotube* yang berisi satu ml gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan trehalosa 5% (b/v). *Cryotube* kemudian diinkubasi di lemari pendingin pada suhu 4° C selama satu jam sebelum dimasukkan ke dalam *deep freezer* dengan suhu -80° C.

3.3.10 Pengujian viabilitas *M. majus* UICC 295 setelah dipreservasi

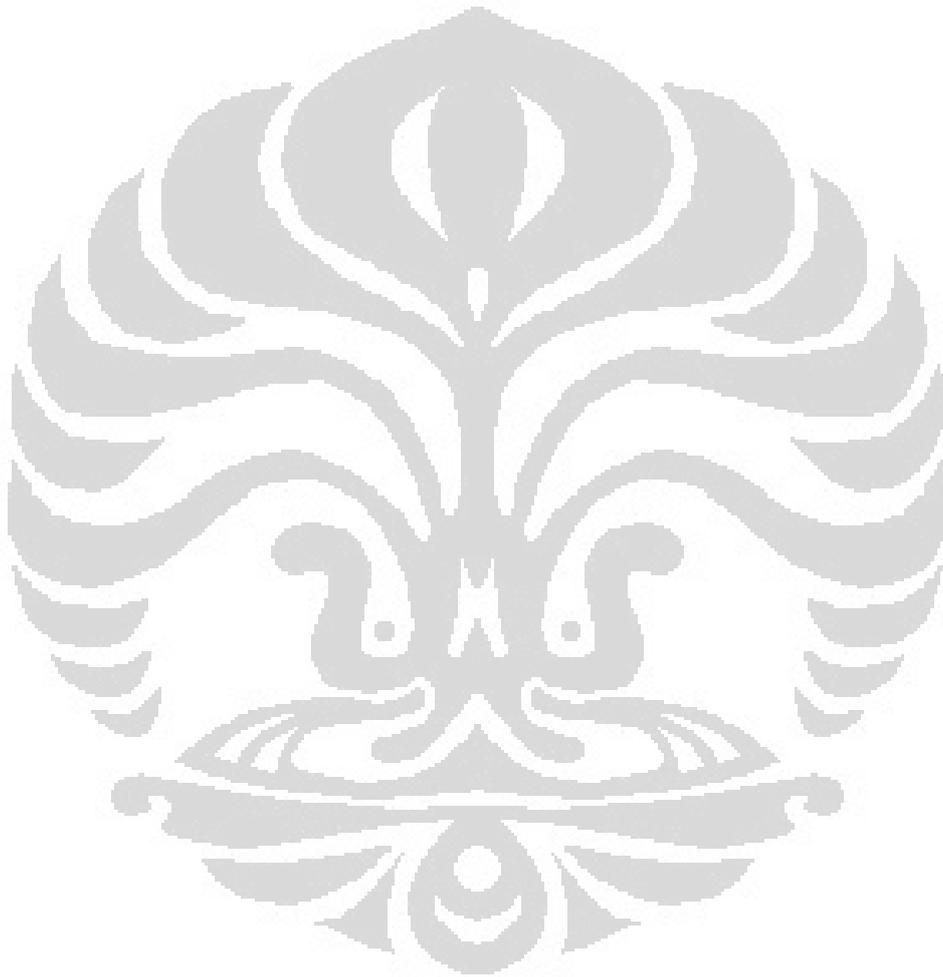
Pengujian viabilitas suspensi *M. majus* UICC 295 setelah preservasi dilakukan dengan menghitung jumlah konidia/hifa kapang menggunakan metode TPC berdasarkan Hogg (2005: 91--93). Enumerasi dilakukan pada hari ke-0, hari ke-1, hari ke-7, hari ke-14, dan hari ke-30 setelah preservasi. *Cryotube* dikeluarkan dari *deep freezer* dan dilakukan proses *thawing*. Proses *thawing* dilakukan menggunakan *water bath* pada suhu 37°C selama 30 detik hingga mencair. Suspensi konidia/hifa kapang diencerkan menggunakan akuades steril hingga faktor pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5} . Enumerasi tanpa pengenceran juga dilakukan untuk mengetahui jumlah CFU/ml sebelum dilakukan pengenceran. Sebanyak 0,1 ml suspensi konidia/hifa tanpa pengenceran dan dengan masing-masing pengenceran disebarkan dengan mikropipet ke permukaan medium SDYA dalam cawan petri dengan tiga pengulangan dan diratakan dengan spatel *Drygalski*. Biakan kemudian diinkubasi selama tiga hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap. Jumlah CFU/ml sampel dihitung berdasarkan Cappuccino dan Sherman (1996: 119) dengan rumus:

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

3.3.11 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 jangkrik dan data pengamatan morfologi secara makroskopik *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva setelah preservasi. Data kuantitatif meliputi data pengamatan morfologi secara mikroskopik kapang *M. majus* UICC 295 dari SDYA dengan penambahan tepung jangkrik, data hasil

perhitungan jumlah konidia kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA dengan tepung jangkrik berumur 15 hari, data jumlah larva yang mati, data berat larva yang masih hidup setelah aplikasi, data jumlah konidia kapang *M. majus* UICC 295 dari medium SDYA dengan tepung jangkrik yang telah dipreservasi, dan data jumlah konidia kapang *M. majus* UICC 295 dari medium SDYA dengan tepung jangkrik pada larva *O. rhinoceros* mati yang telah dipreservasi.



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 PENGARUH PENAMBAHAN TEPUNG JANGKRIK PADA MEDIUM PERTUMBUHAN TERHADAP PERTUMBUHAN *M. majus* UICC 295

Penambahan tepung jangkrik pada medium pertumbuhan *M. majus* UICC 295 dapat mempengaruhi pertumbuhan koloni kapang. Kapang *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA setelah penambahan tepung jangkrik 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) memiliki diameter koloni rata-rata yang lebih besar dibandingkan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA (Tabel 4.1.2).



Gambar 4.1.1 Tepung jangkrik
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

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

	SDYA	SDYA dengan penambahan tepung jangkrik		
		Konsentrasi		
		5% (b/v)	10% (b/v)	15% (b/v)
Warna	<i>Olive green</i>	<i>Juniper green</i>	<i>Juniper green</i>	<i>Juniper green</i>
Tekstur	Granular	granular	granular	granular
<i>Growing zone</i>	√	√	√	√
<i>Zonasi</i>	√	-	-	-
<i>Exudate drops</i>	√	√	√	√
<i>Radial furrow</i>	√	√	√	-
sebalik koloni	Hialin	hialin	hialin	hialin

Keterangan: (√) = ada

(-) = tidak ada

Peningkatan ukuran diameter koloni *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung jangkrik mengindikasikan peningkatan pertumbuhan kapang. Peningkatan ukuran diameter *M. majus* UICC 295 pada tepung jangkrik diduga disebabkan oleh ukuran partikel tepung jangkrik dan kandungan nutrisi pada medium. Ukuran partikel tepung jangkrik dapat memengaruhi pertumbuhan kapang *M. majus* UICC 295. Ukuran partikel yang digunakan adalah 600 µm. Ukuran partikel yang kecil dapat memudahkan penyerapan nutrisi oleh kapang sehingga kapang dapat dengan cepat membentuk struktur sel dan tumbuh. Berdasarkan Leger dkk. (1986: 1512), ukuran partikel substrat memengaruhi kecepatan penyebaran hifa pada permukaan medium. Semakin kecil partikel medium, maka semakin besar luas permukaan yang dapat didegradasi oleh kapang. Pertumbuhan koloni pada *M. anisopliae* lebih tinggi terlihat pada medium dengan penambahan kitin koloidal 1% (b/v) dengan ukuran partikel kurang dari 0,2 mm, dibandingkan kitin koloidal 1% (b/v) dengan ukuran partikel 0,5 mm. Hal tersebut disebabkan oleh besarnya luas permukaan medium yang dapat dijangkau oleh enzim hidrolitik sehingga nutrisi pada medium dapat digunakan dengan lebih efisien.

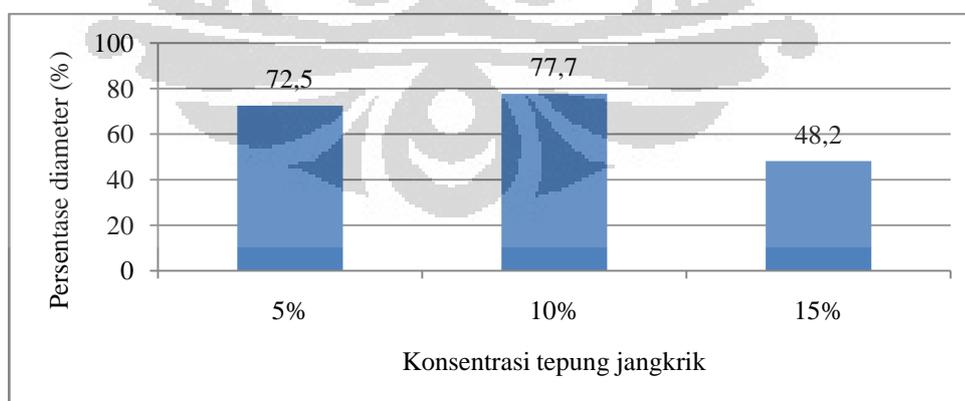
Peningkatan ukuran diameter koloni *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung jangkrik juga dapat dipengaruhi oleh kandungan nutrisi pada medium. Medium SDYA dengan penambahan tepung jangkrik mengandung protein, lipid, karbohidrat, dan asam nukleat yang merupakan sumber karbon dan nitrogen. Molekul-molekul tersebut merupakan unsur utama yang berperan dalam pembentukan struktur sel. Prayogo dkk. (2005: 22) menyatakan bahwa kandungan nutrisi pada medium yang digunakan sangat mempengaruhi laju pembentukan koloni. Kadar karbohidrat dan protein yang tinggi pada medium akan mempercepat germinasi konidia sehingga pembentukan koloni akan semakin cepat. Menurut Walker dan White (2005: 21--22), karbon dan nitrogen akan diasimilasi menjadi unsur-unsur pembentuk struktur sel seperti dinding sel, membran sel, dan nukleus.

Penambahan tepung jangkrik juga memengaruhi warna koloni. Warna koloni *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada SDYA dengan penambahan tepung jangkrik adalah *juniper green*, sedangkan warna koloni *M. majus* UICC

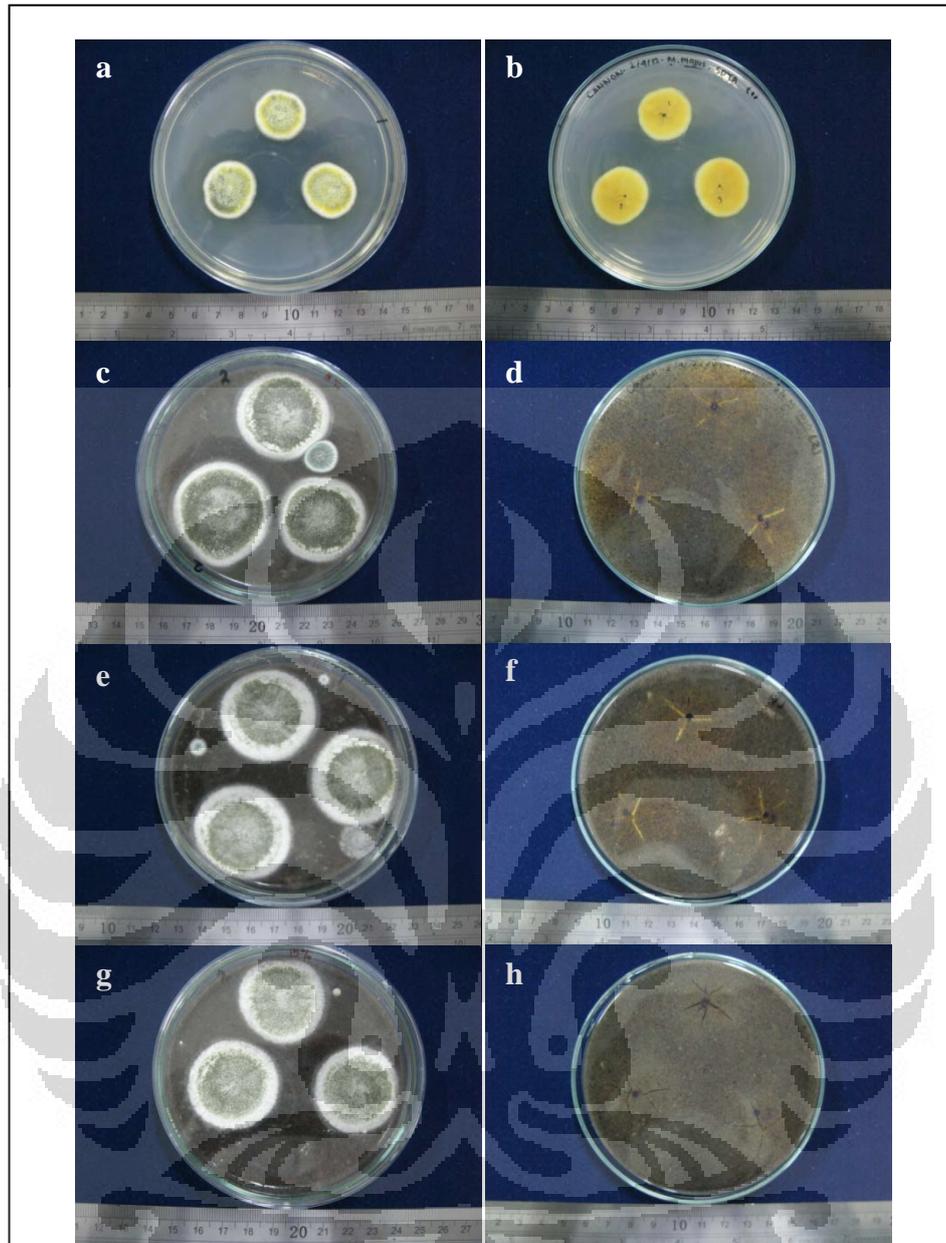
295 yang ditumbuhkan pada SDYA adalah *olive green*. Perbedaan warna koloni tersebut diduga disebabkan oleh kandungan karbohidrat, protein, dan lipid yang tinggi pada tepung jangkrik. Selain itu, tepung jangkrik diduga mengandung nutrisi yang sama dengan yang terkandung pada larva *O. rhinoceros*. Hal tersebut dibuktikan dengan persamaan warna *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan tepung jangkrik (Gambar 4.1.2) dan *M. majus* UICC 295 yang tumbuh pada kadaver larva (Gambar 4.2.4). Brennan dan Losel (1974: 121) menyatakan bahwa kandungan lipid pada konidia dapat memengaruhi pembentukan pigmen seperti karoten dan melanin. Selain itu, Hanson (2008: 127) menyatakan bahwa karbon memengaruhi pembentukan pigmen dari kelompok pigmen quinon pada fungi.

