



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH PENAMBAHAN KITIN KOLOIDAL 10% 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

**CINTHYA KARLINA WIJAYA
0806453106**

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

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Cinthya Karlina Wijaya

NPM : 0806453106

Tanda tangan :

Tanggal : 25 Juni 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Cinthya Karlina Wijaya
NPM : 0806453106
Program Studi : S1 Biologi
Judul Skripsi : Pengaruh Penambahan Kitin Koloidal 10% pada
Medium Pertumbuhan terhadap Kemampuan
Metarhizium majus UICC 295
Menginfeksi Larva *Oryctes rhinoceros* Linnaeus

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Ariyanti Oetari, Ph.D. (.....)

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

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

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 25 Juni 2012

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yesus Kristus atas segala anugerah, rahmat, kasih, 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)*.
3. Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D. dan Dr.rer.nat. Yasman, S.Si, M.Sc. selaku penguji atas saran dan masukan yang diberikan.
4. Dr.rer.nat. Mufti Petala Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi, Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Titi Soedjiarti, S.U. selaku Koordinator Pendidikan Departemen Biologi FMIPA UI dan seluruh staf pengajar Departemen Biologi FMIPA UI atas bekal ilmu yang penulis terima, perhatian dan dukungannya.
5. Dr. Abinawanto selaku Penasihat Akademik atas nasihat, perhatian, dan dukungannya.
6. Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. dan Dra. Setiorini M.Kes. selaku koordinator seminar yang telah memberikan saran dan bimbingan kepada penulis.
7. Ahmad Supriyadi S.Pi, Asri Martini S.Si, Pak Ana, Pak Ono, dan seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA UI atas semua bantuan yang diberikan.
8. Bapak Endi dan Bapak Sangsang yang telah menyediakan larva yang digunakan dalam penelitian.
9. Kedua orang tuaku Alexander Hidayat Wijaya dan Nita Ivo Dianti atas doa, kasih sayang, pengertian, pengorbanan, serta dukungan moril dan materil yang selalu diberikan hingga skripsi ini dapat diselesaikan.

10. Keluarga tersayang Oma Tuti Dulmanan, Jovi, Evellyne, atas doa, dukungan, semangat, dan kebersamaan yang selalu menjadi motivasi dan inspirasi bagi penulis.
11. Grand Septia Yama, Oktarina Sumandari, dan Nur Amalina selaku teman seperjuangan CANNON yang selalu bersama dalam suka maupun duka selama masa penelitian dan penulisan skripsi.
12. Dhian Chitra Ayu, sahabat tersayang, yang akan selalu menjadi orang istimewa dan tidak terlupakan bagi penulis.
13. 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, Kak Galuh dan NADIN (Hanna dan Muhabidin) yang telah banyak membantu dan memberi masukan dalam menyelesaikan penelitian.
14. Sahabat-sahabat terdekat Pepe, Ucy, Shara, Vian, Silvia, Ocha atas persahabatan indah serta dukungan yang telah diberikan.
15. Teman-teman Biologi khususnya BIOSENTRIS (*Biology Two Thousand and Eight Truly Inspiring*) atas pertemanan yang tak akan terlupakan.
16. 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 : Cinthya Karlina Wijaya
NPM : 0806453106
Program studi : S1
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

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

Pengaruh Penambahan Kitin Koloidal 10% pada Medium Pertumbuhan terhadap Kemampuan *Metarhizium majus* UICC 295 Menginfeksi Larva *Oryctes rhinoceros* Linnaeus

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 25 Juni 2012

Yang menyatakan



(Cinthya Karlina Wijaya)

ABSTRAK

Nama : Cinthya Karlina Wijaya
Program Studi : Biologi
Judul : Pengaruh Penambahan Kitin Koloidal 10% pada Medium Pertumbuhan terhadap Kemampuan *Metarhizium majus* UICC 295 Menginfeksi Larva *Oryctes rhinoceros* Linnaeus

Metarhizium majus UICC 295 adalah kapang entomopatogen yang menginfeksi dan membunuh serangga. Penelitian bertujuan menguji pengaruh penambahan kitin koloidal 10% (b/v) pada medium pertumbuhan terhadap kemampuan *M. majus* UICC 295 menginfeksi larva *Oryctes rhinoceros* Linnaeus serta mengetahui pengaruh preservasi dengan *freezing* pada suhu -80°C menggunakan krioprotektan gliserol 10% (v/v) dan maltosa 5% (b/v) dalam mempertahankan viabilitas *M. majus* UICC 295. Suspensi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada medium *Sabouraud Dextrose with Yeast Extract Agar* (SDYA) sebanyak 1×10^6 sel/ml mampu membunuh larva 3,33--100% dalam 7--11 hari, sedangkan jumlah konidia/hifa 1×10^7 sel/ml pada SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% mampu membunuh larva 6,67--100% dalam waktu 8--10 hari. Preservasi pada -80°C menggunakan akuades mampu mempertahankan viabilitas *M. majus* UICC 295, sedangkan preservasi menggunakan krioprotektan gliserol 10%, dan gliserol 10% dengan penambahan maltosa 5% menyebabkan penurunan viabilitas kapang pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan substrat kitin koloidal 10%. Preservasi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva yang terinfeksi *M. majus* UICC 295 dari medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% pada -80°C menggunakan akuades, krioprotektan gliserol 10%, serta gliserol 10% dan maltosa 5% mampu mempertahankan viabilitas kapang.

Kata kunci: entomopatogen, kitin koloidal, *Metarhizium majus*, *Oryctes rhinoceros*, preservasi, viabilitas

xiv + 84 hlm, 16 gambar, 8 tabel, 24 lampiran.
Daftar acuan: 56 (1976--2011)

ABSTRACT

Name : Cinthya Karlina Wijaya
Study Program : Biology
Title : The Effect of 10% Colloidal Chitin 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 which is able to infect and kill insects. This research aimed to investigate the effects of 10% (w/v) colloidal chitin in growth medium on the pathogenicity of *M. majus* UICC 295 to infect *Oryctes rhinoceros* Linnaeus larvae and to investigate the effects of preservation by freezing in -80°C using 10% (v/v) glycerol and 5% (w/v) maltose as cryoprotectants in sustaining the viability of *M. majus* UICC 295. Application of conidial/hyphal suspension 1×10^6 cell/ml of *M. majus* UICC 295 from SDYA caused 3.33%--100% larval mortality within 7--11 days, while application of conidial/hyphal suspension 1×10^7 cell/ml of the mould from SDYA added with 10% colloidal chitin caused 6.67--100% larval mortality within 8--10 days. Freezing of conidia/hyphae of *M. majus* UICC 295 from SDYA and SDYA added with 10% colloidal chitin preserved in distilled water in -80°C maintained its viability, while freezing of conidia/hyphae of *M. majus* UICC 295 from SDYA and SDYA added with 10% colloidal chitin preserved in 10% glycerol and 10% glycerol added with 5% maltose as cryoprotectants decreased its viability. Freezing of larval cadaver infected with *M. majus* UICC 295 from SDYA and SDYA added with 10% colloidal chitin and preserved in -80°C maintained its viability.

Keyword: colloidal chitin, entomopathogen, *Metarhizium majus*, *Oryctes rhinoceros*, preservation, viability

xiv + 84 pages, 16 pictures, 8 tables, 24 attachments.
Bibliographies: 56 (1976--2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR 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	xiii
1. PENDAHULUAN	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 KAPANG ENTOMOPATOGEN	6
2.2 KAPANG <i>Metarhizium majus</i>	7
2.3 KUMBANG BADAK (<i>Oryctes rhinoceros</i>)	10
2.4 MEDIUM DAN SUBSTRAT KITIN	12
2.5 APLIKASI KONIDIA KAPANG TERHADAP LARVA	14
2.6 PRESERVASI	15
3. METODOLOGI PENELITIAN	17
3.1 LOKASI DAN WAKTU	17
3.2 ALAT	17
3.3 BAHAN	17
3.3.1. Mikroorganisme	17
3.3.2. Larva <i>O. rhinoceros</i>	18
3.3.3. Medium	18
3.3.4. Kitin koloidal	18
3.3.5. Bahan kimia	18
3.3.6. Bahan habis pakai	18
3.4 CARA KERJA	18
3.4.1. Pembuatan medium <i>Saboraud Dextrose Agar with Yeast Extract</i> (SDYA) dan medium SDYA dengan substrat kitin..	19
3.4.2. Pemeliharaan dan penyimpanan isolat kapang	19
3.4.3. Pengamatan morfologi kapang	20
3.4.4. Enumerasi konidia kapang	20
3.4.5. Persiapan larva untuk pengujian	22
3.4.6. Pembuatan larutan triton X-100 0,05% steril	22
3.4.7. Pengujian konidia kapang <i>M. majus</i> UICC 295 terhadap larva <i>O. rhinoceros</i> dengan aplikasi kontak langsung	22

3.4.8. Preservasi kapang <i>M. majus</i> UICC 295 dalam gliserol 10% dan maltosa 5% pada suhu -80° C	23
3.4.9. Pengujian viabilitas <i>M. majus</i> UICC 295 setelah proses preservasi	25
3.4.10. Pengolahan dan analisis data	26
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1 PENGARUH PENAMBAHAN KITIN KOLOIDAL PADA MEDIUM PERTUMBUHAN TERHADAP PERTUMBUHAN <i>M. majus</i> UICC 295.....	27
4.2 PENGUJIAN SUSPENSI KONIDIA/HIFA <i>M. majus</i> UICC 295 TERHADAP LARVA <i>O. rhinoceros</i>	34
4.3 PRESERVASI KONIDIA/HIFA <i>M. majus</i> UICC 295	43
5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	52
DAFTAR REFERENSI	53
LAMPIRAN	59



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1.1	Hasil pengamatan morfologi secara makroskopik biakan <i>M. majus</i> UICC 295 umur 21 hari pada SDYA dan umur 14 hari pada SDYA dengan penambahan kitin koloidal 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) suhu 28° C kondisi gelap.....	27
Tabel 4.1.2	Hasil pengukuran diameter rata-rata koloni <i>M. majus</i> UICC 295 umur 10 hari pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan kitin koloidal 5% (b/v), 10% (b/v) dan 15% (b/v) suhu 28° C kondisi gelap.....	28
Tabel 4.2.1	Jumlah konidia (konidia/ml) <i>M. majus</i> UICC 295 umur 23 hari dalam medium SDYA dan SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) pada Suhu 28° C dengan kondisi gelap.....	35
Tabel 4.2.2	Hasil TPC <i>M. majus</i> UICC 295 umur 23 hari dalam medium SDYA pada suhu 28° C dengan kondisi gelap.....	35
Tabel 4.2.3	Hasil TPC <i>M. majus</i> UICC 295 umur 23 hari pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) suhu 28° C dengan kondisi gelap.....	36
Tabel 4.2.4	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.....	38
Tabel 4.2.5	Persentase kematian larva <i>O. rhinoceros</i> selama 15 hari pengamatan.....	38
Tabel 4.3.1	Hasil penghitungan jumlah konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 setelah preservasi.....	46

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.2	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i> dan <i>Cordyceps brittlebankisoides</i>	8
Gambar 2.3	Tahap hidup <i>O. rhinoceros</i>	11
Gambar 4.1.1	Grafik perbandingan ukuran diameter rata-rata koloni <i>M. majus</i> UICC 295 Grafik perbandingan ukuran diameter rata-rata koloni <i>M. majus</i> UICC 295.....	28
Gambar 4.1.2	Koloni <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA dengan kitin koloidal 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v).....	30
Gambar 4.1.3	Mikromorfologi kapang <i>M. majus</i> UICC pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% umur 14 hari suhu 27° C.....	32
Gambar 4.1.4	Kitin koloidal.....	33
Gambar 4.2.1	Grafik persentase kematian larva <i>O. rhinoceros</i>	37
Gambar 4.2.2	Grafik perbandingan berat larva rata-rata yang masih hidup setelah aplikasi pada pengujian suspensi konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295.....	40
Gambar 4.2.3	Pertumbuhan <i>M. majus</i> UICC 295 pada larva <i>O. rhinoceros</i> mati.....	41
Gambar 4.3.1	Grafik jumlah konidia/hifa hidup <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi.....	47
Gambar 4.3.2	Grafik jumlah konidia/hifa hidup <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) setelah preservasi.....	47
Gambar 4.3.3	Koloni <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi 1 hari dengan kadaver larva.....	48
Gambar 4.3.4	Koloni <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) setelah preservasi 1 hari dengan kadaver larva.....	49
Gambar 4.3.5	Hifa (A) dan konidia (B) <i>M. majus</i> UICC 295 pada kadaver larva <i>O. rhinoceros</i> sebelum preservasi.....	49
Gambar 4.3.6	Hifa dan konidia <i>M. majus</i> UICC 295 pada kadaver larva <i>O. rhinoceros</i> setelah preservasi 1 hari	50

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Skema kerja penelitian.....	59
Lampiran 2.	Cara kerja pembuatan medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v).....	60
Lampiran 3.	Cara kerja pengamatan morfologi <i>M. majus</i> UICC 295 secara makroskopik dan mikroskopik.....	60
Lampiran 4.	Cara kerja enumerasi <i>M. majus</i> UICC 295 menggunakan metode TPC.....	61
Lampiran 5.	Cara kerja aplikasi <i>M. majus</i> UICC 295 pada larva <i>O. rhinoceros</i>	61
Lampiran 6.	Cara kerja preservasi <i>M. majus</i> UICC 295 dengan metode <i>freezing</i> -80° C menggunakan krioprotektan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan maltosa 5% (b/v).....	62
Lampiran 7.	Standar warna Faber Castell.....	63
Lampiran 8.	Hasil pengukuran konidia dan hifa <i>M. majus</i> UICC 295 umur 14 hari dalam medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 5% pada suhu 28° C.....	64
Lampiran 9.	Hasil pengukuran konidia dan hifa <i>M. majus</i> UICC 295 umur 14 hari dalam medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% pada suhu 28° C.....	65
Lampiran 10.	Hasil pengukuran konidia dan hifa <i>M. majus</i> UICC 295 umur 14 hari dalam medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 15% pada suhu 28° C.....	66
Lampiran 11.	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.....	67
Lampiran 12.	Hasil uji ANOVA panjang konidia <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan tepung kitin koloidal.....	68
Lampiran 13.	Hasil uji ANOVA lebar konidia <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan tepung kitin koloidal.....	68
Lampiran 14.	Hasil uji ANOVA lebar hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan tepung kitin koloidal.....	68
Lampiran 15.	Hasil <i>multiple comparisons</i> menggunakan uji Tukey panjang konidia, lebar konidia, dan lebar hifa <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung kitin koloidal.....	69
Lampiran 16.	Berat badan larva yang masih hidup pada kelompok kontrol (g).....	70
Lampiran 17.	Berat larva yang masih hidup setelah aplikasi pada pengujian suspensi konidia/hifa <i>M. majus</i> UICC 295 dalam SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% pada suhu 28 °C kondisi gelap (g).....	71
Lampiran 18.	Berat larva 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 (g).....	72
Lampiran 19.	Hasil TPC <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi pada -80° C menggunakan akuades (kontrol).....	73
Lampiran 20.	Hasil TPC <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi menggunakan krioprotektan gliserol 10% (v/v).....	75
Lampiran 21.	Hasil TPC <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi menggunakan krioprotektan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan maltosa 5% (b/v).....	77
Lampiran 22.	Hasil TPC <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) setelah preservasi pada -80° C menggunakan akuades (kontrol).....	79
Lampiran 23.	Hasil TPC <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) setelah preservasi menggunakan krioprotektan gliserol 10% (v/v).....	81
Lampiran 24.	Hasil TPC <i>M. majus</i> UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) setelah preservasi menggunakan krioprotektan gliserol 10% (v/v) dan maltosa 5% (b/v).....	83

BAB 1

PENDAHULUAN

Penggunaan insektisida kimia diketahui memiliki efek yang negatif bagi lingkungan dan dapat menimbulkan resistensi pada serangga hama. Oleh karena itu, penggunaan agen biologis sebagai pengendali serangga hama menjadi pilihan alternatif (Huang dkk. 2005: 137). Kapang entomopatogen adalah salah satu contoh agen biologis yang dapat menyebabkan kematian pada serangga, dan umum digunakan untuk mengurangi populasi serangga hama (Shah 2003: 413).

Kapang entomopatogen dapat menginfeksi inang melalui kontak pada permukaan kulit (integumen) (Sembel 2010: 164), bagian mulut, bagian antar segmen, dan spirakel yang memiliki kelembaban cukup tinggi untuk mendukung germinasi spora (Charnley & Collins 2007: 160). Beberapa jenis kapang entomopatogen dapat memproduksi toksin yang dapat menyebabkan kematian inangnya. Contoh kapang-kapang entomopatogen antara lain *Beauveria* (Balsamo) Vuillemin, *Metarhizium* Sorokin, *Paecilomyces* Wize, dan *Nomuraea* Maubl. (Pointing & Hyde 2001: 309 & 315).

Metarhizium majus (Johnst.) Bisch., Rehner & Humber merupakan salah satu jenis kapang entomopatogen. Kapang *M. majus* sebelumnya dikenal sebagai varian dari spesies *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin, yaitu varian *majus* atau *major* (Bischoff dkk. 2009: 512 & 520). Kapang *M. anisopliae* var. *majus* telah dilaporkan menginfeksi *Oryctes rhinoceros* Linnaeus atau dikenal sebagai kumbang badak (Hochberg & Waage 1991: 526), khususnya larva dari *Oryctes* (Nishi dkk. 2010: 19). *Metarhizium anisopliae* var. *majus* mampu memproduksi enzim kitinase yang dapat mengurai ikatan kimiawi jaringan kutikula pada *Oryctes rhinoceros* (Hochberg & Waage 1991: 526).

Hama *Oryctes rhinoceros* L. (*Coleoptera: Scarabaeidae*) merupakan salah satu hama yang banyak menimbulkan kerusakan pada tanaman kelapa dan memiliki jumlah populasi yang tinggi sepanjang tahun. Di Indonesia, hama tersebut menyebar hampir di seluruh provinsi karena adanya ketersediaan inang dan tumpukan bahan organik lapuk di lapangan sebagai tempat berkembangbiak

dan sumber makanan kumbang tersebut. Kerugian akibat serangan *O. rhinoceros* pada tahun 2004 diperkirakan mencapai Rp 11.146.198.961.940,- sehingga perlu mendapat perhatian agar kerugian lebih besar dapat dihindari (Sambiran & Hosang 2007: 2). Infeksi *Metarhizium* pada hama *O. rhinoceros* ditandai dengan munculnya konidia berwarna hijau yang menutupi permukaan tubuh inang saat inang sudah mengalami kematian (Sembel 2010: 178).

Konidia kapang entomopatogen hasil isolasi langsung dari hama yang terinfeksi umumnya memiliki virulensi tinggi. Namun demikian, penurunan ekspresi gen yang berhubungan dengan proses infeksi dapat terjadi pada konidia yang ditumbuhkan pada medium artifisial. Hal tersebut dapat terjadi karena adanya perbedaan komposisi nutrisi pada medium artifisial dengan komposisi nutrisi pada substrat alami. Ekspresi gen tersebut dapat distimulasi saat kultivasi dengan cara meniru komposisi nutrisi substrat alami kapang (Hutwimmer dkk. 2008: 2026--2027).

Salah satu bentuk ekspresi gen adalah sintesis enzim (Brooker dkk. 2008: 326). Produksi enzim pada mikroorganisme dipengaruhi oleh keberadaan substrat di sekitarnya. Beberapa enzim disekresikan hanya jika terdapat substrat yang spesifik digunakan oleh mikroorganisme tersebut (Sin 2008: 2). Kitin merupakan substrat yang spesifik didegradasi oleh kapang *M. anisopliae* dan merupakan sumber karbon dan nitrogen yang penting bagi pertumbuhan kapang tersebut. Penambahan substrat kitin pada medium dapat menginduksi enzim kitinase pada *M. anisopliae* (Baretto dkk. 2004 : 103). Enzim kitinase diketahui merupakan salah satu faktor penentu kemampuan infeksi kapang entomopatogen. Kitinase berperan dalam penetrasi kapang entomopatogen ke dalam tubuh inang (Leger dkk. 1995: 907).