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

Medium	Diameter rata-rata (cm)
SDYA	19,06
SDYA dengan tepung jangkrik 5%	32,88
SDYA dengan tepung jangkrik 10%	33,88
SDYA dengan tepung jangkrik 15%	28,26



Gambar 4.1.2. Grafik persentase diameter koloni rata-rata *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) dibandingkan dengan kontrol umur 10 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap



Keterangan:

- a. Koloni pada SDYA
- b. Sebalik koloni pada SDYA
- c. Koloni pada SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 5% (b/v)
- d. Sebalik koloni pada SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 5% (b/v)
- e. Koloni pada SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 10% (b/v)
- f. Sebalik koloni pada SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 10% (b/v)
- g. Koloni pada SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 15% (b/v)
- h. Sebalik koloni pada SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 15% (b/v)

Gambar 4.1.3. Hasil pengamatan morfologi secara makroskopik *M. majus* UICC 295 pada SDYA umur 18 hari dan SDYA dengan tepung jangkrik 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) umur 10 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

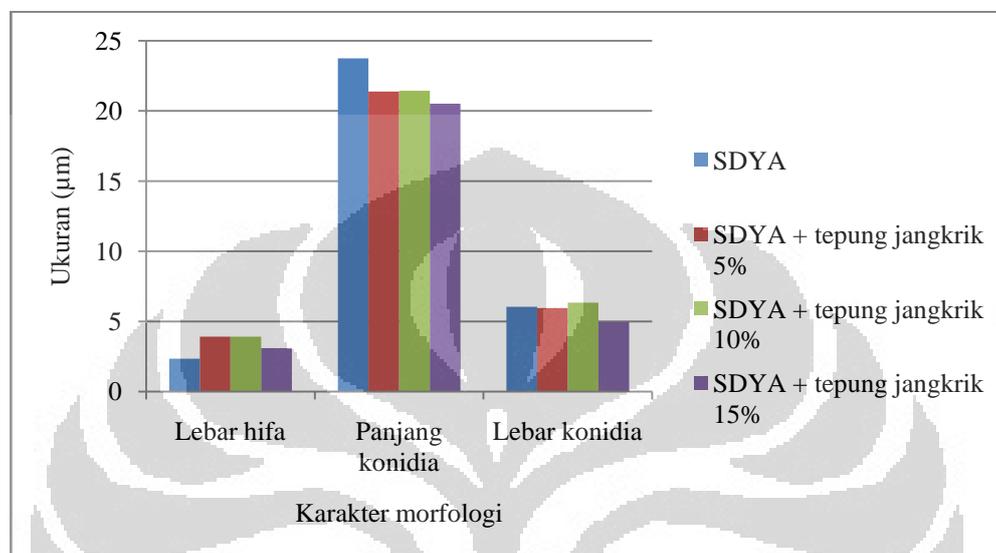
Penambahan tepung jangkrik juga memengaruhi ukuran hifa dan konidia *M. majus* UICC 295. Hasil pengamatan morfologi secara mikroskopik menunjukkan bahwa *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada SDYA dengan tepung jangkrik 10% (b/v) memiliki ukuran hifa dan konidia yang lebih besar dibandingkan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA (Tabel 4.1.3). Selain itu, *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada SDYA dengan tepung jangkrik 10% (b/v) memiliki ukuran hifa dan konidia yang lebih besar dibandingkan *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 5% (b/v) dan 15% (b/v) (Tabel 4.1.3).

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

Karakter Morfologi	SDYA	SDYA dengan penambahan tepung jangkrik			
		5% (b/v)	10% (b/v)	15% (b/v)	
Septa	Ada	Ada	Ada	Ada	
Cabang	Ada	Ada	Ada	Ada	
Hifa	Kisaran lebar (µm)	1,84--2,91	2,19--6,86	3,07--4,91	1,76--5,43
	Lebar rata-rata (µm) ± SD	2,34 ± 0,37	3,91 ± 1,17	3,91 ± 0,54	3,09 ± 0,94
Konidia	Bentuk	Silindris	Silindris	Silindris	Silindris
	Kisaran panjang (µm) ± SD	19,32--26,44	14,75--25,77	18,75--24,17	16,88--24,21
	Panjang rata-rata (µm) ± SD	23,75 ± 2,10	21,38 ± 2,64	21,44 ± 1,40	20,52 ± 1,86
	Kisaran lebar (µm) ± SD	4,60--7,49	4,39--7,02	4,41--8,07	3,93--6,24
	Lebar rata-rata (µm) ± SD	6,04 ± 0,73	5,95 ± 0,68	6,34 ± 0,97	4,96 ± 0,71

Hasil pengamatan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA memiliki hifa bercabang dan berseptum dengan lebar (1,84--2,91) µm dan konidia berbentuk silindris dengan ukuran (19,32--27,24) x (4,60--7,49) µm (Tabel 4.1.3). Hal tersebut menunjukkan bahwa ukuran konidia *M. majus* UICC 295 lebih besar dibandingkan deskripsi *M. majus* oleh Bischoff dkk. (2009). Selain itu, hasil pengamatan membuktikan bahwa ukuran konidia *M. majus* UICC 295 lebih besar dari ukuran konidia *M. anisopliae*. Berdasarkan Bischoff dkk. (2009: 524 & 526),

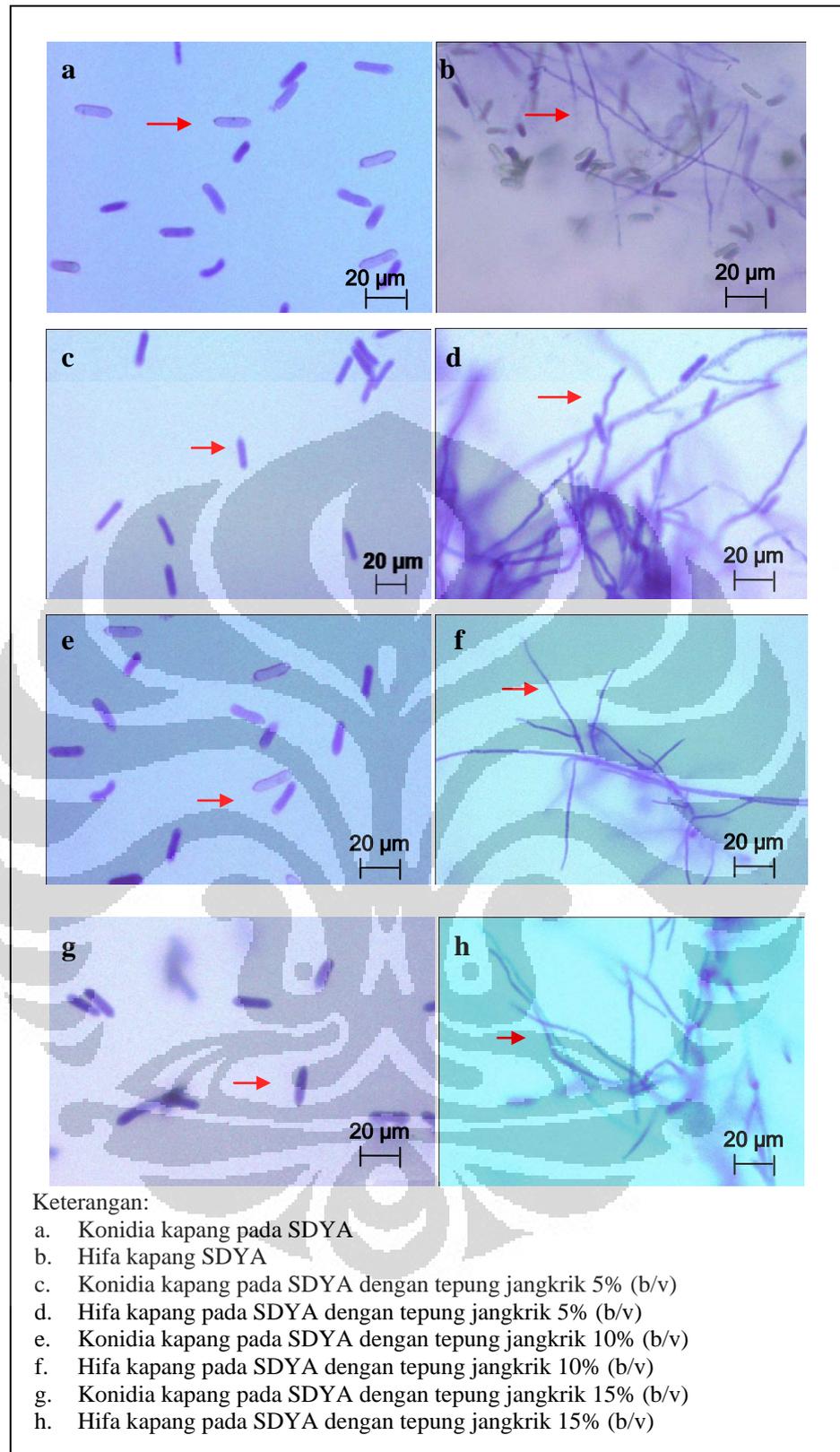
M. majus yang diisolasi dari tanah dan ditumbuhkan di medium SDYA selama 14 hari memiliki koloni berwarna *olive green*, miselium berwarna putih, dan konidia berbentuk silindris dengan ukuran (8,5--14,5) x (2,5--5,0) μm , sedangkan ukuran konidia *M. anisopliae* adalah (5,0--7,0) x (2,0--3,5) μm .



Gambar 4.1.4. Grafik ukuran hifa dan konidia *M. majus* UICC 295 pada SDYA umur dan pada SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) umur 10 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Hasil pengamatan morfologi kapang *M. majus* UICC 295 secara mikroskopik menunjukkan bahwa penambahan tepung jangkrik memengaruhi peningkatan ukuran rata-rata maupun kisaran dari panjang konidia, lebar konidia, dan lebar hifa. Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan ukuran panjang konidia dan lebar hifa pada penambahan tepung jangkrik 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v). Hasil uji Tukey menunjukkan bahwa ukuran panjang konidia dan lebar hifa *M. majus* UICC 295 pada medium dengan penambahan tepung jangkrik 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) berbeda nyata (Lampiran 11). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa penambahan tepung jangkrik memberikan pengaruh pada ukuran panjang konidia dan lebar hifa kapang *M. majus* UICC 295.



Gambar 4.1.5. Hasil pengamatan morfologi secara mikroskopik *M. majus* UICC 295 pada SDYA umur 21 hari dan SDYA dengan tepung jangkrik 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) umur 18 hari pada suhu 28° C dengan kondisi gelap

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Metarhizium majus UICC 295 yang ditumbuhkan pada SDYA dengan penambahan tepung jangkrik sebanyak 10% (b/v) memiliki ukuran hifa dan ukuran konidia yang lebih besar dibandingkan dengan *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 5% (b/v) dan 15% (b/v) (Gambar 4.1.5). Penambahan tepung jangkrik 10% (b/v) dapat meningkatkan ukuran hifa dan konidia karena medium pertumbuhan yang ditambahkan tepung jangkrik mengandung nutrisi yang dibutuhkan bagi kapang untuk tumbuh. Medium SDYA mengandung dekstrosa, pepton dan *yeast extract* yang merupakan sumber karbon dan nitrogen yang berperan pada pertumbuhan kapang. Berdasarkan Atlas (2010: 1), dekstrosa merupakan karbohidrat yang merupakan sumber karbon. Pepton merupakan protein yang mengandung nitrogen dan karbon. Ekstrak khamir (*yeast extract*) mengandung polisakarida, protein, glukosa, dan kitin yang merupakan sumber karbon dan nitrogen. Ekstrak khamir juga merupakan sumber vitamin yang berperan dalam pertumbuhan kapang. Berdasarkan Wang dkk. (2005: 669), tepung jangkrik mengandung protein, kitin dan lipid. Jangkrik mengandung protein sebesar 58,3%, kitin sebesar 8,7%, lipid sebesar 10,7% dan mineral seperti kalsium, magnesium, kalium, tembaga, dan fosfor. Berdasarkan Walker dan White (2005: 11), mineral pada medium berfungsi sebagai kofaktor enzim. Enzim berperan dalam sintesis biomolekul pembentuk struktur sel. Carlile dkk. (2001: 112) menyatakan bahwa pertumbuhan kapang ditandai dengan pemanjangan dinding sel hifa. Pemanjangan dinding sel hifa tersebut disebabkan oleh biosintesis kitin yang merupakan komponen pembentuk dinding sel dengan bantuan enzim kitin sintetase.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa penambahan tepung jangkrik 10% (b/v) dapat membantu pertumbuhan kapang dan produksi konidia. Hal tersebut diduga karena pengaruh kandungan nutrisi dari tepung jangkrik yang merupakan sumber karbon dan nitrogen. Karbon dan nitrogen merupakan makronutrien yang penting dalam pertumbuhan kapang. Karbon merupakan makromolekul esensial yang berperan dalam biosintesis karbohidrat, asam nukleat, protein, dan lipid. Selain protein dan karbohidrat, kadar lipid pada medium diduga memengaruhi pertumbuhan kapang karena lipid merupakan cadangan energi yang dibutuhkan dalam proses metabolisme kapang.

Berdasarkan Walker dan White (2005: 11), karbon dalam medium berperan besar dalam pembentukan lipid. Menurut Carlile dkk. (2001: 153--154), kelebihan karbon akan diakumulasi dalam bentuk alkohol, metabolit sekunder, ataupun lipid. Lipid yang terdapat pada konidia berfungsi sebagai cadangan energi metabolik sehingga ketika berada di lingkungan yang menguntungkan konidia akan lebih cepat bergerminasi. Berdasarkan Jackson dan Schisler (1992: 2264), *Colletotrichum truncatum* NRRL 13737 yang ditumbuhkan pada medium dengan rasio karbon:nitrogen (C:N) 30:1 dan 80:1 memiliki kadar lipid yang tinggi dan kerapatan konidia sebesar 10^7 konidia/ml. *Colletotrichum truncatum* yang ditumbuhkan pada medium dengan rasio C:N 10:1 memiliki kerapatan konidia sebesar 10^6 konidia/ml dengan kadar lipid yang rendah pada konidia.

Hasil pengamatan menunjukkan terjadi penurunan ukuran konidia dan ukuran hifa *M. majus* UICC 295 pada medium dengan penambahan tepung jangkrik 15% (b/v). Hal tersebut diduga karena konsentrasi protein, karbohidrat, dan lipid yang terdapat pada tepung berlebih sehingga menghambat pertumbuhan kapang. Kapang akan melakukan katabolisme sumber nutrisi menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana dan menghasilkan energi. Semakin tinggi konsentrasi nutrisi yang dikatabolisme, maka akan semakin banyak katabolit yang dihasilkan. Katabolit yang berlebih akan menghambat sintesis enzim-enzim hidrolitik yang dibutuhkan kapang untuk proses degradasi substrat. Herlinda dkk. (2006: 75) menyatakan bahwa pemberian sumber karbon dan nitrogen berlebih dapat menghambat pertumbuhan dan viabilitas kapang. Viabilitas dan produksi konidia *B. bassiana* menurun saat ditambahkan tepung jangkrik dengan konsentrasi berlebih. Hal tersebut terjadi karena terdapat penumpukan metabolit sekunder pada medium sehingga menghambat pertumbuhan *B. bassiana*. Moat dkk. (2002: 10) menyatakan bahwa apabila metabolit yang dihasilkan oleh kapang berlebih, maka proses sintesis enzim hidrolitik yang dibutuhkan kapang dalam mendegradasi substrat dapat terhambat. Hal tersebut mengakibatkan produksi enzim terhambat sehingga proses degradasi substrat berhenti.