Berdasarkan Herlinda dkk. (2006: 72), penambahan substrat kitin pada medium pertumbuhan juga diketahui dapat meningkatkan kerapatan spora kapang entomopatogen. Biakan kapang *Beauveria bassiana* yang diberi penambahan substrat kitin berupa tepung jangkrik diketahui memiliki kerapatan spora yang lebih tinggi dibandingkan dengan biakan yang tidak ditambahkan substrat kitin. Kerapatan spora tersebut meningkat dari $4,69 \times 10^8$ CFU/ml menjadi $5,84 \times 10^8$ CFU/ml. Menurut Prayogo dkk. (2005: 22), kerapatan konidia berkorelasi dengan

virulensi. Umumnya, semakin tinggi kerapatan konidia maka semakin tinggi pula tingkat mortalitas serangga yang diuji.

Aplikasi fungi entomopatogen terhadap serangga uji dapat dilakukan dengan kontak langsung. Pada aplikasi kontak langsung konidia dapat langsung menempel, berkecambah dan melakukan penetrasi pada bagian antar ruas tubuh serangga yang kondisi kelembabannya sangat mendukung perkecambahan konidia (Desyanti dkk. 2007: 75). Hasil penelitian Desyanti dkk. (2007: 74) menunjukkan bahwa aplikasi kapang *M. brunneum* dengan metode kontak dapat menyebabkan mortalitas 100% terhadap rayap *Coptotermes gestroi* Wasmann dalam 1 minggu. Berdasarkan Prayogo dkk. (2005: 20--23), dalam pengujian kapang entomopatogen terhadap serangga uji perlu diperhatikan faktor-faktor lingkungan seperti suhu, pH, kelembaban, dan paparan sinar ultraviolet. *Metarhizium anisopliae* tumbuh optimal pada suhu 22--27° C dan kelembaban 90%.

Biakan *M. majus* UICC 295 telah diketahui memiliki potensi sebagai agen pengendali serangga hama sehingga perlu untuk dipreservasi. Berdasarkan Nakasone dkk. (2004: 37, 41), tujuan dilakukan preservasi adalah untuk menjaga viabilitas, karakteristik morfologi, fisiologi, dan genetik biakan dari waktu ke waktu. Preservasi menggunakan substrat jaringan tumbuhan atau serangga umum dilakukan pada fungi patogenik. Preservasi fungi pada substrat tersebut dilakukan dengan cara mengeringkan substrat kemudian disimpan pada suhu rendah. Salah satu contoh metode preservasi pada suhu rendah adalah metode *freezing*. Metode *freezing* memiliki beberapa keuntungan, salah satunya adalah biakan dapat disimpan dalam jangka waktu yang panjang. Metode *freezing* dapat dilakukan pada suhu -80° C menggunakan krioprotektan.

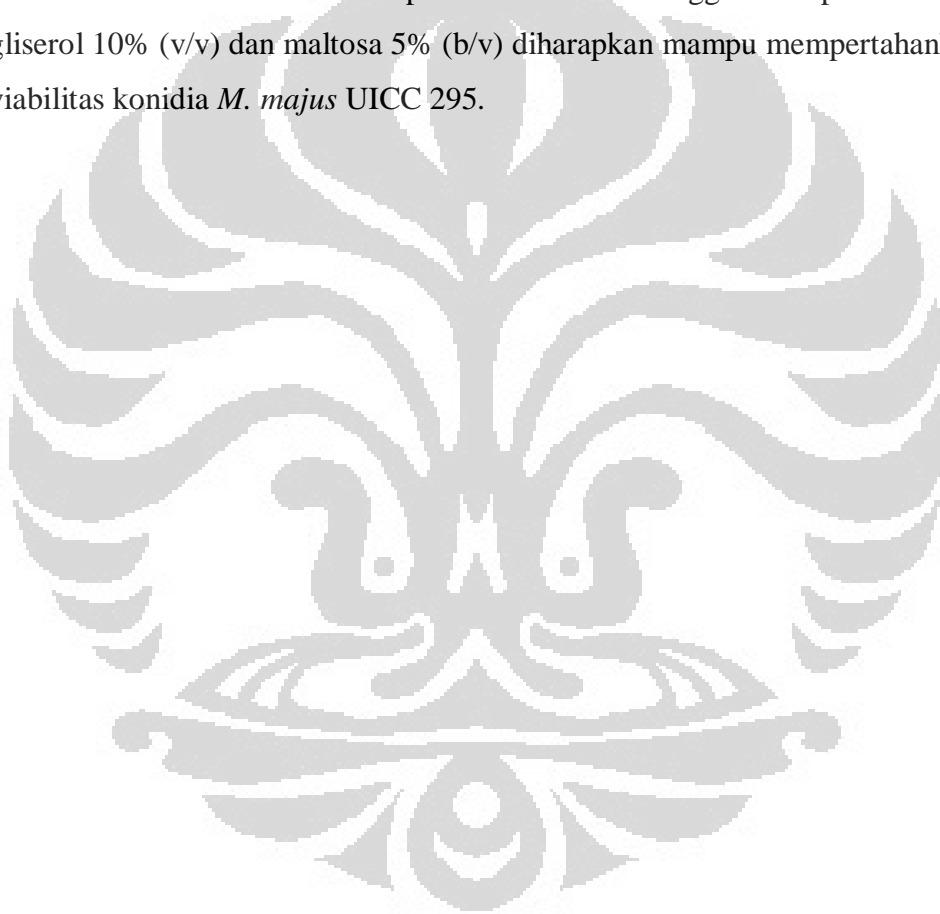
Krioprotektan adalah senyawa yang dapat melindungi sel atau jaringan dari kerusakan akibat *freezing* saat preservasi. Gliserol merupakan jenis krioprotektan yang sering digunakan untuk melindungi sel atau jaringan yang dipreservasi pada suhu rendah. Gliserol merupakan *penetrating agent* yang dapat berdifusi ke dalam sel dan dapat menggantikan cairan intraseluler. Gliserol memiliki titik beku yang lebih rendah daripada air sehingga dapat mengurangi pembentukan kristal es di dalam sel. Senyawa sakarida seperti maltosa, sukrosa, laktosa, dan glukosa merupakan krioprotektan yang tidak dapat berpenetrasi ke

dalam sel (*non-penetrating agent*) karena memiliki ukuran molekul yang besar. Senyawa sakarida berfungsi untuk menghindari sel dari *osmotic shock* pada saat *thawing*. *Osmotic shock* terjadi saat tekanan osmotik intraseluler lebih besar dari ekstraseluler sehingga dapat menyebabkan sel mengalami lisis (Swain & Smith 2010: 24—29). Perpaduan antara *penetrating cryoprotectant* dan *non-penetrating cryoprotectant* diketahui dapat menimbulkan efek sinergik sehingga dapat melindungi sel lebih baik jika dibandingkan dengan penggunaan salah satu macam krioprotektan. Krioprotektan gliserol 10% (v/v) yang ditambahkan dengan maltosa 5% (b/v) diketahui memiliki efek perlindungan yang lebih baik, ditandai dengan viabilitas konidia yang lebih tinggi, terhadap khamir *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen, beberapa spesies bakteri, dan alga *Scenedesmus* Meyen dibandingkan dengan penggunaan gliserol 10% tanpa penambahan maltosa (Hubalek 2003: 216).

Hasil prapenelitian menunjukkan *M. majus* UICC 295 tumbuh lebih baik pada medium *Saboraud Dextrose with Yeast Extract Agar* (SDYA) yang ditambahkan substrat kitin koloidal 10% (b/v) dibandingkan pada medium SDYA saja tanpa diberi penambahan kitin. Hal tersebut ditandai dengan ukuran koloni kapang yang lebih besar pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v). Dari hasil prapenelitian diketahui diameter koloni rata-rata *M. majus* UICC 295 umur 5 hari pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% lebih besar 43,11% dibandingkan ukuran koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA tanpa penambahan kitin. Namun demikian, kemampuan infeksi *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada substrat kitin koloidal 10% terhadap larva *O. rhinoceros* belum diketahui. Belum diketahui pula pengaruh preservasi pada suhu -80° C menggunakan protektan gliserol 10% (v/v) dan maltosa 5% (b/v) terhadap viabilitas konidia kapang *M. majus* UICC 295. Oleh karena itu, penelitian mengenai kemampuan *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan substrat kitin koloidal 10% dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros* perlu dilakukan. Perlu dilakukan pula penelitian mengenai pengaruh preservasi pada suhu -80° C menggunakan protektan gliserol 10% dan maltosa 5% (b/v) terhadap viabilitas konidia kapang *M. majus* UICC 295.

Hipotesis penelitian ini adalah penambahan substrat kitin koloidal 10% (b/v) pada medium pertumbuhan dapat meningkatkan kemampuan *M. majus* UICC 295 dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros*. Preservasi pada suhu -80°C menggunakan protektan gliserol 10% (v/v) dan maltosa 5% (b/v) dapat menjaga viabilitas konidia kapang *M. majus* UICC 295.

Hasil yang diharapkan dari penelitian ini adalah mendapatkan substrat yang sesuai bagi pertumbuhan *M. majus* UICC 295 dan dapat meningkatkan kemampuan *M. majus* UICC 295 sebagai biokontrol serangga hama, khususnya hama *O. rhinoceros*. Preservasi pada suhu -80°C menggunakan protektan gliserol 10% (v/v) dan maltosa 5% (b/v) diharapkan mampu mempertahankan viabilitas konidia *M. majus* UICC 295.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 KAPANG ENTOMOPATOGEN

Fungi merupakan mikroorganisme eukariotik yang tumbuh sebagai hifa atau sel tunggal dan tidak memiliki klorofil (Gandjar dkk. 2006: 3). Fungi adalah organisme heterotrof yang dapat bersifat saprofit atau parasit. Fungi saprofit memperoleh nutrisi dengan menyerap materi organik dari organisme mati. Fungi parasitik memperoleh nutrisi dengan menyerap materi organik dari organisme hidup (Campbell dkk. 2003: 186). Fungi dapat melakukan reproduksi seksual dan/atau aseksual (Gandjar dkk. 2006: 3). Fungi yang belum diketahui bentuk seksualnya disebut anamorfo, sedangkan fungi yang telah diketahui bentuk seksualnya disebut teleomorfo (Webster & Weber 2007: 32).

Fungi dibagi ke dalam lima filum berdasarkan analisis filogenetik dengan 18S rDNA dan perbedaan morfologi alat reproduksi seksual, yaitu *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*, *Ascomycota*, dan *Basidiomycota* (Sumbali & Mehrotra 2009: 430). Secara morfologi, fungi dibagi ke dalam tiga kelompok yaitu cendawan, kapang, dan khamir. Kapang merupakan fungi multiseluler yang membentuk filamen panjang dan bercabang. Filamen tersebut disebut sebagai hifa (Talaro 2009: 134).

Kapang entomopatogen merupakan kapang yang dapat menginfeksi dan menyebabkan kematian pada serangga. Kapang entomopatogen umum digunakan untuk mengurangi populasi serangga hama (Shah 2003: 413). Mekanisme infeksi kapang entomopatogen dapat dibagi ke dalam empat tahap. Tahap pertama adalah penempelan konidia kapang pada permukaan tubuh serangga. Tahap kedua adalah perkecambahan kapang pada integumen serangga. Tahap ketiga adalah penetrasi. Penetrasi dilakukan secara kimiawi dengan mengeluarkan enzim. Tahap keempat adalah destruksi pada titik penetrasi dan terbentuknya spora yang kemudian beredar ke dalam hemolimfa dan membentuk hifa untuk menyerang jaringan lainnya (Prayogo dkk. 2005: 21).

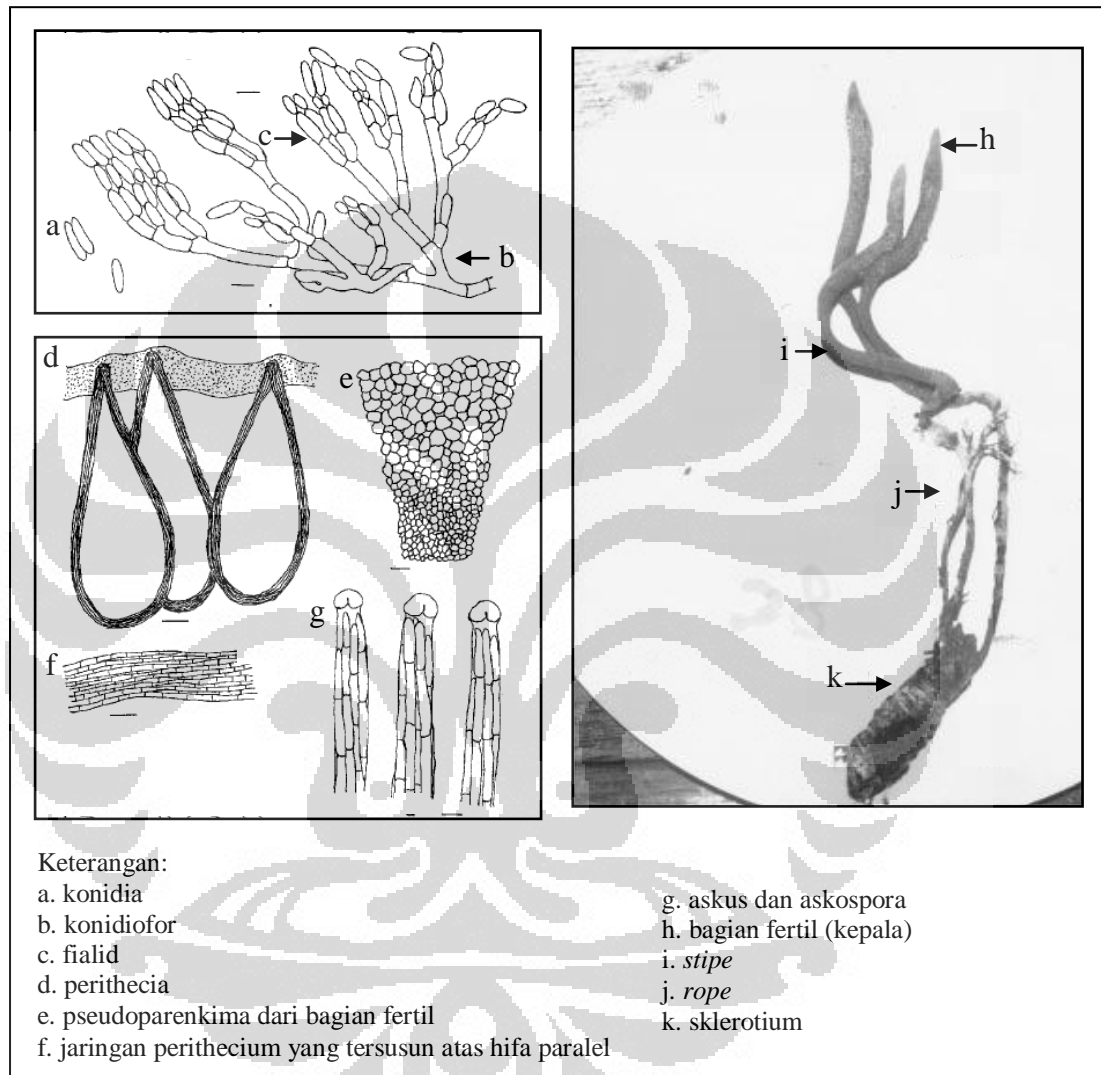
Kapang *Metarhizium anisopliae* merupakan salah satu kapang entomopatogen yang ditemukan pada serangga. Kapang *M. anisopliae* diketahui dapat menginfeksi beberapa jenis serangga dari ordo *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Homoptera*, *Hemiptera*, dan *Isoptera* (Prayogo 2006: 48). Kapang *M. anisopliae* diketahui menghasilkan destruksin. Destruksin merupakan senyawa heksadepsipeptida siklik yang terdiri dari asam α -hidroksil dan lima residu asam amino. Berdasarkan perbedaan gugus metilnya, destruksin dibagi menjadi destruksin A, B, B2, C, dan E (Male dkk. 2009: 1447). Destruksin dapat melumpuhkan dan mematikan serangga. Destruksin menyebabkan terjadinya kelumpuhan otot dengan meningkatkan konsentrasi ion Ca^{2+} pada miofibril sehingga terjadi kontraksi otot secara terus menerus (Samuels 1998: 230 & 234).

Wang dan Leger (2006: 6648) melaporkan bahwa kapang *M. anisopliae* diketahui memiliki mekanisme dalam mengelabui sistem imun serangga inang. Mekanisme tersebut salah satunya berhubungan dengan gen *Mcl1* (*Metarhizium collagen-like*) yang terdapat pada badan hifa. Protein yang terbentuk dari ekspresi gen *Mcl1* berfungsi sebagai lapisan pelindung terhadap fagositosis dan enkapsulasi karena dapat mengubah komponen dinding sel, sehingga dinding sel kehilangan sifat imunogeniknya. Protein yang diekspresikan oleh gen *Mcl1* bersifat hidrofilik, sehingga menyebabkan badan hifa dapat bergerak bebas di dalam hemolimfa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen *Mcl1* terekspresi pada hemolimfa beberapa jenis serangga, salah satunya *Madunca sexta* Linnaeus. Transkripsi *Mcl1* mulai terlihat pada menit ke-20 setelah induksi *M. anisopliae* ke dalam hemolimfa *Madunca sexta*. Namun gen *Mcl1* tidak terekspresi pada medium artifisial kaya nutrisi maupun pada kondisi kekurangan nutrisi. Hal tersebut menandakan bahwa gen *Mcl1* merupakan gen yang spesifik untuk ekspresi patogenesis.

2.2 KAPANG *Metarhizium majus*

Metarhizium majus (Johnst.) Bisch., Rehner & Humber merupakan spesies kapang yang sebelumnya dikenal sebagai varian dari spesies *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin, yaitu varian *majus* atau *major*. Perubahan nama

spesies dari *M. anisopliae* var. *majus* menjadi *M. majus* dilakukan berdasarkan pendekatan filogenetik multigen menggunakan sekuens gen *elongation factor 1-alpha* (EF-1 α), *RNA polymerase largest subunit* (RPB1), *RNA polymerase second largest subunit* (RPB2) dan β -tubulin.



Gambar 2.2 *Metarhizium anisopliae* var. *majus* (kiri atas) dan *Cordyceps brittlebankisoides* (kiri bawah dan kanan)
[Sumber: Liu dkk. 2001: 180]

Klarifikasi taksa dari genus *Metarhizium* juga dilakukan dengan mengevaluasi karakter morfologi. Berdasarkan klarifikasi taksa tersebut diketahui genus *Metarhizium* terdiri dari beberapa spesies, yaitu *M. anisopliae*, *M. pingshaense*, *M. majus*, *M. acridum*, *M. lepidotae*, *M. globosum*, *M. robertsii*, *M.*

brunneum, dan *M. taii* yang kemudian diketahui merupakan sinonim dari *M. guizhouense* (Bischoff dkk. 2009: 512).

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

Kingdom : *Eumycota*

Filum : *Dikaryomycota*

Subfilum : *Ascomycotina*

Kelas : *Sordariomycetes*

Ordo : *Hypocreales*

Suku : *Clavicipitaceae*

Marga : *Metarhizium*

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

Kapang *Metarhizium* dapat ditemukan dan diisolasi dari tanah maupun dari serangga yang telah terinfeksi kapang tersebut (Gopal dkk. 2006: 1802).

Metarhizium majus yang diisolasi dari *Coleoptera* pada medium SDYA umur 4 hari memiliki ukuran konidia (10,00--14,5) x (2,5--4,0) μm dan berwarna *olive*, ukuran fialid (10,00--17,0) x (2,5--4,0) μm (Bischoff dkk. 2009: 516).

Berdasarkan Rosadi (2011: 26), kapang *M. majus* UICC 295 yang berumur 18 hari pada medium *Saboraud Dextrose Yeast Extract Agar* (SDYA) suhu 22°--25° C memiliki karakter morfologi miselium berwarna putih, tekstur koloni *granular*, sebalik koloni berwarna hialin, terdapat zona pertumbuhan dan tetes eksudat, tidak memiliki zonasi dan jari-jari koloni. Konidia berbentuk lonjong dengan kisaran panjang 8,26--11,13 μm dan lebar 2,42--3,37 μm . Konidia berwarna hijau *olive*. Hifa kapang memiliki kisaran lebar 1,49--2,47 μm .