Hasil menunjukkan bahwa penambahan tepung jangkrik dengan konsentrasi 10% (b/v) merupakan konsentrasi yang paling baik bagi pertumbuhan kapang. Oleh karena itu, *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium

SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 10% (b/v) digunakan pada pengujian suspensi kapang dalam menginfeksi larva.

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

Kerapatan sel konidia/hifa kapang yang diaplikasikan pada larva dapat menentukan tingkat keberhasilan infeksi kapang pada larva. Jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 umur enam hari pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 10% (b/v) masing-masing berkisar $(6,20--7,00) \times 10^6$ CFU/ml dan $(1,75--4,3) \times 10^7$ CFU/ml. Selain itu, dilakukan juga perhitungan jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 umur 23 hari pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 10% (b/v) dengan menggunakan hemositometer. Jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 umur 23 hari pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 10% (b/v) dengan menggunakan hemositometer masing-masing adalah $8,7 \times 10^6$ konidia/ml dan $1,6 \times 10^7$ konidia/ml. Hasil perhitungan dengan hemositometer kemudian digunakan untuk aplikasi. Berdasarkan Gopal dkk. (2006: 1804), jumlah konidia *M. anisopliae* sebanyak 10^5 konidia/10 gram substrat mampu membunuh larva *O. rhinoceros* dalam waktu delapan hari. Berdasarkan Prayogo dkk. (2005: 22), jumlah konidia *M. anisopliae* sebanyak 10^7 konidia/ml sudah mampu membunuh *Spodoptera litura*.

Aplikasi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 dilakukan selama tiga hari berturut-turut dan pengamatan dilakukan selama 15 hari. Hal tersebut dilakukan agar semakin banyak jumlah konidia/hifa yang dapat menempel pada permukaan tubuh larva. Menurut Prayogo dkk. (2005: 22--23), aplikasi kapang *M. anisopliae* sebanyak satu kali mampu membunuh *S. litura* hingga 40%, sedangkan aplikasi *M. anisopliae* sebanyak tiga kali berturut-turut selama tiga hari mampu meningkatkan kematian *S. litura* hingga 83%.

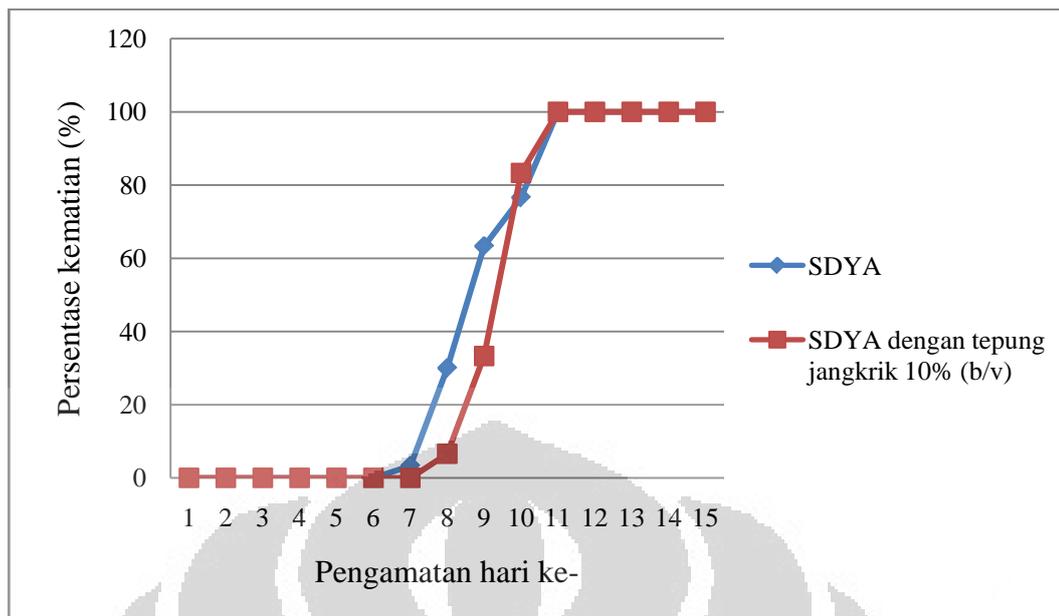
Suhu dan kelembaban pada ruang inkubasi larva diatur agar kapang *M. majus* UICC 295 dapat tumbuh dengan baik. Suhu ruangan berkisar $(27,1^{\circ}--28,4^{\circ})$ C dan kelembaban ruangan berkisar $(74--91)\%$. Suhu dan kelembaban

sangat mempengaruhi pertumbuhan kapang entomopatogen. Prayogo (2005: 20--21) menyatakan bahwa kelembaban udara yang tinggi dibutuhkan untuk germinasi propagul kapang. Suhu yang ideal bagi pertumbuhan *M. anisoplae* berkisar 22°--27° C dan kelembaban yang ideal adalah diatas 86%. *Metarhizium anisopliae* yang ditumbuhkan pada ruang dengan kelembaban kurang dari 86% akan mengalami penurunan kemampuan menginfeksi inang.

Seluruh larva pada kelompok perlakuan mengalami kematian 100%. Kelompok larva yang diaplikasikan menggunakan konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada SDYA mengalami kematian 3,3% mulai hari ke-7 hingga 100% pada hari ke-11. Kelompok larva yang diaplikasikan menggunakan konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan tepung jangkrik 10% (b/v) mengalami kematian 6,6% mulai hari ke-8 hingga 100% pada hari ke-11. Larva pada kelompok kontrol tidak mengalami kematian.

Tabel 4.2.2. Persentase jumlah larva yang mati selama 11 hari pengamatan pada pengujian suspensi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol

Pengamatan hari ke-	SDYA		SDYA dengan tepung jangkrik 10% (b/v)	
	Σ larva mati	persentase kematian (%)	Σ larva mati	persentase kematian (%)
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	1	3,3	0	0
8	8	30	2	6,6
9	10	63,3	8	33,3
10	4	76,6	15	83,3
11	7	100	5	100

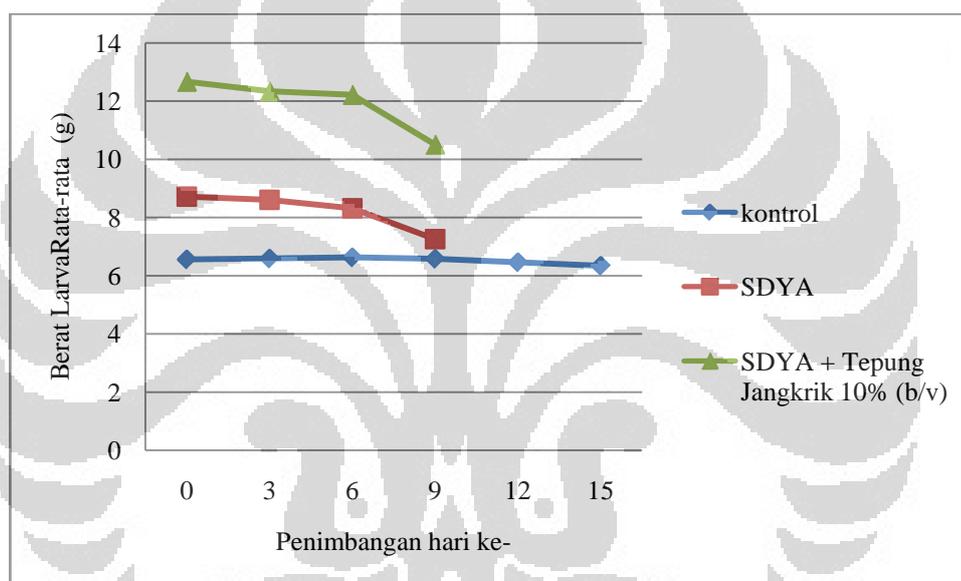


Gambar 4.2.1. Grafik persentase kematian larva *O. rhinoceros* setiap hari selama 15 hari pengamatan setelah pengujian suspensi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 dari SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 10%

Gejala awal infeksi kapang pada larva ditandai dengan warna tubuh yang menjadi kusam, gerakan larva yang menjadi lambat, penurunan napsu makan, dan timbulnya bercak cokelat pada tubuh larva. Gerakan larva yang menjadi lambat disebabkan oleh penurunan napsu makan. Berat larva yang masih hidup pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan juga mengalami penurunan. Penurunan napsu makan dan berat badan tersebut diduga akibat dari terganggunya aktivitas penyerapan nutrisi oleh larva karena kapang yang telah melakukan penetrasi ke dalam tubuh larva menyerap nutrisi dari tubuh larva. Selain itu, penurunan napsu makan juga disebabkan oleh terganggunya kerja otot pencernaan akibat destruksi yang dihasilkan oleh kapang. Destruksi mengakibatkan kelumpuhan otot pencernaan, sehingga larva tidak dapat menyerap nutrisi dengan baik. Menurut Prayogo (2005: 21), kapang akan menyerap cairan tubuh larva sebagai sumber nutrisi sehingga metabolisme larva terhambat dan dapat menyebabkan kematian. Selain itu, Male dkk. (2009: 1447--1448) menyatakan bahwa infeksi kapang juga dapat disebabkan oleh destruksi yang dihasilkan oleh kapang. Destruksi merupakan toksin neuromuskular yang dapat menginduksi depolarisasi membran otot sehingga menyebabkan kelumpuhan otot

serangga tersebut. Destruksin menyebabkan terjadinya peningkatan konsentrasi ion Ca^{2+} pada miofibril sehingga terjadi kontraksi otot secara terus menerus.

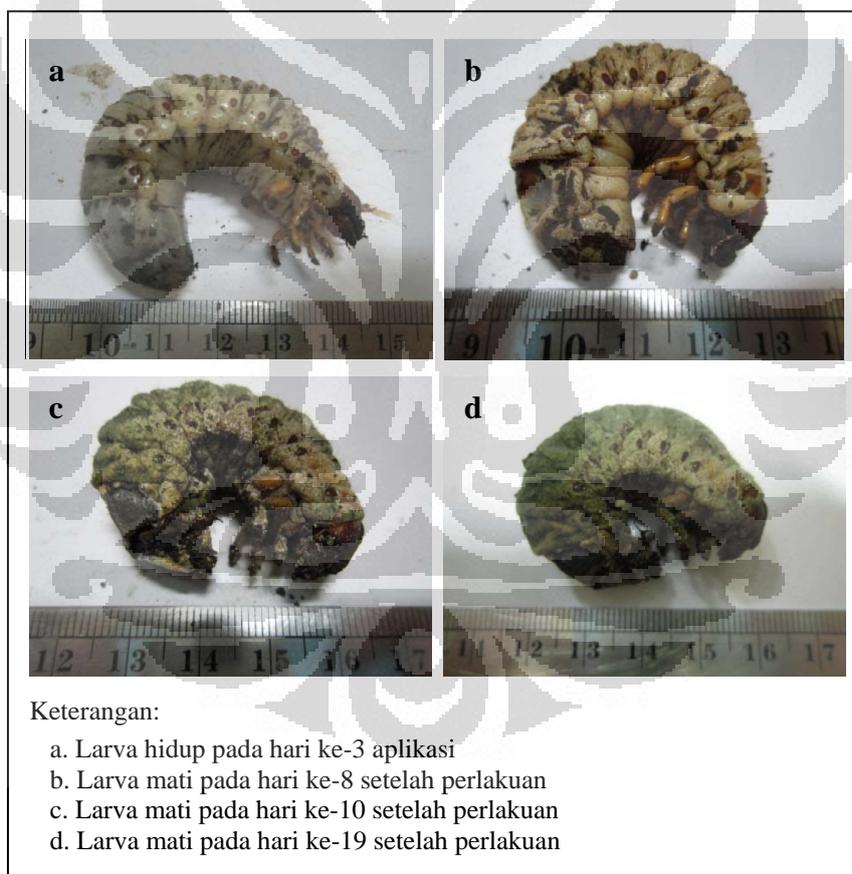
Infeksi kapang juga dapat menyebabkan timbulnya bercak cokelat. Bercak cokelat yang timbul pada tubuh larva merupakan respon pertahanan tubuh larva. Bercak cokelat tersebut merupakan melanin yang dapat terlihat pada bagian punggung, dekat anus, dan perut larva. Samson dkk. (1988: 135--137) menyatakan bahwa bercak cokelat timbul akibat aktivitas enzim fenol oksidase mengkatalisis reaksi hidrosilasi monofenol dalam tubuh serangga menjadi quinon yang kemudian berpolimerasi menjadi melanin.



Gambar 4.2.2. 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 jangkrik 10% (b/v)

Larva *O. rhinoceros* yang diaplikasikan dengan konidia/hifa *M. majus* UICC 295 dari medium SDYA mulai mengalami kematian pada hari ke-7. Tubuh larva yang mati mulai mengeras. Hifa putih dapat terlihat pada permukaan punggung larva mati pada hari pertama setelah kematian. Kapang bersporulasi pada hari ke-6 setelah kematian. Larva *O. rhinoceros* yang diaplikasikan dengan konidia/hifa *M. majus* UICC 295 dari medium SDYA dengan penambahan tepung jangkrik mulai mengalami kematian pada hari ke-8. Tubuh larva yang mati mulai mengeras dan berwarna kusam. Pada hari pertama setelah kematian, tubuh larva

mulai mengkerut dan hifa putih dapat terlihat pada bagian punggung. Kapang mulai bersporulasi pada hari ke-9 setelah larva mati. Sepuluh hari setelah larva mati konidia kapang telah menutupi seluruh permukaan tubuh larva dan tubuh larva mengeras seperti mumi. Sambiran dan Hosang (2007: 7) menyatakan bahwa proses kematian larva akibat *M. anisopliae* dimulai dengan perubahan warna tubuh larva dari putih menjadi kusam. Gerakan larva melambat dikarenakan tubuh larva mulai mengeras. Larva kemudian mati dan mengeras seperti mumi. Dua hari setelah kematian terlihat pertumbuhan hifa kapang pada permukaan tubuh larva. Beberapa hari kemudian permukaan tubuh larva tertutupi oleh konidia *M. anisopliae* yang berwarna hijau.



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

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Penambahan tepung jangkrik sebanyak 10% (b/v) pada medium pertumbuhan memengaruhi kemampuan *M. majus* UICC 295 dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros*. Larva yang diaplikasikan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 10% mengalami kematian 100% dalam waktu 4 hari, lebih cepat sehari dibandingkan larva yang diaplikasikan dengan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA, yaitu mengalami kematian 100% dalam waktu 5 hari.