Metarhizium anisopliae var. *majus* diketahui memiliki bentuk teleomorf, yaitu *Cordyceps brittlebankisoides* Zuo Y. Liu, Z.Q. Liang, Whalley, Y.J. Yao & A.Y. Liu. Spesimen *Coleoptera* diperoleh dari atas permukaan tanah. Spesimen *Coleoptera* tersebut telah terinfeksi kapang yang diketahui merupakan *Cordyceps brittlebankisoides*. Biakan yang tumbuh setelah askospora kapang tersebut ditumbuhkan pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) pada suhu 23° C memiliki karakteristik morfologi yang identik dengan *M. anisopliae* var. *majus*. Sekuens DNA *C. brittlebankisoides* juga menunjukkan bahwa *C.*

brittlebankisoides memiliki sekuens DNA ribosomal yang identik dengan *M. anisopliae* var. *majus* (Liu dkk. 2001: 180).

2.3 KUMBANG BADAQ (*Oryctes rhinoceros*)

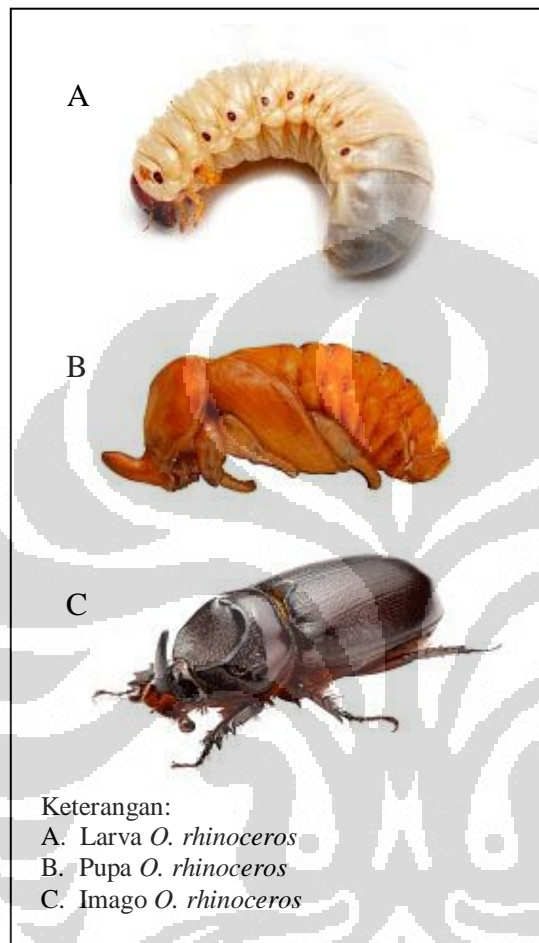
Oryctes rhinoceros Linn. (*Coleoptera: Dynastidae*) atau dikenal sebagai kumbang badak merupakan salah satu hama yang banyak menimbulkan kerugian pada tanaman kelapa (*Cocos nucifera* Linn.) (Sambiran & Hosang 2007: 2). Kumbang *O. rhinoceros* menyerang bagian daun muda yang belum terbuka pada tanaman kelapa. Kumbang dewasa akan menggerek ke dalam batang dan memakan bagian daun muda yang masih terlipat, sehingga mengakibatkan anak-anak daun setelah membuka terlihat seperti digunting menyerupai bentuk kipas (Baringbing 1991: 57). Tanda serangan kumbang badak *Oryctes rhinoceros* terlihat pada bekas lubang gerakan pada pangkal batang yang selanjutnya mengakibatkan pelepah daun muda putus dan membusuk kering. Kumbang dapat menyebabkan kematian pada tanaman kelapa sawit jika kumbang tersebut menggerek batang hingga merusak jaringan meristem pada titik tumbuh (Pasaribu & Cheon 2005: 103--104).

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

Kingdom : *Animalia*
 Filum : *Arthropoda*
 Kelas : *Insecta*
 Ordo : *Coleoptera*
 Sub ordo : *Polyphaga*
 Superfamili : *Scarabaeoidea*
 Famili : *Dynastidae*
 Genus : *Oryctes*
 Spesies : *Oryctes rhinoceros* Linnaeus

Kumbang *O. rhinoceros* betina meletakkan telur pada tumpukan sampah organik, kotoran ternak, dan batang kelapa yang sudah lapuk. Telur akan menetas setelah 2 minggu kemudian menjadi larva (Balai Penelitian Kelapa 1989: 7).

Telur *O. rhinoceros* berbentuk lonjong dan berwarna putih dengan panjang 3--3,5 mm dan lebar 2 mm. Menjelang menetas, telur bertambah besar menjadi panjang 4 mm dan lebar 3 mm. Lama stadium telur tersebut adalah 11--13 hari



Gambar 2.3. Tahap hidup *O. rhinoceros*

[Sumber: Publitek 2012: 4]

Larva *O. rhinoceros* yang baru menetas dari telur berwarna putih dan bagian kepala serta tungkai berwarna merah kecokelatan. Panjang tubuh larva yang baru menetas adalah 7--8 mm. Bentuk tubuh larva membengkok dan bagian abdomen berbentuk menyerupai kantung. Badan larva ditumbuhi rambut-rambut pendek. Larva yang sudah dewasa memiliki panjang 60--105 mm dan lebar 25 mm. Stadium larva membutuhkan waktu 2--4 bulan untuk berkembang, dan kemudian larva akan beralih ke fase istirahat (pupa) (Departemen Pertanian 1993: 1--2). Larva instar I diketahui paling rentan terhadap infeksi kapang *Metarhizium*

karena lapisan integumen serangga masih sangat tipis, sehingga kapang sangat mudah melakukan penetrasi (Prayogo dkk. 2005: 23).

Serangga diketahui memiliki respon imun terhadap infeksi mikroba parasit maupun patogen. Respon imun tersebut dipicu oleh keberadaan antigen *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) yang terdapat pada mikroba. PAMPs dapat berupa lipopolisakarida, mannan, dan peptidoglikan (Schmid-Hempel 2005: 531), serta β -1,3-glukan yang terdapat pada dinding sel fungi (Wang & Leger 2006: 6647). Tubuh serangga akan menginisiasi respon imun seluler maupun humoral setelah mengenali antigen. Respon tersebut berupa opsonisasi, fagositosis, melanisasi, enkapsulasi, dan koagulasi (Schmid-Hempel 2005: 531).

Pada opsonisasi, senyawa lektin yang dihasilkan oleh tubuh serangga akan menandai antigen pada parasit sehingga mudah dikenali oleh hematosit. Fagositosis oleh hematosit merupakan bentuk mekanisme pertahanan sederhana yang berasosiasi dengan opsonisasi. Melanisasi merupakan mekanisme pertahanan lainnya. Pada mekanisme melanisasi, keberadaan antigen akan menyebabkan tubuh serangga menghasilkan enzim fenoloksidase (PO). Enzim PO mengubah fenol menjadi quinon yang selanjutnya akan berpolimerisasi menjadi melanin. Melanin akan terdeposit pada permukaan tubuh serangga, dan saat hematosit terinduksi oleh melanisasi maka akan terjadi enkapsulasi. Molekul berukuran kecil seperti sel bakteri atau virus dapat dinetralisasi dengan koagulasi yang akan berujung pada pembentukan nodul oleh hemolimfa (Schmid-Hempel 2005: 531).

2.4 MEDIUM DAN SUBSTRAT KITIN

Medium *Sabouraud Dextrose with Yeast Extract Agar* (SDYA) merupakan medium pertumbuhan yang umum digunakan untuk kapang entomopatogen karena terdiri atas sumber nutrisi seperti pepton, glukosa, dan ekstrak khamir (Mueller dkk. 2004: 607). Glukosa merupakan sumber karbon dalam bentuk monosakarida. Pepton merupakan protein yang mengandung asam amino. Pepton berfungsi sebagai sumber karbon dan nitrogen. Ekstrak khamir (*yeast*

extract) mengandung sumber karbon dan nitrogen, serta vitamin untuk pemeliharaan mikroorganisme (Atlas 2004: 2--5).

Kitin merupakan substrat yang spesifik didegradasi oleh kapang *M. anisopliae* dan merupakan sumber karbon dan nitrogen yang penting bagi pertumbuhan kapang tersebut, termasuk elongasi hifa dan germinasi spora (Baretto dkk. 2004 : 103). Kitin yang memiliki ikatan polimer β -1,4 pada N-asetil-D-glukosamin, merupakan jenis polisakarida terbanyak yang terdapat di alam setelah selulosa. Kitin merupakan penyusun dinding sel terbesar pada fungi tingkat tinggi seperti *Chytridiomycota*, *Ascomycota*, dan *Basidiomycota*, dan juga pada eksoskeleton serangga serta *Crustaceae*. Kitinase merupakan enzim hidrolitik yang spesifik mendegradasi substrat kitin. Mikroorganisme memproduksi kitinase umumnya untuk memperoleh senyawa karbon dan/atau nitrogen yang terdapat pada kitin dan sebagai mekanisme proteksi alami (Shanmugaiyah dkk. 2008: 1).

Sumber kitin dari kulit *Crustaceae* seperti udang dan kepiting dapat digunakan dalam pembuatan kitin koloidal. Proses pembuatan kitin koloidal dibagi menjadi dua tahap, yaitu demineralisasi dan deproteinasi. Demineralisasi bertujuan untuk menghilangkan senyawa anorganik yang terdapat pada kulit udang atau kepiting. Kandungan mineral yang terbanyak dalam kulit udang atau kepiting adalah CaCO_3 . Demineralisasi dapat dilakukan menggunakan larutan HCl. Deproteinasi bertujuan untuk menghilangkan protein pada kulit udang atau kepiting. Deproteinasi dapat dilakukan menggunakan larutan NaOH (Hendri 2008: 274--276).

Penambahan substrat kitin ke dalam suatu medium dapat menginduksi enzim kitinase yang penting digunakan dalam biokontrol serangga hama (Herlinda dkk. 2010: 138). Enzim kitinase diketahui merupakan salah satu faktor penentu kemampuan infeksi kapang entomopatogen. Kitinase berperan dalam penetrasi kapang entomopatogen ke dalam tubuh inang (Leger dkk. 1995: 907). Herlinda dkk. (2006: 72) melaporkan bahwa penambahan substrat kitin dapat mempengaruhi kerapatan spora kapang entomopatogen. Biakan kapang *B. bassiana* yang diberi penambahan substrat kitin berupa tepung jangkrik diketahui memiliki kerapatan spora yang lebih tinggi dibandingkan dengan biakan yang

tidak ditambahkan substrat kitin. Kerapatan spora tersebut meningkat dari $4,69 \times 10^8$ CFU/ml menjadi $5,84 \times 10^8$ CFU/ml. Menurut Prayogo dkk. (2005: 22), kerapatan konidia berkorelasi dengan virulensi. Umumnya, semakin tinggi kerapatan konidia maka semakin tinggi pula tingkat mortalitas serangga yang diuji.