Kematian larva yang lebih cepat setelah diaplikasikan dengan *M. majus* UICC 295 pada tepung jangkrik 10% (b/v) diduga karena konidia bergerminasi lebih cepat dibandingkan *M. majus* UICC 295 pada SDYA. Kecepatan germinasi konidia dapat memengaruhi kecepatan kapang *M. majus* UICC 295 menginfeksi inangnya. Kecepatan germinasi dipengaruhi oleh kandungan nutrisi pada medium. Medium SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 10% (b/v) memiliki kadar protein, lipid, kitin, dan mineral yang lebih tinggi dibandingkan dengan medium SDYA tanpa penambahan tepung jangkrik. Kadar protein, lipid, kitin, dan mineral yang tinggi pada tepung jangkrik dapat memicu germinasi konidia yang semakin cepat. Hal tersebut dapat terjadi karena molekul-molekul tersebut merupakan sumber karbon dan nitrogen yang berperan penting dalam pembentukan struktur sel saat proses germinasi konidia. Germinasi konidia ditandai dengan pemanjangan dinding sel konidia yang kemudian membentuk hifa. Kecepatan germinasi konidia akan memengaruhi kecepatan infeksi. Semakin cepat konidia bergerminasi, maka semakin cepat proses infeksi. Prayogo (2006: 48) menyatakan bahwa kecepatan germinasi konidia sangat penting dalam menginfeksi inang. Pergantian kulit serangga dan perubahan stadium instar yang cepat memengaruhi perilaku dan mekanisme pertahanan diri serangga terhadap kapang entomopatogen. Semakin cepat konidia bergerminasi, maka akan semakin cepat kapang entomopatogen menginfeksi inangnya.

Penambahan tepung jangkrik sebanyak 10% (b/v) pada medium pertumbuhan juga memengaruhi produksi enzim-enzim proteolitik dan kitinolitik pada kapang *M. majus* UICC 295. Enzim-enzim tersebut berperan penting dalam proses infeksi. Kadar protein dan kitin pada medium dengan penambahan tepung jangkrik 10% (b/v) dapat menginduksi produksi enzim protease dan kitinase.

Selain itu, kadar mineral yang tinggi pada tepung jangkrik berperan sebagai kofaktor enzim-enzim hidrolitik pada fungi. Walker dan White (2005: 11) menyatakan bahwa, mineral pada medium berfungsi sebagai kofaktor enzim. Herlinda dkk. (2006:70 & 73) menyatakan bahwa, tepung jangkrik mengandung kitin dan protein yang dapat merangsang pembentukan protease dan kitinase pada kapang entomopatogen. Enzim protease dan kitinase sangat penting bagi kapang entomopatogen dalam proses degradasi kutikula serangga. Kadar enzim protease dan kitinase yang tinggi dapat mempercepat degradasi kutikula serangga. Matsumoto (2006: 296) menyatakan bahwa sintesis kitinase ekstraseluler pada *M. anisopliae* dan *B. bassiana* diregulasi oleh mekanisme induksi-represi. Ratledge (2006: 48--50) menyatakan bahwa, mekanisme induksi terjadi apabila terdapat nutrisi yang dibutuhkan kapang untuk pertumbuhan. Nutrisi tersebut kemudian akan menginduksi produksi enzim hidrolitik untuk degradasi substrat. Mekanisme represi terjadi apabila kapang menghasilkan metabolit dari hasil metabolisme nutrisi. Metabolit tersebut kemudian akan menghambat sintesis enzim sehingga enzim tidak disintesis.

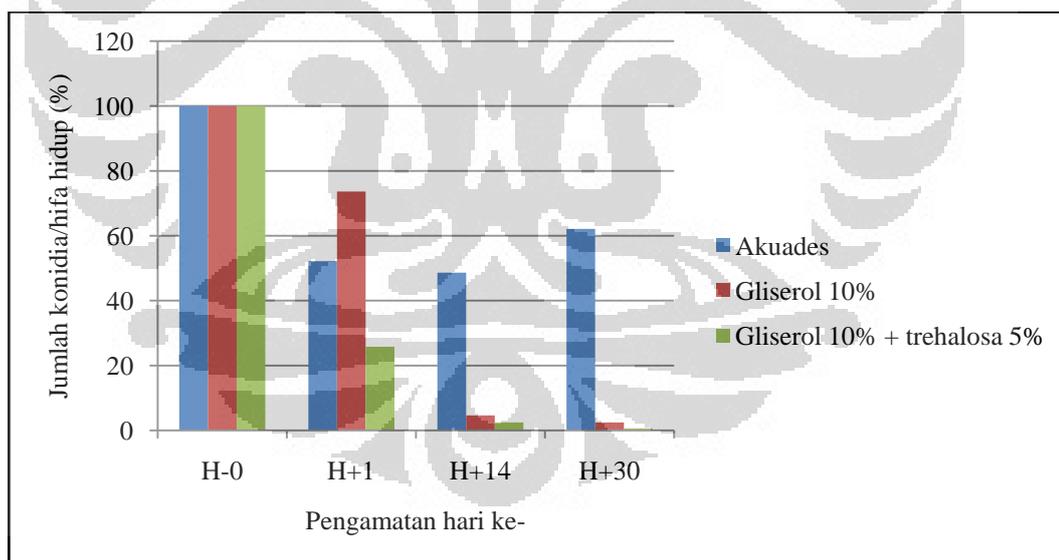
Hasil pengujian menunjukkan bahwa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 10% (b/v) mampu membunuh larva *O. rhinoceros* 100% dalam 11 hari. Hal tersebut menunjukkan bahwa medium dengan SDYA dengan penambahan tepung jangkrik dapat dijadikan bahan tambahan pada medium SDYA, sehingga medium pertumbuhan yang baik untuk *M. majus* UICC 295 dapat diperoleh dengan biaya rendah.

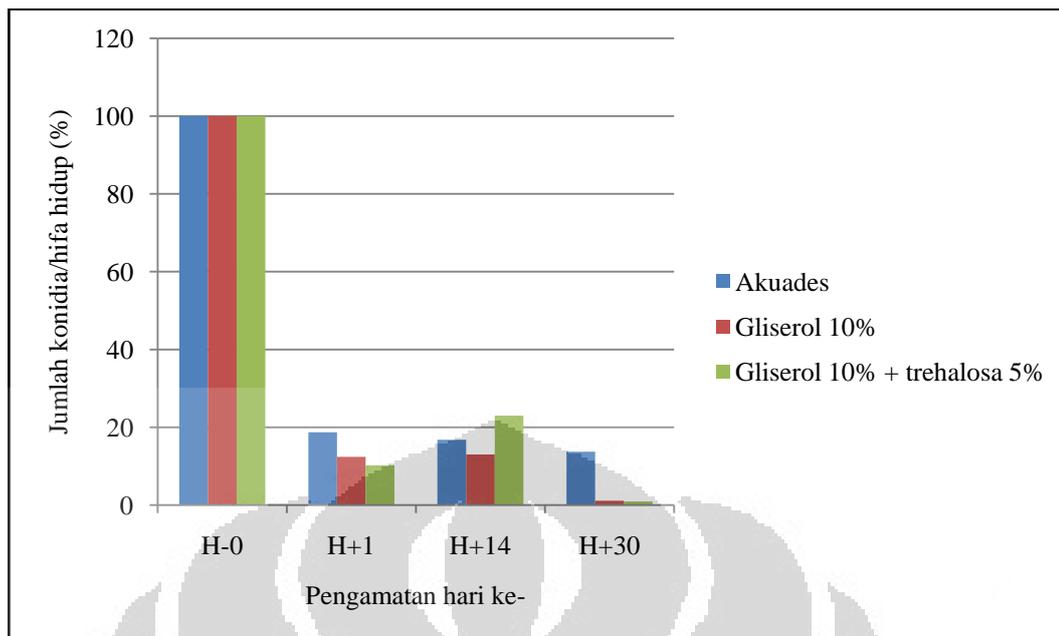
4.3 PRESERVASI KAPANG

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA tetap dapat tumbuh setelah preservasi selama 30 hari, baik menggunakan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan trehalosa 5% (b/v), maupun menggunakan akuades (kontrol) walau terlihat penurunan viabilitas. Jumlah konidia/hifa hidup pada medium berkisar 10^5 -- 10^6 CFU/ml. Kapang *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 10% (b/v) juga tetap viabel setelah preservasi selama 30 hari.

Tabel 4.3.7. Hasil perhitungan jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 setelah preservasi

<i>M. majus</i> UICC 295	<i>Cryoprotectant</i>	Σ konidia/hifa hidup (CFU/ml)				Σ konidia/hifa hidup (%)		
		(H ₀)	(H ₁)	(H ₁₄)	(H ₃₀)	(H ₁)	(H ₁₄)	(H ₃₀)
SDYA	Akuades (Kontrol)	5,04 x 10 ⁶	2,63 x 10 ⁶	2,45 x 10 ⁶	3,13 x 10 ⁶	52,18	48,61	62,10
	Gliserol 10% (v/v)	5,04 x 10 ⁶	3,71 x 10 ⁶	2,34 x 10 ⁵	1,24 x 10 ⁵	73,61	4,64	2,46
	Gliserol 10% (v/v) dengan trehalosa 5% (b/v)	5,04 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶	4,67 x 10 ⁴	3,23 x 10 ⁴	25,79	0,92	0,64
SDYA dengan tepung jangkrik 10%	Akuades (Kontrol)	2,5 x 10 ⁷	4,68 x 10 ⁶	4,2 x 10 ⁶	3,44 x 10 ⁶	18,7	16,8	13,7
	Gliserol 10% (v/v)	2,5 x 10 ⁷	3,11 x 10 ⁶	3,25 x 10 ⁶	2,76 x 10 ⁵	12,4	13	1,1
	Gliserol 10% (v/v) dengan trehalosa 5% (b/v)	2,5 x 10 ⁷	2,56 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁶	2,37 x 10 ⁵	10,24	23	0,9

Gambar 4.3.1 Grafik persentase jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi menggunakan akuades, gliserol 10% (v/v), dan gliserol 10% (v/v) dengan trehalosa 5% (b/v)



Gambar 4.3.2 Grafik persentase jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan tepung jangkrik 10% (b/v) setelah preservasi menggunakan akuades, gliserol 10% (v/v), dan gliserol 10% (v/v) dengan trehalosa 5% (b/v)

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kapang *M. majus* UICC 295 dapat tetap hidup setelah dipreservasi pada suhu -80°C dengan akuades. Diduga kapang dapat menghasilkan *compatible solute*, sehingga kapang dapat bertahan pada perubahan suhu dan perubahan tekanan osmotik saat dimasukkan ke dalam lemari pendingin. *Compatible solute* akan mengakibatkan tekanan osmotik di dalam sel lebih tinggi dibandingkan tekanan di luar sel, sehingga keadaan di dalam sel menjadi hipertonic. Namun demikian, selama proses *freezing*, akuades akan membeku sehingga tekanan osmotik di luar sel meningkat mengakibatkan keadaan yang isotonic. Berdasarkan Madigan dkk. (1997: 510) *compatible solute* merupakan zat terlarut yang dihasilkan di dalam sel untuk menyesuaikan aktivitas air di sitoplasma. Berdasarkan Dunlap dkk. (2011: 114), *compatible solute* berperan sebagai osmoprotektan sehingga kapang dapat tetap bertahan pada perubahan tekanan osmotik. *Compatible solute* umumnya merupakan karbohidrat dan poliol seperti trehalosa, manitol, gliserol, dan sorbitol. Bhandal dkk. (1985: 430) menyatakan bahwa gula sakarida seperti trehalosa mampu menjaga struktur membran sel dengan cara mengganti fungsi air di dalam membran dan menjaga

tekanan osmotik di luar membran. Arraes dkk. (2005: 296) menyatakan bahwa trehalosa juga dapat melindungi kapang dari perubahan lingkungan seperti pH, tekanan, suhu, kelembaban, dan senyawa kimia.

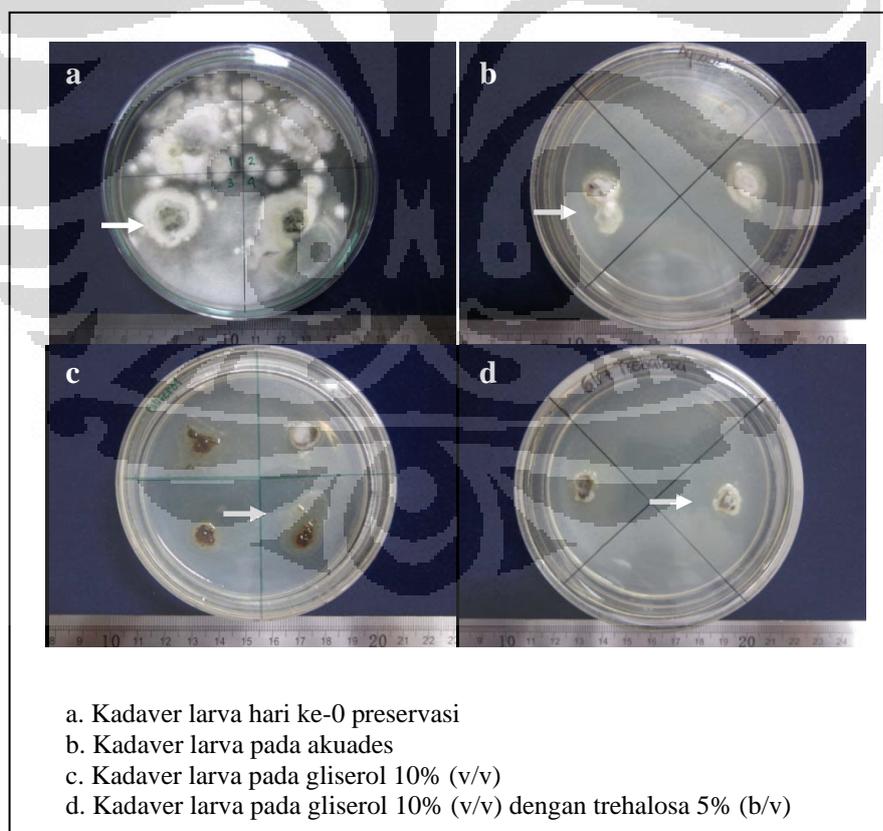
Hasil pengamatan membuktikan bahwa pemberian *cryoprotectant* mampu melindungi kapang yang dipreservasi pada -80°C . Nakasone dkk. (2006: 37 & 41) menyatakan bahwa, gliserol merupakan *cryoprotectant penetrating agents* yang dapat mencegah kerusakan akibat kristal es secara ekstraseluler dan intraseluler. *Cryoprotectant penetrating agents* mampu mencegah pembentukan kristal es tajam sehingga struktur membran sel tetap terjaga. Gliserol dapat menggantikan peran air di dalam sel dan menjaga volume sel.

Penurunan viabilitas pada kapang *M. majus* UICC 295 yang dipreservasi menggunakan protektan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan trehalosa 5% (b/v) dapat terjadi karena *osmotic shock*. Diduga sel belum sempat menghasilkan *compatible solute* saat dimasukkan ke dalam lemari pendingin, sehingga kerusakan akibat *osmotic shock* tidak dapat dicegah. Selain itu, diduga pemberian gliserol mengakibatkan konsentrasi larutan di luar sel meningkat sehingga keadaan lingkungan menjadi hipertonik. Berdasarkan Walker dan White (2005: 27) *osmotic shock* terjadi akibat perbedaan tekanan osmotik di dalam dan luar sel. Terdapat dua jenis *osmotic shock*, yaitu *hyper-osmotic shock* dan *hypo-osmotic shock*. *Hyper-osmotic shock* terjadi apabila tekanan osmotik di luar sel lebih rendah dibandingkan di dalam sel. *Hypo-osmotic shock* terjadi apabila tekanan osmotik di luar sel lebih tinggi dari tekanan di dalam sel. *Hyper-osmotic shock* dapat mengakibatkan sel mengalami krenasi dan *hypo-osmotic shock* dapat mengakibatkan sel lisis.

Penurunan viabilitas pada kapang *M. majus* UICC 295 yang dipreservasi menggunakan protektan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan trehalosa 5% (b/v) juga dapat terjadi karena waktu ekuilibrisasi gliserol yang cepat. Diduga waktu yang dibutuhkan gliserol tidak cukup untuk penetrasi ke dalam sel sebelum dimasukkan ke dalam lemari pendingin. Hal tersebut mengakibatkan gliserol tidak dapat melindungi sel dari *osmotic shock* dan pembentukan kristal es tajam di dalam sel. Selain itu, penetrasi gliserol yang lama mengakibatkan tekanan osmotik pada lingkungan meningkat sehingga lingkungan menjadi

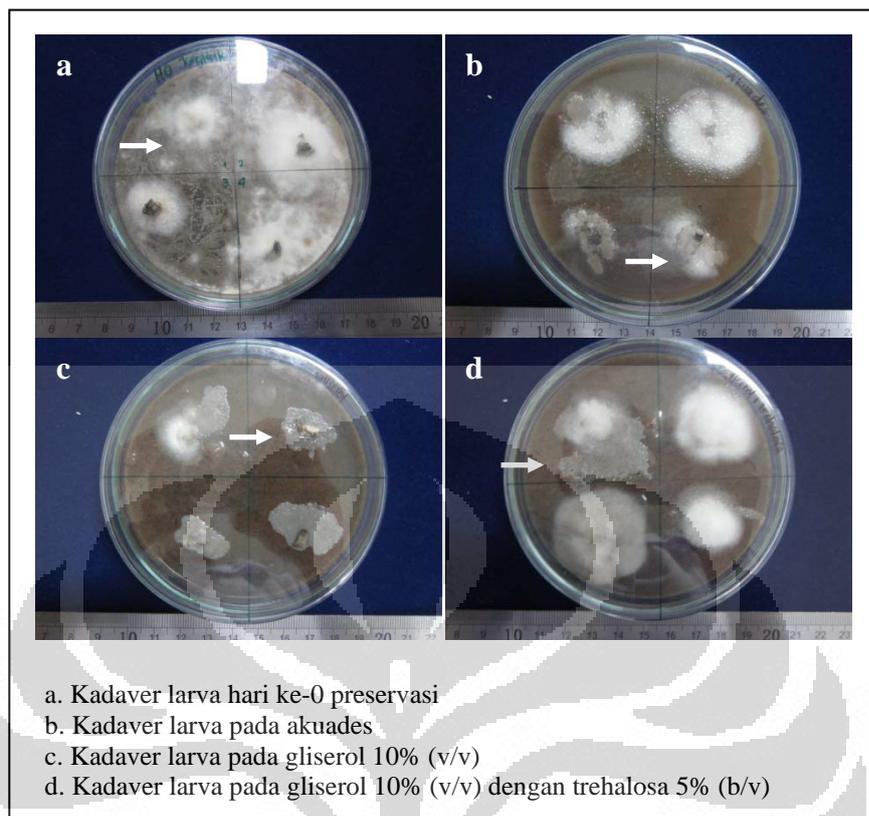
hipertonis. Hallsworth dan Magan (1996: 2440) menyatakan bahwa setiap *cryoprotectant* membutuhkan waktu yang berbeda untuk dapat penetrasi dengan baik ke dalam sel. Hubalek (2003: 206) menyatakan bahwa, gliserol merupakan *slow penetrating cryoprotectant* sehingga membutuhkan waktu yang lama bagi protektan tersebut untuk dapat masuk ke dalam sel. Gliserol membutuhkan waktu 100 menit dengan suhu 37° C untuk penetrasi ke dalam sel *Trichomonas vaginalis* Donne.

Hasil pengamatan preservasi *M. majus* UICC 295 bersama kadaver larva *O. rhinoceros* yang dilakukan selama satu hari menunjukkan bahwa terlihat adanya pertumbuhan *M. majus* UICC 295 ketika ditumbuhkan pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 10% (b/v). Namun demikian, terlihat juga pertumbuhan kontaminan yang cukup pesat. Hasil pengamatan morfologi secara makroskopik menunjukkan pertumbuhan hifa dari kontaminan dan juga pertumbuhan khamir pada medium.



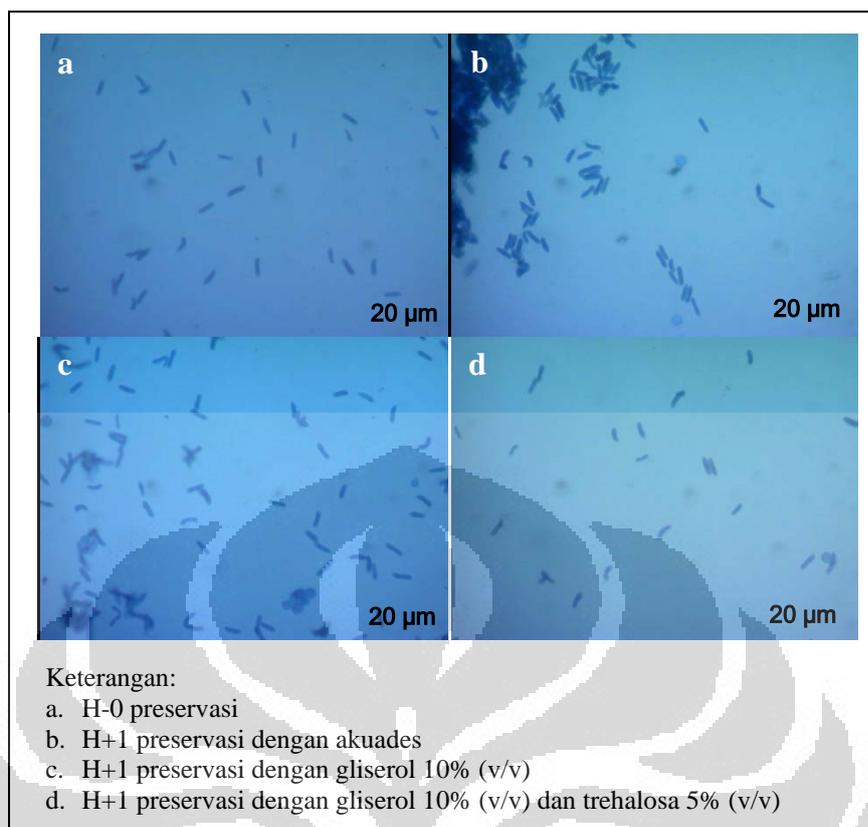
Gambar 4.3.3. Kontaminan pada koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi satu hari dengan kadaver larva

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.3.4. Kontaminan pada koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan tepung jangkrik 10% (b/v) setelah preservasi satu hari dengan kadaver larva [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Hasil pengamatan secara mikroskopik menunjukkan bahwa terdapat konidia *M. majus* UICC 295 maupun kontaminan pada kadaver. Hal tersebut disebabkan larva *O. rhinoceros* merupakan substrat alami bagi *M. majus* UICC 295 maupun kapang lainnya. Beberapa jenis kapang entomopatogen dapat viabel jika dipreservasi bersama inang alami. Nakasone dkk. (2006: 39 & 40) menyatakan bahwa kapang-kapang patogen dapat disimpan bersama potongan tubuh inangnya. Kapang *Pyrenochaeta* De Not. dan *Thielaviopsis* Went tetap viabel setelah disimpan bersama akar tanaman yang merupakan inangnya.



Gambar 4.3.5. Konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan tepung jangkrik 10% (b/v) pada kadaver larva

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Penambahan tepung jangkrik pada medium pertumbuhan telah terbukti dapat meningkatkan pertumbuhan kapang *M. majus* UICC 295. Selain itu, penambahan tepung jangkrik juga dapat meningkatkan kemampuan kapang *M. majus* UICC 295 dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros*. Preservasi konidia/hifa dan *M. majus* UICC 295 pada kadaver pada suhu -80°C dengan penambahan *cryoprotectant* terbukti mampu mempertahankan viabilitas kapang. Hasil penelitian ini diharapkan mampu menghasilkan medium pertumbuhan *M. majus* yang murah, mudah didapat dan sebagai alternatif medium pertumbuhan, sehingga penggunaan kapang *M. majus* sebagai bioinsektisida bagi hama *O. rhinoceros* dapat dimanfaatkan lebih baik.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

1. Konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada SDYA dapat membunuh larva *O. rhinoceros* 3,3%--100% dalam waktu 7--11 hari. Konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan penambahan tepung jangkrik 10% (b/v) dapat membunuh larva *O. rhinoceros* 6,6%--100% dalam waktu 8--11 hari.
2. Preservasi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 selama 30 hari pada suhu -80° C dalam protektan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan trehalosa 5% (b/v) mampu mempertahankan viabilitas kapang.
3. Preservasi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 bersama kadaver larva selama satu hari pada suhu -80° C dalam protektan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan trehalosa 5% (b/v) mampu mempertahankan viabilitas kapang.

5.2 SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengujian kemampuan *M. majus* UICC 295 dari medium SDYA dengan penambahan tepung jangkrik dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros* untuk mengetahui potensi *M. majus* UICC 295 sebagai bioinsektisida pada skala lapangan.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai metode preservasi yang sesuai dalam preservasi *M. majus* UICC 295 dan *M. majus* UICC 295 pada cadaver untuk mengetahui pengaruh preservasi terhadap viabilitas kapang *M. majus* UICC 295.

DAFTAR REFERENSI

- Arraes, F.B.M., B. Benoliel, R.T. Burtet, P.L.N. Costa, A.S. Galdino, L.H.A. Lima, C.M. Silva, L.O. Pereira, P. Pfrimer, L.P. Silva, V.C.B. Reis, & M.S.S. Felipe. 2005. General metabolism of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Genetics and Molecular Research* **4**(2): 290--308.
- Atlas, R.M. 2010. *Microbiological media*. 4th ed. CRS Press, Boca Raton: iii + 2036 hlm.
- Benson. 2001. *Microbiological application laboratory manual*. 8th ed. The McGraw-Hill, New York: xi + 478 hlm.
- Bhandal, I.S., R.M. Hauptmann, & J.M. Widholm. 1985. Trehalose as cryoprotectant for the freeze preservation of carrot and tobacco cells. *Plant Physiology* **78**: 430--432.
- Bidochka, M.J. & C.L. Small. 2005. Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. Dalam: Vega, F.E. & M. Blackwell. 2005. *Insect-fungal association: ecology and evolution*. Oxford University Press, New York: xvii + 333 hlm.
- Bischoff, J.F., S.A. Rehner & R.A. Humber 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* **101**: 512—530.
- Cappuccino, J.G. & N. Sherman. 1996. *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.
- Deacon, J.W. 2006. *Fungal biology*. 4th ed. Blackwell Publishing, Ltd., England: 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*

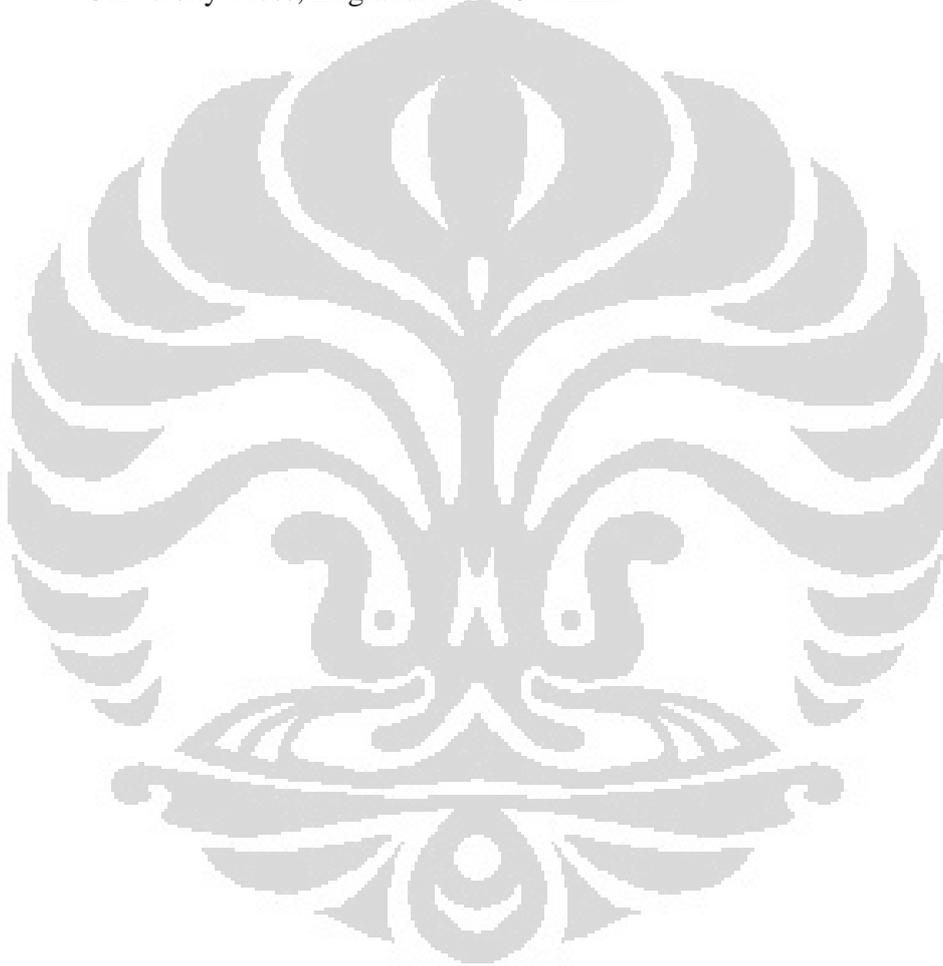
- gestroi WASMANN (Isoptera: Rhinotermitidae) dengan metode kontak dan umpan. *Jurnal Ilmu & Teknologi Kayu Tropis* **5**(2):68--77.
- Digital. 2008. Colour chart for Faber Castell polychromos pencils and pastels. <http://www.drawinganddrafting.com/au/category2471.htm>, 20 April 2012, pk. 22.35.
- Dunlap, C.A., M.A. Jackson, & B.C. Saha. 2011. Compatible solute of sclerotia of *Micoleptodiscus terrestris* under different culture and drying condition. *Biocontrol Science and Technology* **21**(1): 113--123.
- Foster, R.N., S. Jaronski, K.C. Reuter, L.R. Black, & R. Schlothauer. 2010. Explaining mycoinsecticide activity: poor performance of spray and bait formulations of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum* against Mormon cricket in field cage studies. *Journal of Orthoptera Research* **19**(2): 303--313.
- Gandjar, I., W. Sjamsuridzal, & A. Oetari. 2006. *Mikologi: Dasar dan terapan*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta: xii + 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.
- Hallsworth, J.E. & N. Magan. 1996. Culture age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose on fungal propagules. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**(7): 2435--2442.
- Hanson, J.R. 2008. *The chemistry of fungi*. The Royan Society of Chemistry, Cambridge: xi + 221 hlm.
- 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.). *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika* **6**(2): 70--78.