2.5 APLIKASI KONIDIA KAPANG TERHADAP LARVA

Aplikasi kontak langsung merupakan salah satu metode yang dapat digunakan dalam uji infeksi kapang entomopatogen. Desyanti dkk. (2007: 74) melaporkan bahwa aplikasi kapang *M. brunneum* dengan metode kontak dapat menyebabkan mortalitas 100% terhadap *Coptotermos gestroi* dalam 1 minggu. Aplikasi menggunakan metode kontak menyebabkan konidia kapang langsung mengenai tubuh serangga dalam jumlah yang banyak sehingga konidia dengan cepat dapat menempel, berkecambah dan berpenetrasi menembus kutikula serangga sehingga menyebabkan kematian.

Mortalitas serangga dipengaruhi kerapatan konidia kapang yang diaplikasikan. Umumnya, semakin tinggi kerapatan konidia maka semakin tinggi pula tingkat mortalitas serangga yang diuji. Kemampuan infeksi kapang entomopatogen juga dipengaruhi oleh frekuensi aplikasi. Aplikasi *M. anisopliae* sebanyak satu kali telah dilaporkan mampu menyebabkan kematian serangga uji sebanyak 40%, namun tingkat mortalitas serangga uji dapat meningkat hingga 83% bila aplikasi ditingkatkan menjadi tiga kali berturut-turut selama 3 hari (Prayogo dkk. 2005: 22).

Kapang entomopatogen setelah diaplikasikan memerlukan kelembaban yang tinggi untuk tumbuh dan berkembang. Kelembaban udara yang tinggi diperlukan selama proses pembentukan tabung kecambah (*germ tube*), sebelum terjadi penetrasi ke integumen serangga. Kelembaban di atas 90% selama 6--12 jam setelah aplikasi dibutuhkan kapang untuk melakukan penetrasi ke dalam tubuh serangga. Kapang entomopatogen umumnya rentan terhadap paparan sinar matahari khususnya sinar ultra violet. Jika terlalu lama terpapar sinar ultra violet, viabilitas dari kapang tersebut dapat mengalami penurunan. Oleh karena itu,

dalam aplikasi kapang entomopatogen terhadap serangga uji sebaiknya menghindari paparan sinar matahari langsung (Prayogo 2005: 49).

2.6 PRESERVASI

Berdasarkan Nakasone dkk. (2004: 37, 41), preservasi adalah upaya untuk menjaga viabilitas, karakteristik morfologi, fisiologi, dan genetik biakan dari waktu ke waktu. Preservasi fungi dapat digolongkan menjadi dua berdasarkan waktu penyimpanannya, yaitu preservasi jangka pendek (*short-term preservation*) dan preservasi jangka panjang (*long-term preservation*). Preservasi jangka pendek melibatkan pemeliharaan biakan sampai dengan satu tahun. Preservasi jangka pendek dapat dilakukan dengan transfer biakan ke medium baru secara berulang, kemudian biakan tersebut disimpan pada suhu ruang atau suhu 4° C. Sebagian besar fungi berfilamen dapat bertahan selama 1--2 tahun pada suhu 4° C. Kelebihan dari preservasi jangka pendek adalah mudah dilakukan dan relatif murah karena tidak memerlukan peralatan khusus. Kekurangan preservasi jangka pendek adalah rentan kontaminasi dan dapat terjadi perubahan morfologis maupun fisiologis pada biakan (Nakasone dkk. 2004: 38).

Preservasi jangka panjang melibatkan pemeliharaan biakan lebih dari satu tahun. Ada beberapa metode yang dapat digunakan dalam preservasi jangka panjang. Metode-metode tersebut antara lain preservasi pada substrat tanah atau minyak, kriopreservasi menggunakan nitrogen cair maupun dengan penyimpanan isolat pada suhu rendah (di bawah -20° C), dan liofilisasi (*freeze-drying*) (Espinell-Ingroff dkk. 2004: 1257). Metode preservasi jangka panjang lainnya yaitu, preservasi propagul, imersi isolat pada akuades, dan juga preservasi dengan substrat organik. Preservasi dengan substrat organik dapat dilakukan menggunakan substrat kulit kayu, biji gandum, dan juga jaringan tumbuhan atau serangga. Preservasi fungi pada substrat tersebut dilakukan dengan cara mengeringkan substrat kemudian disimpan pada suhu rendah. Keuntungan preservasi jangka panjang adalah biakan dapat disimpan dalam waktu yang lama dan tidak rentan terhadap kontaminasi. Kerugian dari preservasi jangka panjang

adalah memerlukan peralatan khusus dan juga krioprotektan sehingga relatif lebih mahal (Nakasone dkk. 2004: 38--40).

Penyimpanan isolat fungi pada suhu rendah memerlukan krioprotektan. Krioprotektan adalah senyawa yang berfungsi untuk melindungi dari kerusakan membran sel akibat pembentukan kristal es pada saat *freezing* dan juga untuk menjaga tekanan osmotik sel sehingga morfologi sel dapat terjaga. Dua macam protektan yang umum digunakan dalam preservasi fungi yaitu gliserol dan *dimethyl sulfoxide* (DMSO). Gliserol dan DMSO dapat berpenetrasi ke dalam sel sehingga dapat melindungi bagian intraseluler maupun ekstraseluler. Protektan lainnya yaitu sukrosa, maltosa, laktosa, glukosa, manitol, sorbitol, dekstran, *polyvinyl-pyrrolidone*, dan *hydroxyethyl starch* tidak dapat berpenetrasi ke dalam sel sehingga hanya melindungi bagian luar membran sel (Nakasone dkk. 2004: 41). Biakan fungi yang telah dipreservasi dapat dikatakan *viable* apabila biakan tetap dapat mengalami pertumbuhan setelah dipreservasi serta morfologi koloni biakan tersebut sama dengan biakan sebelum dipreservasi (Espinell-Ingroff dkk. 2004: 1257).

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 LOKASI DAN WAKTU

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

3.2 ALAT

Alat-alat yang digunakan adalah lemari pendingin [GASSIO], kompor listrik [Sanyo], oven [Heraeus], autoklaf [Hirayama], pemanas air [SHARP], timbangan digital [AND EW-300 G, ACIS BC-500, dan ACIS MN-200], timbangan analitik [Sartorius], vorteks [Bio-Rad], mikropipet [Gilson, Biohit Proline, dan V.A. Howe], *tips*, mikroskop stereo [Carl ZEISS], mikroskop trinokular [Carl ZEISS], blender (Philips), inkubator statis [Imperial III], lemari pendingin [AMB-HI-LO], *deep freezer* [Sanyo], *cryotubes* [Biologix], blender [Miyako BL15], kamera digital [Canon IXY DIGITAL 910iS], ayakan, termometer ruang, kotak plastik berukuran 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.

3.3 BAHAN

3.3.1 Mikroorganisme

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

3.3.2 Larva *O. rhinoceros*

Larva *O. rhinoceros* beserta pakan diperoleh dari peternakan sapi milik rakyat di Desa Rajagaluh, Kabupaten Majalengka, Jawa Barat.

3.3.3 Medium

Medium yang digunakan untuk pertumbuhan, pemeliharaan dan pemurnian adalah *Saboraud Dextrose Agar with Yeast Extract* (SDYA) yang ditambahkan substrat kitin koloidal.

3.3.4 Kitin koloidal

Kitin koloidal yang digunakan dalam pembuatan medium diperoleh dari PT. Biotech Surindo.

3.3.5 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah glukosa, pepton, *yeast extract*, agar, antibiotik tetrasiklin [Kimia Farma], kloramfenikol [Wako], triton X-100 [BDH], gliserol [Merck], maltosa, alkohol 70% teknis, spiritus teknis, *lactofenol cotton blue*, dan aseton teknis.

3.3.6 Bahan Habis Pakai

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

3.4 CARA KERJA

Skema kerja dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.4.1 Pembuatan medium *Saboraud Dextrose Agar with Yeast Extract* (SDYA) dan medium SDYA dengan substrat kitin

Pembuatan medium SDYA untuk pertumbuhan dan pemeliharaan kapang *M. majus* UICC 295 dilakukan berdasarkan Desyanti dkk. (2007: 69). Bubuk glukosa sebanyak 10 g, pepton 2,5 g, *yeast extract* 2,5 g, dan agar 20 g ditambahkan akuades hingga volume total mencapai 1 L. Medium kemudian dipanaskan hingga larut. Medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium steril ditambahkan antibiotik tetrasiklin sebanyak 500 mg pada saat suhu medium berkisar 45--50 °C. Medium dikocok hingga homogen, dituang secara aseptis ke dalam cawan petri masing-masing sebanyak 20 ml dan dibiarkan mengeras.

Pembuatan medium SDYA miring untuk pemeliharaan kapang dilakukan dengan menambahkan 0,2 g kloramfenikol yang telah dilarutkan dalam satu ml ethanol p. a. 96% ke dalam medium yang telah dipanaskan. Medium dipindahkan ke dalam tabung reaksi, masing-masing sebanyak 5 ml. Medium kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium steril dalam tabung reaksi kemudian diletakkan pada papan yang dimiringkan, lalu dibiarkan mengeras.

Pembuatan medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal dilakukan dengan menambahkan 10% (w/v) tepung kitin koloidal ke dalam erlenmeyer yang berisi medium SDYA. Sebanyak 200 mg/1.000 ml kloramfenikol yang telah dilarutkan dalam 1 ml ethanol p. a. 70% dimasukkan ke dalam medium yang telah dididihkan. Medium kemudian disterilkan menggunakan autoklaf dan dikocok hingga homogen sebelum dituang secara aseptis ke dalam cawan petri, masing-masing sebanyak 20 ml. Medium kemudian dibiarkan mengeras sebelum digunakan.

3.4.2 Pemeliharaan dan penyimpanan isolat kapang

Pemeliharaan dan penyimpanan isolat kapang dilakukan berdasarkan Benson (2001: 152) dan Hogg (2005: 89). Pemeliharaan dan penyimpanan isolat

kapang dilakukan dengan membuat *stock culture* dan *working culture*. Koloni kapang diinokulasikan masing-masing ke dalam dua tabung berisi medium SDYA sebagai *stock culture* dan *working culture*. *Stock culture* dan *working culture* dibuat dengan memindahkan koloni kapang ke dalam tabung 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 bersporulasi penuh. Biakan kapang *working culture* diinkubasi pada suhu 25--27° C.