- Hirsch, L. & J. Grund. 2010. The potential of entomopathogenic fungal isolates as an environmentally friendly management option against *Acanthoscelides obtectus*. Paper Departemen Holtikultura Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp: 26 hlm.
- Hogg, S. 2005. *Essential microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd., England: xi + 468 hlm.
- Hubalek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* **46**: 205--229.
- Ihsan, F. & L. Octriana. 2009. Teknik pengujian efektivitas jamur entomopatogen *Beauveria bassiana* pada media pembawa substrat beras dan jangung untuk mengendalikan lalat buah semilapang. *Buletin Teknik Pertanian* **14**(2): 62--64.
- Irianto, K. 2006. *Mikrobiologi: Mengungkap dunia mikroorganisme*. Jilid 2. Penerbit Yrama Widya, Bandung: 304 hlm.
- Jackson, M. A. & D. A. Schisler. 1992. The composition and attributes of *Colletotrichum truncatum* spores are altered by the nutritional environment. *Applied and Environmental Microbiology* **58**(7): 2260--2265.
- 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.
- Leger, R. J. St., M. J. Bidochka, & D. W. Roberts. 1994. Germination triggers of *Metarhizium anisopliae* conidia are related to host species. *Microbiology* **140**: 1651--1660.
- Liu, Z.Y., Z.Q. Liang, A. J.S. Whalley, Y.J. Yao, & A.Y. Liu. 2001. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *Journal of Invertebrate Pathology* **78**: 178--182.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, D.A. Stahl, & D.P. Clark. 1997. *Brock microbiology of microorganisms*. 8th ed. Pearson Education Inc., California: xxviii + 1043 hlm.

- Male, K.B., Y. M. Tzeng, J. Montes, B.L. Liu, W.C. Liao, A. Kamen, & J.H.T. Luong. 2009. Probing inhibitory effects of destruxins from *Metarhizium anisopliae* using insect cell based impedance spectroscopy: inhibition vs chemical structure. *Analyst* **134**: 1447--1452.
- Magan, N. 2001. Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents. Dalam: Butt, L. M., C. Jackson, & N. Magan. 2001. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems, and potential*. CABI Publishing, England: x + 389 hlm.
- Matsumoto, K.S. 2006. Fungal chitinase. *Enzyme* **661**(186): 289--304.
- Moat, A.G., J.W. Foster, & Spector M.P. 2002. *Microbial physiology*. Wiley-Liss, Inc., New York: xvii + 673 hlm.
- Murphy, R.A. & K.A. Horgan. 2005. Antibiotics, enzymes, and chemical commodities from fungi. Dalam: Kavanagh, K. *Fungi biology and application*. John Wiley & Sons, Ltd., England: xi + 267 hlm.
- Nakasone, K. K., S. W. Peterson, & S. C. Jong. 2006. Preservation and distribution of fungal cultures. Dalam: Mueller, G. M., G. F. Bills, & M. S. Foster. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, ? : xviii + 777 hlm.
- Nayar, K.K., T.N. Ananthkrishnan & B.V. David. 1976. *General and applied entomology*. Tata McGraw-Hill, New Delhi: xii + 589 hlm.
- Nishi, O., K. Iiyama, C. Y. Aoki, & S. Shimizu. 2010. Incongruence between EF-1 α phylogeny and morphology of *Metarhizium majus* and *Metarhizium guizhouense* in Japan. *Entomotech* **34**: 19--23.
- Pracaya. 2008. *Pengendalian hama dan penyakit tanaman secara organik*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta: 308 hlm.
- Prayogo, Y. 2006. Upaya mempertahankan keefektifan cendawan entomopatogen untuk mengendalikan hama tanaman pangan. *Jurnal Litbang Pertanian* **25**(2): 47--54.
- Prayogo, Y., W. Tengkan & Marwoto. 2005. Prospek cendawan entomopatogen *Metarhizium anisopliae* untuk mengendalikan ulat grayak *Spodoptera litura* pada kedelai. *Jurnal Litbang Pertanian* **24**(1): 19--26.

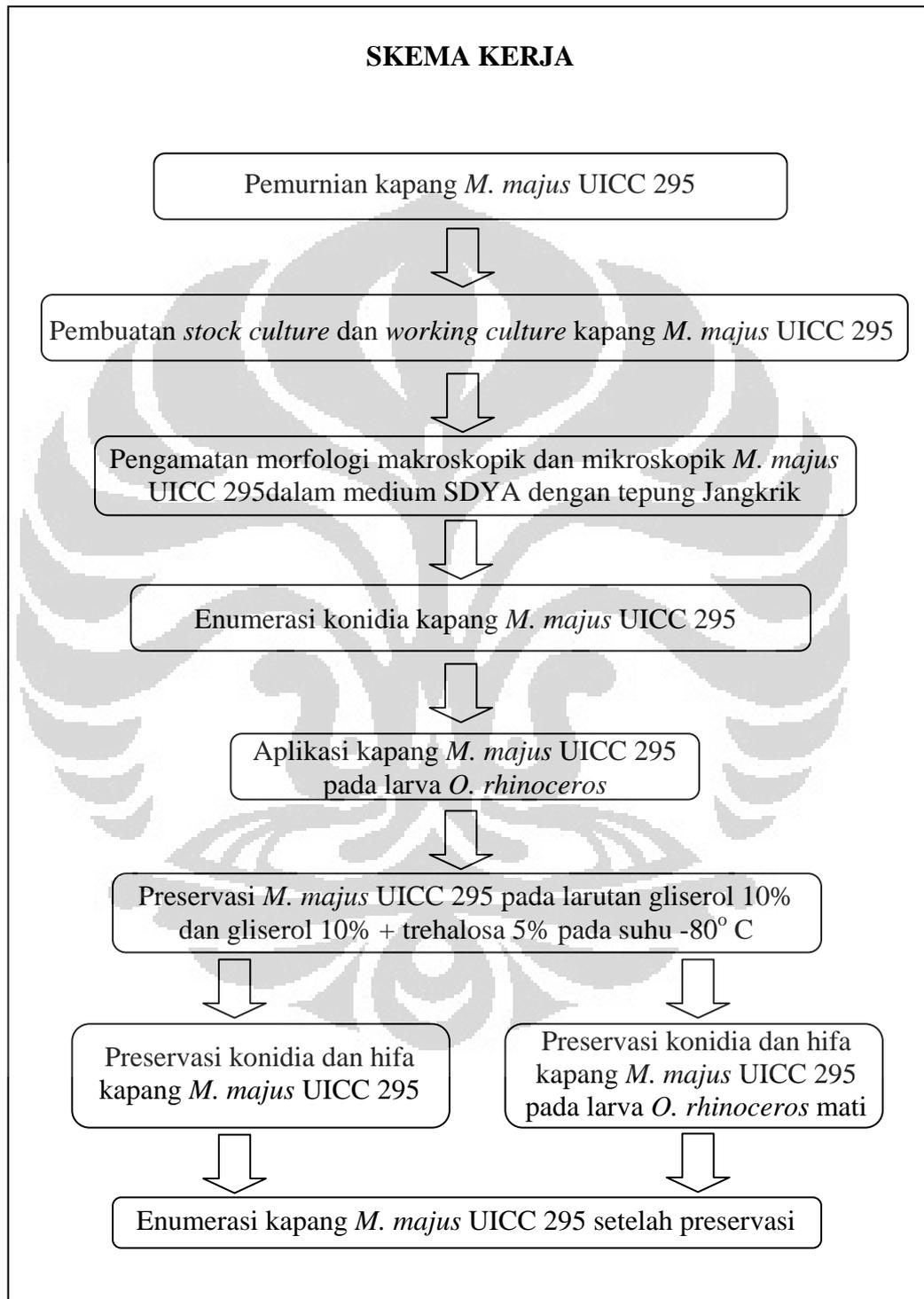
- Rosadi, D.A. 2011. Pembuatan dan pengujian formula *M. majus* UICC295 dengan media pembawa substrat kentang (*Solanum tuberosum*) dalam membunuh larva *O. rhinoceros*. Skripsi Sarjana Departemen Biologi FMIPA-UI, Depok: xiii + 61 hlm.
- Radledge, C. & B. Kristiansen. 2006. *Basic biotechnology*. 3rd ed. Cambridge University Press, England: xv + 682 hlm.
- Saeed, A., M. Saeed, & M. Yousuf. 2000. New species and records of some cricket (*Grillinae: Grillidae: Orthoptera*) from Pakistan. *International Journals of Agriculture and Biology* **2**(3): 175--182.
- 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 & Jean-Paul Latgé. 1988. *Atlas of entomopathogenic fungi*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: xi + 187 hlm.
- Shah, F.A., C.S. Wang, & T.M. Butt. 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiological Letters* **251**(2): 259--266.
- Siregar, J. 2010. Tingkat serangan kumbang badak (*Oryctes rhinoceros* L.) pada areal tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) berdasarkan umur tanaman. Skripsi sarjana Departemen Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian USU, Medan: viii + 34.
- Sumbali, G. & R.S. Mehrotra. 2009. *Principles of microbiology*. The Tata McGraw-Hill companies, Delhi: xxii + 924 hlm.
- Swamy, B.N & A.D. Deesh. 2011. Management of coconut rhinoceros beetle (*Oryctes rhinoceros*) in Fiji. *Technical Bulletin Ministry of Primary Industry*. **4**: 1--3.
- Talaro, K.P. 2009. *Foundations in microbiology*. 7th ed. The McGraw-hill Companies, inc., New York: xxxii + 830 hlm.
- Wang, C. & R.J.S. Leger. 2006. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *PNAS* **103**(17): 6647--6652.

- Wang, D., S.W. Zhai, C.X. Zhang, Y.Y. Bai, S.H. An, & Y.N. Xu. 2005. Evaluation on nutritional value of field crickets as a poultry feedstuff. *Asian- Australia Journal of Animal Science* **18**(5): 667--670.
- 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. W.S. Weber. 2007. *Introduction to fungi*. 3rd ed. Cambridge University Press, England: xix + 841 hlm.