3.4.3 Pengamatan morfologi kapang

Pengamatan morfologi kapang dilakukan berdasarkan Talaro (2009: 142). Pengamatan morfologi kapang dilakukan secara makroskopik dan mikroskopik. Kapang ditumbuhkan pada medium SDYA yang ditambahkan substrat kitin dalam cawan petri dengan teknik *stab*. Pengamatan morfologi secara makroskopik yang dilakukan meliputi warna koloni berdasarkan standar warna Faber Castell (Lampiran 7.), 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. Hal-hal yang perlu diamati pada pengamatan morfologi secara mikroskopik adalah bentuk konidia, mengukur panjang dan lebar konidia, serta diameter hifa. Pengukuran panjang dan lebar konidia serta diameter hifa dilakukan menggunakan mikroskop trinokular dengan perbesaran 400x.

3.4.4 Enumerasi konidia kapang

Enumerasi konidia kapang menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) dilakukan berdasarkan Hogg (2005: 91--93). Biakan kapang berumur 15 hari pada medium SDYA miring dan medium SDYA miring yang diberi penambahan substrat kitin koloidal 10% (b/v) 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 disebarakan 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 22--25 °C dengan kondisi gelap. Jumlah CFU/ml sampel dihitung berdasarkan Cappuccino dan Sherman (1996: 119) dengan rumus:

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

Enumerasi konidia kapang menggunakan hemositometer dilakukan berdasarkan Herlinda dkk. (2006: 71). Biakan kapang yang telah bersporulasi penuh pada medium SDYA miring dan medium SDYA miring dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) dibuat suspensi dengan menambahkan 5 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:

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

Keterangan: Jumlah kotak = 5 kotak besar x 16 kotak kecil

0,25 = faktor koreksi penggunaan kotak sampel skala kecil pada hemositometer

3.4.5 Persiapan larva untuk pengujian

Larva *O. rhinoceros* dipelihara di dalam ruangan dengan kondisi gelap, pada suhu berkisar 25--27 °C, dan kelembaban 84--97%. Larva *O. rhinoceros* beserta pakan ditempatkan dalam kotak plastik berukuran panjang 14,5 cm, lebar 9,5 cm, dan tinggi 6 cm dengan tutup yang diberi lubang. Pemberian pakan pada larva dilakukan setiap tiga hari sebanyak 10 g pakan larva. Larva dikelompokkan terlebih dahulu berdasarkan berat awal tubuh larva. Pengelompokan tersebut bertujuan agar larva pada masing-masing kelompok perlakuan memiliki berat yang seragam. Larva dikelompokkan menjadi 3 kelompok perlakuan dan 3 kelompok kontrol. Setiap kelompok terdiri atas 10 ekor larva dengan kisaran berat tertentu.

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

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

3.4.7 Pengujian konidia kapang *M. majus* UICC 295 terhadap larva *O. rhinoceros* dengan aplikasi kontak langsung

Pengujian konidia kapang *M. majus* UICC 295 terhadap larva *O. rhinoceros* diawali dengan pembuatan suspensi kapang. Suspensi dibuat dengan menambahkan 5 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 dihomogenkan menggunakan vorteks. Sebanyak 1 ml suspensi kapang *M. majus* UICC 295 yang tumbuh pada medium SDYA dengan penambahan tepung kitin koloidal 10% (b/v) masing-masing diteteskan menggunakan mikropipet pada permukaan tubuh 30 ekor larva. Sebanyak 1 ml

suspensi kapang *M. majus* UICC 295 yang tumbuh pada medium SDYA masing-masing ditetaskan menggunakan mikropipet pada permukaan tubuh 30 ekor larva. Larva pada kelompok kontrol diinokulasi dengan 1 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 dan suhu berkisar antara 25--27 °C. Parameter lingkungan yang diukur adalah kelembaban relatif dan suhu ruang. Kemampuan kapang *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada substrat kitin koloidal 10% (b/v) dalam membunuh larva *O. rhinoceros* akan terlihat bila terjadi kematian pada larva yang diaplikasikan dengan suspensi kapang tersebut. Persentase kematian larva dihitung berdasarkan Ihsan dan Octriana (2009: 64) dengan rumus:

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

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

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

3.4.8 Preservasi kapang *M. majus* UICC 295 dalam gliserol 10% dan maltosa 5% pada suhu -80° C

Pembuatan larutan gliserol dan prosedur preservasi dilakukan berdasarkan Murjito (2010: 22). Larutan yang digunakan untuk preservasi adalah gliserol 10% (v/v). Pembuatan larutan gliserol 10% (v/v) dilakukan dengan memasukkan 10,86 ml larutan gliserol 92,1% dan ditambahkan akuades hingga

volume mencapai 100 ml. Larutan dipindahkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak lima ml. Larutan tersebut kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan dua atm selama 15 menit.

Larutan yang digunakan sebagai krioprotektan selain gliserol 10% (v/v) adalah gliserol 10% (v/v) dengan penambahan maltosa 5% (b/v). Pembuatan larutan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan maltosa 5% (b/v) diawali dengan pembuatan larutan *stock* gliserol 20% (v/v) dan larutan *stock* maltosa 10% (b/v). Sebanyak 21,7 ml gliserol 92,1% ditambahkan akuades hingga mencapai volume total 100 ml, sehingga diperoleh larutan *stock* gliserol 20% (v/v). Sebanyak 10 g maltosa ditambahkan akuades hingga mencapai volume total 100 ml, sehingga diperoleh larutan *stock* maltosa 10% (b/v). Larutan *stock* gliserol 20% (v/v) dan larutan *stock* maltosa 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* maltosa 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 maltosa 5% (b/v).

Kapang *M. majus* UICC 295 diinokulasi dengan metode *streak* sebanyak 15 gores pada medium miring SDYA dengan penambahan kitin koloidal. Kapang *M. majus* UICC 295 disimpan pada suhu 22--25° C dengan kondisi gelap hingga bersporulasi penuh. Preservasi menggunakan gliserol 10% (v/v) dilakukan dengan menambahkan lima ml larutan gliserol 10% (v/v) ke dalam biakan kapang, sedangkan preservasi menggunakan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan maltosa 5% (b/v) dilakukan dengan menambahkan lima ml larutan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan maltosa 5% (b/v) ke dalam biakan kapang. Biakan kapang kemudian dikerik menggunakan jarum tanam bulat (ose). Sebanyak satu ml suspensi dimasukkan ke dalam *cryotube* dan diinkubasi terlebih dahulu dalam lemari pendingin pada suhu 4° C selama satu jam kemudian diinkubasi selama 30 hari dalam *deep freezer* dengan suhu -80° C.

Preservasi *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva *Oryctes rhinoceros* dilakukan dengan memasukkan potongan jaringan larva *O. rhinoceros* yang mati karena terinfeksi *M. majus* UICC 295 masing-masing ke dalam *cryotube* yang berisi gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) yang diberi penambahan maltosa

5% (b/v) sebanyak 5 ml. *Cryotube* diinkubasi terlebih dahulu dalam lemari pendingin pada suhu 4° C selama 1 jam dan kemudian diinkubasi selama 1 dan 14 hari dalam *deep freezer* dengan suhu -80° C.

3.4.9 Pengujian viabilitas *M. majus* UICC 295 setelah proses preservasi

Proses *thawing* biakan *M. majus* UICC 295 yang telah dipreservasi dilakukan pada suhu 37° C selama beberapa menit hingga mencair. Konidia kapang *M. majus* UICC 295 dihitung kembali jumlahnya setelah preservasi. Enumerasi dilakukan pada hari ke-0 preservasi sebagai penghitungan jumlah konidia awal, serta pada hari ke-1, ke-14, dan ke-30 setelah preservasi. Enumerasi *M. majus* UICC 295 dari kadaver larva dilakukan pada hari ke-1 dan hari ke-14 setelah preservasi. Enumerasi konidia kapang menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) berdasarkan Madigan dkk. (2012: 129). Suspensi diencerkan dengan akuades steril hingga pengenceran 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, dan 10⁻⁵. Sebanyak 0,1 ml konidia/hifa kapang yang telah dipreservasi dalam gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan maltosa 5% (b/v) disebarkan pada permukaan medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal dalam cawan petri dengan tiga pengulangan pada masing-masing pengenceran, kemudian diratakan dengan menggunakan spatel *Drygalski*. Biakan diinkubasi selama 3--5 hari pada suhu 22--25° C pada kondisi gelap.

Penghitungan koloni dilakukan setiap hari hingga hari ke-3. Berdasarkan Hogg (2005: 93), koloni yang dapat dihitung adalah koloni pada medium yang berjumlah 30--300 koloni. Jumlah CFU/ml sampel dihitung berdasarkan Cappuccino dan Sherman (1996: 119) dengan rumus:

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

Pengujian viabilitas *M. majus* UICC 295 pada kadaver dilakukan dengan meletakkan potongan kadaver ke dalam cawan petri berisi medium SDYA dengan penambahan substrat kitin koloidal 10% (b/v) yang telah dibagi menjadi 4

kuadran. Biakan diinkubasi selama 3--5 hari pada suhu 22--25° C pada kondisi gelap.

3.4.10 Pengolahan dan analisis data

Data yang diperoleh disusun dalam bentuk tabel dan gambar. Data yang diperoleh meliputi data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif meliputi data pengamatan morfologi secara makroskopik kapang *M. majus* UICC 295 dan data pengujian viabilitas *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva *O. rhinoceros* setelah preservasi. Data kuantitatif meliputi data hasil pengamatan morfologi secara mikroskopik, perhitungan jumlah konidia kapang *M. majus* UICC 295 berumur 15 hari pada medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan substrat kitin koloidal 10% (v/v), jumlah larva yang mati, berat larva yang masih hidup setelah aplikasi, dan jumlah konidia biakan kapang sebelum dan setelah preservasi pada hari ke-1, 7, 14, dan 30.