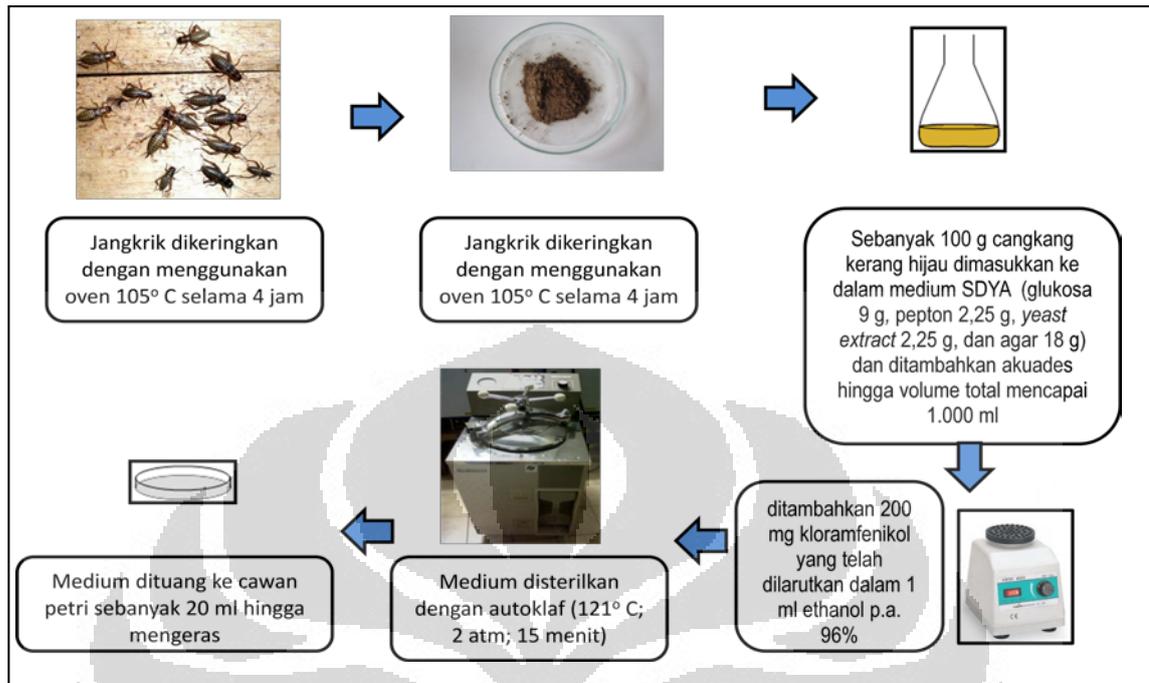


LAMPIRAN

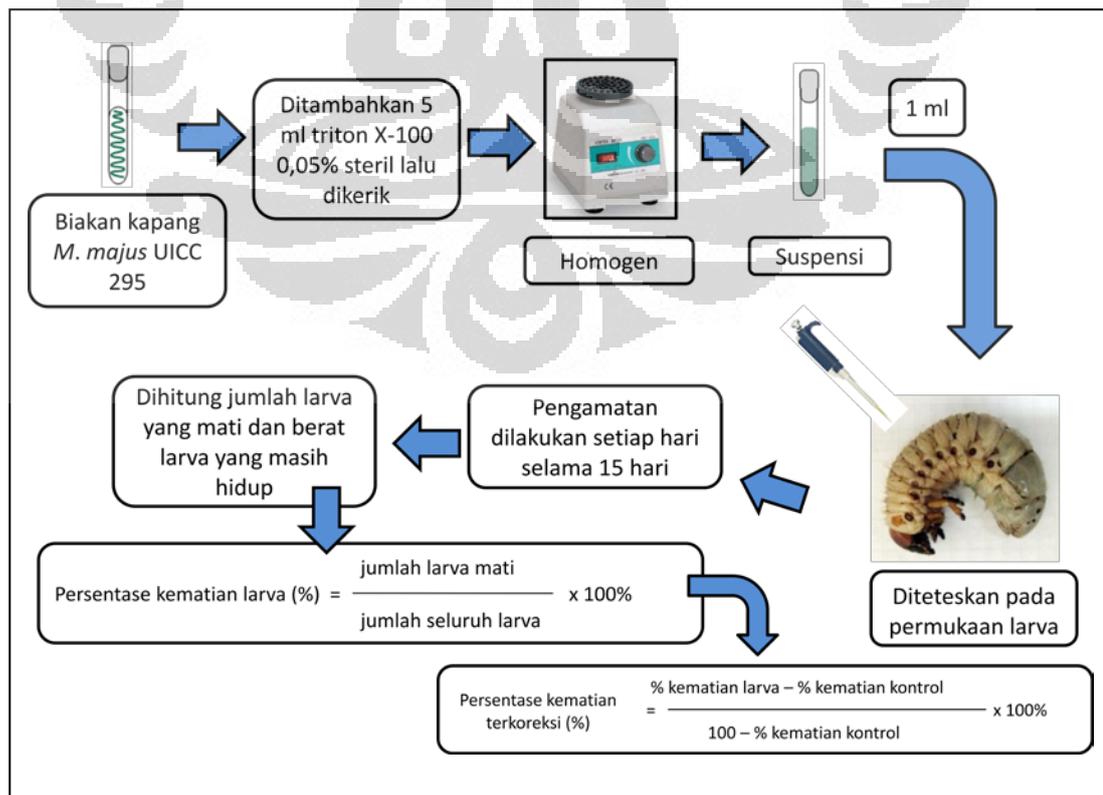
Lampiran 1. Skema kerja penelitian



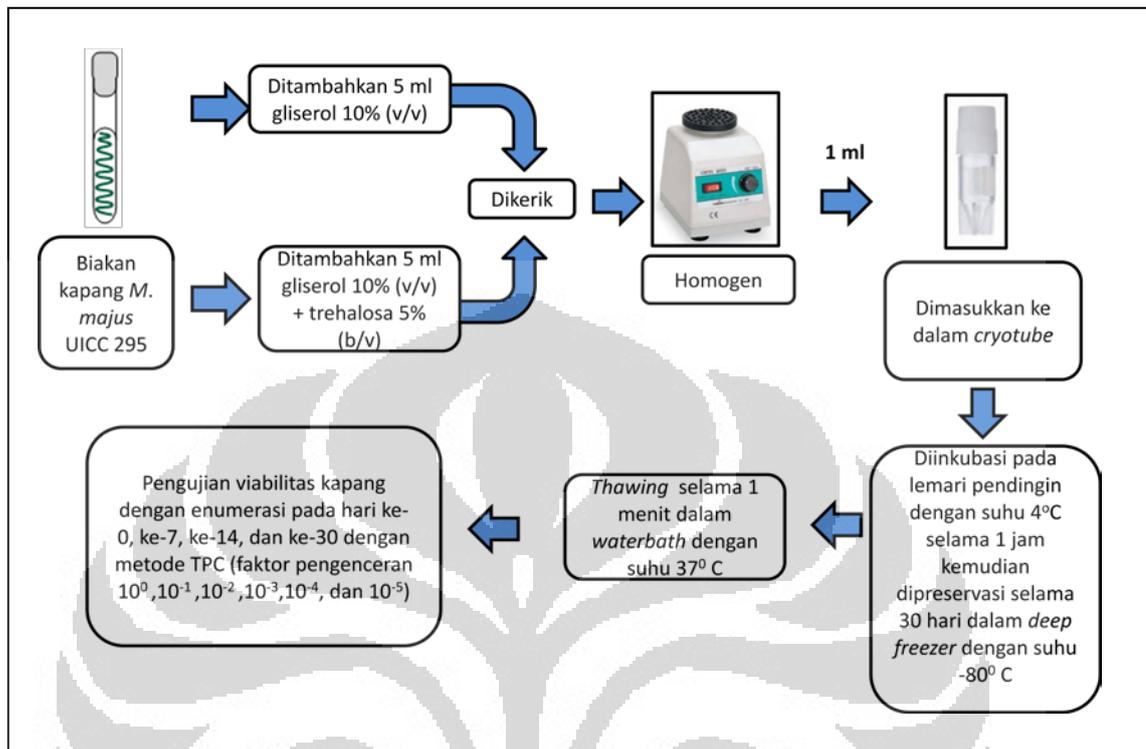
Lampiran 2. Cara kerja pembuatan medium SDYA dengan penambahan tepung jangkrik



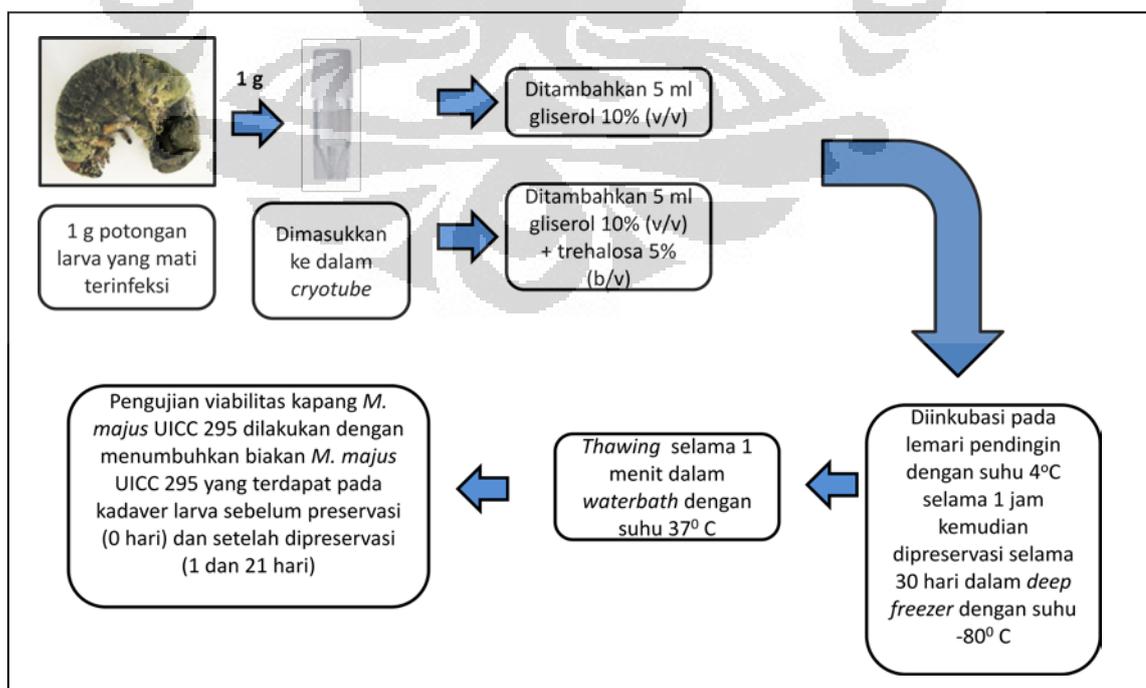
Lampiran 3. Cara kerja aplikasi kontak langsung kapang *M. majus* UICC 295 terhadap larva *Oryctes rhinoceros*



Lampiran 4. Cara kerja preservasi kapang *M. majus* UICC 295 pada gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan trehalosa 5% (b/v) terhadap larva *Oryctes rhinoceros*



Lampiran 5. Cara kerja preservasi kapang *M. majus* UICC 295 pada cadaver larva dengan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan trehalosa 5% (b/v) terhadap larva *Oryctes rhinoceros*



Lampiran 6. 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 7
 Hasil pengukuran konidia dan hifa *M. majus* UICC 295 umur 21 hari dalam medium SDYA tanpa penambahan substrat kitin pada suhu 28° C

Ulangan ke-	Konidia		Lebar hifa (µm)
	Panjang (µm)	Lebar (µm)	
1	23,32	5,69	2,80
2	21,14	6,19	2,91
3	23,07	6,39	2,06
4	26,44	6,26	1,90
5	26,15	6,17	2,48
6	22,40	6,05	2,06
7	24,73	5,24	2,30
8	22,84	7,49	2,91
9	19,32	5,98	1,90
10	25,80	7,14	1,90
11	24,10	5,54	1,95
12	23,43	5,61	2,06
13	26,10	6,00	2,30
14	26,17	5,08	2,48
15	23,55	6,05	2,35
16	24,84	6,92	2,91
17	21,56	5,89	2,35
18	25,06	5,36	1,84
19	19,90	4,60	2,60
20	25,22	7,16	2,80
Kisaran	19,32--26,44	4,60--7,49	1,84--2,91
Rata-rata	23,76	6,04	2,34
SD	2,11	0,73	0,38

Lampiran 8
 Hasil pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 secara mikroskopik koloni umur
 14 hari dalam medium SDYA dengan penambahan tepung jangkrik
 5% (b/v) pada suhu 28° C dengan kondisi gelap

Ulangan ke-	Konidia		Lebar hifa (µm)
	Panjang (µm)	Lebar (µm)	
1	22,48	5,97	3,93
2	18,21	4,73	6,86
3	21,14	6,52	3,72
4	20,81	5,34	6,11
5	22,97	5,50	3,07
6	23,16	4,39	2,81
7	21,23	6,28	3,72
8	14,75	6,21	3,62
9	23,55	6,28	4,39
10	21,25	5,90	4,05
11	21,54	6,52	4,39
12	23,95	7,02	2,48
13	22,99	6,81	3,51
14	24,60	5,77	3,78
15	19,32	5,43	3,16
16	18,25	6,87	4,48
17	20,48	5,36	3,95
18	18,14	5,97	2,56
19	22,91	5,97	2,19
20	25,77	6,21	5,36
Kisaran	14,75--25,77	4,39--7,02	2,19--6,86
Rata-rata	21,38	5,95	3,91
SD	2,64	0,68	1,17

Lampiran 9
 Hasil pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 secara mikroskopik koloni umur
 10 hari dalam medium SDYA dengan penambahan tepung jangkrik
 10% (b/v) pada suhu 28° C dengan kondisi gelap

Ulangan ke-	Konidia		Panjang hifa (µm)
	Panjang (µm)	Lebar (µm)	
1	20,42	8,07	4,39
2	21,59	7,68	3,07
3	21,02	6,94	3,95
4	22,56	6,48	3,75
5	21,47	7,47	4,85
6	18,75	6,71	3,54
7	22,4	7,02	3,75
8	20,86	5,55	4,39
9	22,76	5,97	3,95
10	22,66	5	4,32
11	22,67	7,14	3,75
12	19,79	5,28	3,43
13	24,17	5,89	4,52
14	19,63	6,14	4,48
15	22,1	6,58	3,54
16	21,79	5,34	3,51
17	21,27	7,36	4,91
18	18,99	6,1	3,43
19	21,14	5,59	3,2
20	22,67	4,41	3,54
Kisaran	18,75--24,17	4,41--8,07	3,07--4,91
Rata-rata	21,44	6,34	3,91
SD	1,40	0,97	0,54

Lampiran 10
 Hasil pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 secara mikroskopik koloni umur
 10 hari dalam medium SDYA dengan penambahan tepung jangkrik
 15% (b/v) pada suhu 28° C dengan kondisi gelap

Ulangan ke-	Konidia		Lebar hifa (µm)
	Panjang (µm)	Lebar (µm)	
1	21,18	4,97	3,16
2	24,21	4,91	4,48
3	22,91	5,86	3,51
4	21,45	6,24	2,19
5	21,14	4,91	3,2
6	20,81	5,62	3,54
7	20,74	4,05	5,43
8	19,24	4,05	4,85
9	18,01	4,05	3,07
10	20,26	5,5	2,63
11	16,88	5,14	2,81
12	18,02	4,16	2,36
13	20,47	3,93	2,19
14	20,82	4,85	2,36
15	20,98	5,14	2,81
16	18,91	4,73	1,76
17	21,18	4,41	2,63
18	19,49	5,89	3,16
19	19,72	5,89	2,19
20	23,97	4,85	3,43
Kisaran	16,88--24,21	3,93--6,24	1,76--5,43
Rata-rata	20,52	4,96	3,09
SD	1,86	0,71	0,94

Lampiran 11
 Hasil analisa ANOVA dan Tukey panjang konidia, lebar konidia dan lebar hifa kapang *M. majus* UICC 295 pada SDYA dengan tepung jangkrik 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v).

ANOVA		
		P
	Panjang konidia	0,002
	Lebar konidia	0,822
	Lebar hifa	0,000
Tukey		
Panjang konidia	Tepung jangkrik 5%	0,007
	Tepung jangkrik 10%	0,007
	Tepung jangkrik 15%	0,009
Lebar konidia	Tepung jangkrik 5%	0,989
	Tepung jangkrik 10%	0,989
	Tepung jangkrik 15%	0,955
Lebar hifa	Tepung jangkrik 5%	0,000
	Tepung jangkrik 10%	0,000
	Tepung jangkrik 15%	0,000

Keterangan: P < 0,005 = berbeda nyata
 P > 0,005 = tidak berbeda nyata

Lampiran 12
 Jumlah larva yang mati, kelembaban relatif, dan suhu ruang selama 15 hari
 pengamatan pada pengujian suspensi konidia/hifa *M. majus* UICC
 295 pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol

Hari ke-	Jumlah larva yang mati										Kelembaban relatif (%)	Suhu ruang (°C)	
	Kelompok perlakuan (substrat kitin)			Σ larva mati per hari	Kelompok perlakuan (SDYA)			Σ larva mati per hari	Kelompok kontrol				
	1	2	3		1	2	3		1	2			3
0	Aplikasi dilakukan			-	Aplikasi dilakukan			-	Aplikasi dilakukan			90	27.8
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	91	27.6
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	90	27.8
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	91	27.6
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80	28.2
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	78	28.4
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	28.2
7	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	74	28.1
8	2	-	-	2	2	1	5	8	-	-	-	90	28.2
9	3	5	-	8	5	4	1	10	-	-	-	88	28
10	5	2	8	15	2	1	1	4	-	-	-	88	27.5
11	5	-	-	5	1	3	3	7	-	-	-	88	28.1
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	90	27.2
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	90	27.1
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	27.6
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	27.4
Tot al	15	7	8	30	10	10	10	30	-	-	-		
Rat a- rata											87 ± 5.05	27.8 ± 0.39	

Lampiran 13
Berat badan larva yang masih hidup pada kelompok kontrol (g)

Kode Larva	Aplikasi dilakukan Hari ke-0	Penimbangan ke-				
		1 Hari ke-3	2 Hari ke-6	3 Hari ke-9	4 hari ke-12	5 Hari ke-15
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 14
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 Hari ke-0	penimbangan ke-				
		1 Hari ke-3	2 Hari ke-6	3 Hari ke-9	4 hari ke-12	5 Hari ke-15
KP S 1.1	9,49	9,63	9,91	mati	mati	mati
KP S 1.2	9,43	9,22	9,31	8,19	mati	mati
KP S 1.3	9,39	9,28	8,43	mati	mati	mati
KP S 1.4	9,36	9,54	9,82	mati	mati	mati
KP S 1.5	9,35	9,46	9,59	mati	mati	mati
KP S 1.6	9,31	9,27	9,14	6,69	mati	mati
KP S 1.7	9,21	8,88	8,63	6,44	mati	mati
KP S 1.8	9,04	8,70	8,63	7,37	mati	mati
KP S 1.9	8,96	8,60	7,14	6,38	mati	mati
KP S 1.10	8,94	8,82	8,72	6,87	mati	mati
Rata-rata	9,25±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 = Kelompok larva yang diinokulasikan dengan *M. majus* UICC
295 pada medium SDYA

Lampiran 15
 Berat larva yang masih hidup setelah aplikasi pada pengujian suspensi
 konidia/hifa *M. majus* UICC 295 dalam SDYA dengan penambahan
 tepung jangkrik 10% pada suhu 28 °C kondisi gelap (g)

Kelompok Perlakuan	Aplikasi dilakukan Hari ke-0	Penimbangan ke-				
		1	2	3	4	5
		Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9	Hari ke-12	Hari ke-15
KP TJ 1.1	13,15	13,13	12,85	mati	mati	mati
KP TJ 1.2	13,12	12,59	12,87	mati	mati	mati
KP TJ 1.3	13,09	11,98	11,78	10,98	mati	mati
KP TJ 1.4	13,06	12,66	12,59	12,01	mati	mati
KP TJ 1.5	13,02	12,09	11,24	10,73	mati	mati
KP TJ 1.6	12,97	12,55	12,16	mati	mati	mati
KP TJ 1.7	12,95	12,67	12,76	mati	mati	mati
KP TJ 1.8	12,93	11,38	10,42	mati	mati	mati
KP TJ 1.9	12,91	12,9	12,93	9,61	mati	mati
KP TJ 1.10	12,88	12,89	13,76	11,26	mati	mati
Rata-rata	13,01±0,09	12,48±0,52	12,34±0,97	10,92±5,69	0	0
KP TJ 2.1	12,83	13,22	13,1	mati	mati	mati
KP TJ 2.2	12,76	12,78	13,08	10,96	mati	mati
KP TJ 2.3	12,75	12,81	13,03	11,64	mati	mati
KP TJ 2.4	12,68	12,77	12,63	mati	mati	mati
KP TJ 2.5	12,6	12,43	12,52	10,99	mati	mati
KP TJ 2.6	12,52	11,98	11,33	10,4	mati	mati
KP TJ 2.7	12,52	11,2	10,85	9,4	mati	mati
KP TJ 2.8	12,46	12,91	12,6	mati	mati	mati
KP TJ 2.9	12,46	12,11	12,09	mati	mati	mati
KP TJ 2.10	12,45	12,54	12,81	mati	mati	mati
Rata-rata	12,78±0,04	12,48±0,58	12,40±0,77	10,68±4,42	0	0
KP TJ 3.1	12,44	12,32	12,02	9,65	mati	mati
KP TJ 3.2	12,4	11,89	11,5	mati	mati	mati
KP TJ 3.3	12,38	12,44	12,42	mati	mati	mati
KP TJ 3.4	12,34	12,03	11,72	10,25	mati	mati
KP TJ 3.5	12,18	12,34	12,37	mati	mati	mati
KP TJ 3.6	12,18	11,72	11,45	mati	mati	mati
KP TJ 3.7	12,17	12,08	12,06	mati	mati	mati
KP TJ 3.8	12,06	12,02	11,84	mati	mati	mati
KP TJ 3.9	12,02	11,94	11,87	mati	mati	mati
KP TJ 3.10	12	12,05	11,94	mati	mati	mati
Rata-rata	12,22±0,16	12,08±0,22	11,92±0,32	9,95±5,75	0	0

Keterangan: KP TJ : Kelompok perlakuan tepung jangkrik

Lampiran 16
 Hasil TPC *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi
 menggunakan akuades (kontrol)

Hari ke-	Pengenceran	Pengulangan	Σ Koloni		Σ CFU (CFU/ml)		Σ CFU rata-rata (CFU/ml) ± SD		
			Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2	
0	10 ⁻³	1	>300	186					
		2	>300	156	-	1,67 x 10 ⁶			
		3	>300	161					
	10 ⁻⁴	1		56	44	6,20 x 10 ⁶	4,40 x 10 ⁶		
		2		55	45				
		3		75	44			6,63 x 10 ⁶	3,45 x 10 ⁶
	10 ⁻⁵	1		10	4				
		2		5	5	7,00 x 10 ⁶	4,30 x 10 ⁶		
		3		6	4				
	10 ⁻⁶	1		1					
		2		-		6,70 x 10 ⁶			
		3		1					
	Tanpa pengenceran	1							
		2							
		3							
10 ⁻¹	1								
	2								
	3								
10 ⁻²	1								
	2								
	3								
1	10 ⁻³	1	>300	135			3,7 x 10 ⁶	1,56 x 10 ⁶	
		2	>300	112		1,29 x 10 ⁶			
		3	>300	139					
	10 ⁻⁴	1		29	35				
		2		41	20	5,1 x 10 ⁶	2,40 x 10 ⁶		
		3		84	17				
	10 ⁻⁵	1		1	1				
		2		4	1	2,3 x 10 ⁶	1,00 x 10 ⁶		
		3		2	1				

Lampiran 16. (Lanjutan)

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

Lampiran 17
 Hasil TPC *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi
 menggunakan *cryoprotectant* gliserol 10% (v/v)

Hari ke-	Pengenceran	Pengulangan	Σ Koloni		Σ CFU (CFU/ml)		Σ CFU rata-rata (CFU/ml) ± SD		
			Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2	
0	10 ⁻³	1	>300	186					
		2	>300	156		1,67			
		3	>300	161		x 10 ⁶			
	10 ⁻⁴	1	56	44					
		2	55	45	6,20 x 10 ⁶	4,40 x 10 ⁶			
		3	75	44			6,63 x 10 ⁶	3,45 x 10 ⁶	
	10 ⁻⁵	1	10	4					
		2	5	5	7,00 x 10 ⁶	4,30 x 10 ⁶			
		3	6	4					
	10 ⁻⁶	1	1						
		2	-		6,70 x 10 ⁶				
		3	1						
	Tanpa pengenceran	10 ⁻¹	1	>300	>300				
			2	>300	>300				
			3	>300	>300				
10 ⁻²		1	>300	>300					
		2	>300	>300					
		3	>300	>300					
10 ⁻³		1	160	121					
		2	164	134	1,52 x 10 ⁶	1,26 x 10 ⁶			
		3	131	124					
10 ⁻⁴	1	65	32						
	2	75	46	7,03 x 10 ⁶	3,76 x 10 ⁶	4,63 x 10 ⁶	2,78 x 10 ⁶		
	3	71	35						
10 ⁻⁵	1	8	5						
	2	2	3	5,33 x 10 ⁶	3,33 x 10 ⁶				
	3	6	2						

Lampiran 17. (Lanjutan)

		1	>300	>300				
	Tanpa pengenceran	2	>300	>300				
		3	>300	>300				
		1	>300	>300				
	10^{-1}	2	>300	>300				
		3	>300	>300				
		1	159	122				
14	10^{-2}	2	163	138	$1,45 \times 10^5$	$1,26 \times 10^5$	$2,67 \times 10^5$	$2,02 \times 10^5$
		3	112	117				
		1	17	10				
	10^{-3}	2	30	14	$2,57 \times 10^5$	$1,47 \times 10^5$		
		3	30	21				
		1	5	4				
	10^{-4}	2	4	3	$4,00 \times 10^5$	$3,33 \times 10^5$		
		3	3	3				
		1	111	127				
	10^{-2}	2	148	112				
		3	141	121				
		1	7	11				
30	10^{-3}	2	17	10				
		3	11	13				
		1	0	01				
	10^{-4}	2	0	1				
		3	0	1				

Lampiran 18
 Hasil TPC *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi menggunakan *cryoprotectant* gliserol 10% (v/v) dengan penambahan trehalosa 5% (b/v)

Hari ke-	Pengenceran	Pengulangan	Σ Koloni		Σ CFU (CFU/ml)		Σ CFU rata-rata (CFU/ml) ± SD	
			Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2
1	Tanpa pengenceran	1	>300	>300				
		2	>300	>300				
		3	>300	>300				
	10 ⁻¹	1	>300	>300				
		2	>300	>300				
		3	>300	>300				
	10 ⁻²	1	>300	>300				
		2	>300	>300				
		3	>300	>300				
	10 ⁻³	1	75	109				
		2	87	84	0,08 x 10 ⁶	0,98 x 10 ⁶	11,67 x 10 ⁵	1,44 x 10 ⁶
		3	79	101				
	10 ⁻⁴	1	10	15				
		2	12	16	1,2 x 10 ⁶	1,36 x 10 ⁶		
		3	14	10				
	10 ⁻⁵	1	2	1				
		2	0	4	1,5 x 10 ⁶	2 x 10 ⁶		
		3	1	1				
10 ⁻⁶	1	0	0					
	2	0	0					
	3	0	0					
14	Tanpa pengenceran	1	>300	>300				
		2	>300	>300				
		3	>300	>300				
	10 ⁻¹	1	110	98				
		2	Konta	102	1,23 x 10 ⁴	0,97 x 10 ⁴		
		3	136	93			2,97 x 10 ⁴	1,7 x 10 ⁴
	10 ⁻²	1	32	24				
		2	38	31	4,1 x 10 ⁴	2,93 x 10 ⁴		
		3	53	33				
	10 ⁻³	1	1	1				
		2	4	2	3,6 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁴		
		3	6	1				

Lampiran 18. (Lanjutan)

		1	98		
	10^{-1}	2	87	$0,8 \times 10^4$	
		3	84		
30	10^{-2}	1	23		
		2	13	$1,6 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
		3	14		
	10^{-3}	1	1		
		2	0	1×10^4	
		3	1		

Lampiran 19
 Hasil TPC *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan
 penambahan tepung jangkrik 10% (b/v) setelah
 preservasi menggunakan akuades (kontrol)

Hari ke-	Pengenceran	Pengulangan	Σ Koloni		Σ CFU (CFU/ml)		Σ CFU rata-rata (CFU/ml) ± SD	
			Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2
0	10^{-3}	1	>300	>300				
		2	>300	>300				
		3	>300	>300				
	10^{-4}	1	126	132				
		2	113	125	$1,19 \times 10^7$	$1,17 \times 10^7$		
		3	Konta	94			$2,4 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$
	10^{-5}	1	Konta	20				
		2	11	33	$1,75 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$		
		3	24	31				
10^{-6}	1	2	3					
	2	6	2	$4,3 \times 10^7$	4×10^7			
	3	5	7					

Lampiran 19. (Lanjutan)

	Tanpa pengenceran	1	>300	>300			
		2	>300	>300			
		3	>300	>300			
	10^{-1}	1	>300	>300			
		2	>300	>300			
		3	>300	>300			
	10^{-2}	1	>300	>300			
		2	>300	>300			
		3	>300	>300			
1	10^{-3}	1	>300	107			
		2	>300	99	0,1 x 10^6	7,74 x 10^7	8,6 x 10^6
		3	>300	97			
	10^{-4}	1	89	16			
		2	87	29	0,88 x 10^7	1,96 x 10^6	
		3	90	14			
	10^{-5}	1	13	8			
		2	14	7	1,56 x 10^7	24 x 10^6	
		3	20	9			
	10^{-6}	1	9	0			
		2	6	0	5,3 x 10^7		
		3	1	0			
	10^{-3}	1	103	89			
		2	201	96	1,39 x 10^6	0,9 x 10^6	
		3	113	102			
	10^{-4}	1	25	34			
		2	23	21	8 x 10^6	2,6 x 10^6	
14		3	32	23			
	10^{-5}	1	9	8			4,8 x 10^6
		2	5	7	5,3 x 10^6	7,3 x 10^6	3,6 x 10^6
		3	2	7			
	10^{-6}	1	0	0			
		2	0	0			
		3	0	0			
	10^{-3}	1	109				
		2	94		1,01 x 10^6		
		3	102				
30	10^{-4}	1	34				
		2	44		3,3 x 10^6	3,87 x 10^6	
		3	23				
	10^{-5}	1	12				
		2	5		7,3 x 10^6		
		3	5				

Lampiran 20
 Hasil TPC *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan
 penambahan tepung jangkrik 10% (b/v) setelah
 preservasi menggunakan *cryoprotectant* gliserol 10% (v/v)

Hari ke-	Pengenceran	Pengulangan	Σ Koloni		Σ CFU (CFU/ml)		Σ CFU rata-rata (CFU/ml) ± SD	
			Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2
1	Tanpa pengenceran	1	>300	>300				
		2	>300	>300				
		3	>300	>300				
	10 ⁻¹	1	>300	>300				
		2	>300	>300				
		3	>300	>300				
	10 ⁻²	1	>300	173				
		2	>300	105	-	1,30 x 10 ⁵		
		3	>300	114			5,03 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶
	10 ⁻³	1	201	34	1,60 x 10 ⁶	3,83 x 10 ⁵		
		2	111	37				
		3	170	44				
	10 ⁻⁴	1	45	5	5,9 x 10 ⁶	7,6 x 10 ⁵		
		2	67	6				
		3	65	12				
10 ⁻⁵	1	7	0	7,6 x 10 ⁶				
	2	8	0					
	3	8	0					
14	10 ⁻³	1	87	84	1 x 10 ⁶	0,8 x 10 ⁶		
		2	103	72				
		3	110	87				
	10 ⁻⁴	1	27	20	3,5 x 10 ⁶	2,7 x 10 ⁶	4,2 x 10 ⁶	2,3 x 10 ⁶
		2	61	28				
		3	17	33				
	10 ⁻⁵	1	12	1	8,3 x 10 ⁶	3,6 x 10 ⁶		
		2	5	8				
		3	8	2				
30	10 ⁻²	1	91		0,9 x 10 ⁵			
		2	94					
		3	88					
	10 ⁻³	1	14		2,5 x 10 ⁵		3,3 x 10 ⁵	
		2	34					
		3	29					
	10 ⁻⁴	1	9		6,6 x 10 ⁵			
		2	6					
		3	5					

Lampiran 21
 Hasil TPC *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan
 penambahan tepung jangkrik 10% (b/v) setelah
 preservasi menggunakan *cryoprotectant* gliserol 10% (v/v)
 dengan penambahan trehalosa 5% (b/v)

Hari ke-	Pengenceran	Pengulangan	Σ Koloni		Σ CFU (CFU/ml)		Σ CFU rata-rata (CFU/ml) ± SD	
			Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2	Batch 1	Batch 2
1	Tanpa pengenceran	1	>300	>300				
		2	>300	>300				
		3	>300	>300				
	10 ⁻¹	1	>300	>300				
		2	>300	>300				
		3	>300	>300				
	10 ⁻²	1	>300	104				
		2	>300	158				
		3	>300	108				
	10 ⁻³	1	Konta	85				
		2	87	94	0,96 x 10 ⁶	0,83 x 10 ⁶	1,75 x 10 ⁶	3,38 x 10 ⁶
		3	105	70				
	10 ⁻⁴	1	17	26				
		2	29	39	2,3 x 10 ⁶	3,03 x 10 ⁶		
		3	Konta	26				
	10 ⁻⁵	1	3	4				
		2	2	3	2 x 10 ⁶	6,3 x 10 ⁶		
		3	1	12				
10 ⁻⁶	1							
	2							
	3							
14	Tanpa pengenceran	1	>300	>300				
		2	>300	>300				
		3	>300	>300				
	10 ⁻¹	1	>300	>300				
		2	>300	>300			2,4 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁵
		3	>300	>300				
	10 ⁻²	1	86	52				
		2	62	43	0,5 x 10 ⁵	0,6 x 10 ⁵		
		3	7	87				

Lampiran 21. (Lanjutan)

		1	46	21		
	10^{-3}	2	17	28	$2,9 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$
		3	25	20		
		1	3	3		
	10^{-4}	2	0	2	4×10^5	$2,6 \times 10^5$
		3	5	3		
		1	1	0		
	10^{-5}	2	0	0	-	-
		3	0	0		
		1	87			
	10^{-2}	2	76		$0,8 \times 10^5$	
		3	83			
		1	13			
30	10^{-3}	2	20		$1,8 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$
		3	21			
		1	2			
	10^{-4}	2	3		2×10^5	
		3	1			