BAB 4
HASIL DAN PEMBAHASAN

**4.1 PENGARUH PENAMBAHAN KITIN KOLOIDAL PADA MEDIUM
PERTUMBUHAN TERHADAP PERTUMBUHAN *M. majus* UICC 295**

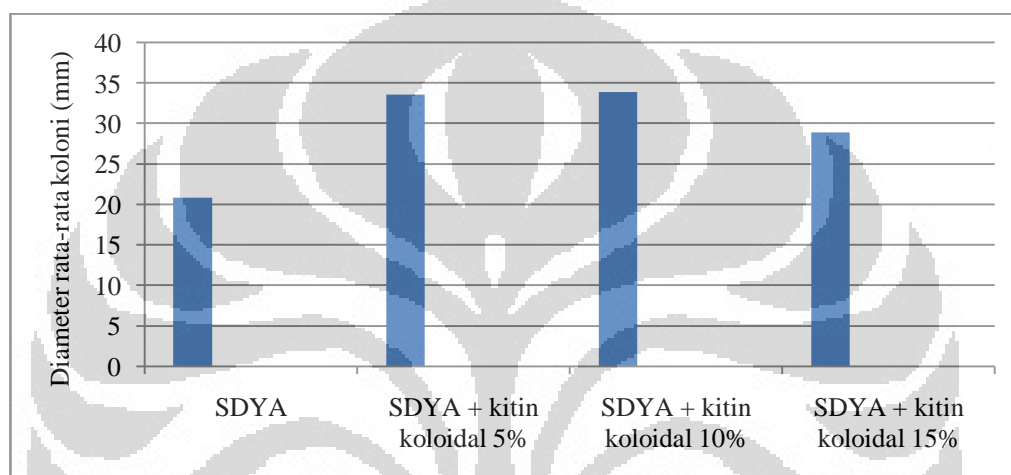
Hasil pengamatan morfologi secara makroskopik *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan substrat kitin koloidal 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) dapat dilihat pada Tabel 4.1.1. Hasil pengukuran diameter koloni rata-rata *M. majus* UICC 295 dapat dilihat pada Tabel 4.1.2.

Tabel 4.1.1 Hasil pengamatan morfologi secara makroskopik *M. majus* UICC 295 umur 21 hari pada SDYA dan umur 14 hari pada SDYA dengan penambahan kitin koloidal 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) suhu 28° C kondisi gelap

Medium	Warna koloni	Tekstur koloni	<i>Exudate drops</i>	<i>Growing zone</i>	Zonasi	<i>Radial furrow</i>	<i>Reverse colony</i>
SDYA	Hifa putih, konidia <i>olive green</i> kekuningan	granular	ada, warna kuning kecokelatan	ada	ada	tidak ada	hialin
SDYA + kitin koloidal 5% (b/v)	Hifa putih, konidia <i>olive green</i>	granular	ada, warna kuning kecokelatan	ada	ada	tidak ada	hialin
SDYA + kitin koloidal 10% (b/v)	Hifa putih, konidia <i>olive green</i>	granular	ada, warna kuning kecokelatan	ada	ada	tidak ada	hialin
SDYA + kitin koloidal 15% (b/v)	Hifa putih, konidia <i>olive green</i>	granular	ada, warna kuning kecokelatan	ada	ada	tidak ada	hialin

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

Medium	SDYA	SDYA + kitin koloidal 5%	SDYA + kitin koloidal 10%	SDYA + kitin koloidal 15%
Diameter koloni rata-rata (mm)	20,85	33,59	33,88	28,88



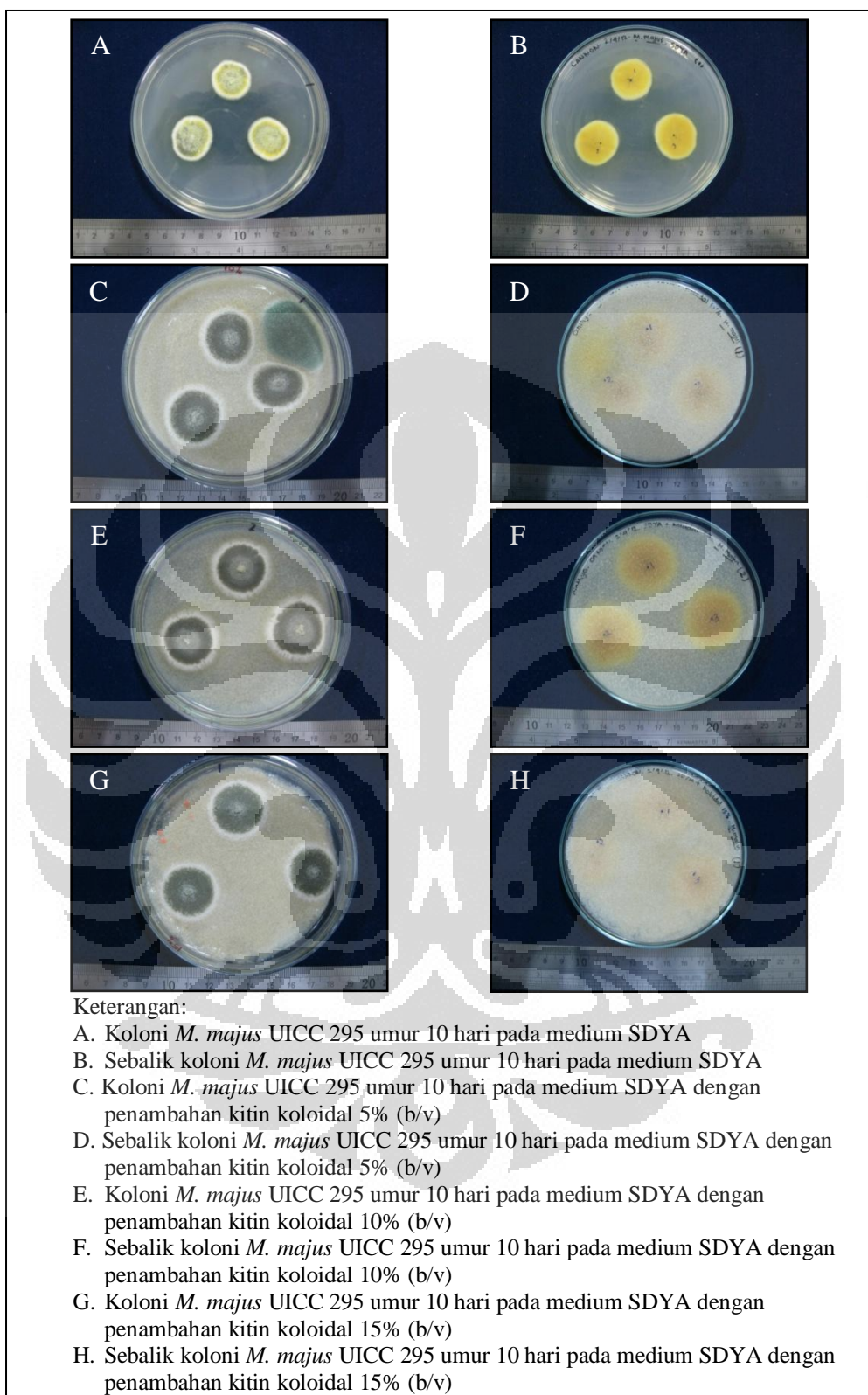
Gambar 4.1.1 Grafik perbandingan ukuran diameter koloni rata-rata *M. majus* UICC 295

Hasil pengamatan morfologi secara makroskopis menunjukkan terdapat perbedaan karakteristik morfologi *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA dan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 5% (b/v), 10% (b/v), maupun 15% (b/v). Perbedaan karakter morfologi secara makroskopik *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) yang teramati adalah perbedaan ukuran diameter koloni rata-rata dan perbedaan waktu biakan mencapai sporulasi penuh (*full sporulation*), yaitu saat konidia yang diproduksi sudah menghasilkan pigmen *olive green* dan menutupi seluruh permukaan koloni. Perbedaan ukuran diameter koloni rata-rata *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 5% (b/v), 10% (b/v), maupun 15% (b/v) mengindikasikan adanya perbedaan kecepatan pertumbuhan hifa. Biakan *M. majus* UICC 295 pada

medium SDYA mencapai sporulasi penuh pada umur 21 hari, sedangkan biakan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) sudah mencapai sporulasi penuh pada umur 14 hari.

Pertumbuhan hifa dan sporulasi dipengaruhi oleh keberadaan nutrisi pada medium. Karbon dan nitrogen yang bersumber dari komponen medium merupakan unsur penyusun karbohidrat, asam nukleat, protein, dan lipid. Molekul-molekul kompleks tersebut merupakan makromolekul utama penyusun sel hifa dan konidia pada kapang. Berdasarkan Mueller dkk. (2004: 607), medium SDYA merupakan medium pertumbuhan yang umum digunakan untuk kapang entomopatogen karena terdiri atas sumber nutrisi seperti pepton, glukosa, dan *yeast extract*. Berdasarkan Atlas (2004: 2--5), glukosa merupakan sumber karbon dalam bentuk monosakarida. Pepton merupakan protein penyedia asam amino. Pepton berfungsi sebagai sumber karbon dan nitrogen. Ekstrak khamir (*yeast extract*) mengandung sumber karbon dan nitrogen, serta vitamin dan mineral untuk pemeliharaan mikroorganisme. Menurut Baretto dkk. (2008: 102--103), substrat kitin merupakan sumber karbon dan nitrogen yang mendukung pertumbuhan miselium dan pembentukan konidia kapang *M. anisopliae*. Berdasarkan Shah dkk. (2005: 6), karbon dan nitrogen diketahui merupakan makronutrien yang esensial bagi pembentukan karbohidrat, asam nukleat, protein struktural, seperti sitoskeleton dan membran pada sel, dan juga protein fungsional, seperti enzim, yang mendukung pertumbuhan kapang. Berdasarkan Jackson dan Schisler (1992: 2264), unsur karbon juga diketahui turut mempengaruhi pembentukan lipid pada konidia kapang. Lipid dalam bentuk trigliserida merupakan sumber energi saat germinasi konidia dan pembentukan konidia.

Pigmentasi dipengaruhi oleh keberadaan sumber nitrogen, seperti pepton, *yeast extract*, dan kitin. Berdasarkan Shrestha dkk. (2006: 88), sumber nutrisi yang berbeda mempengaruhi pigmentasi pada *Cordyceps militaris* Link. Penelitian menunjukkan bahwa pepton dan *yeast extract* merupakan komponen utama yang mempengaruhi pigmentasi. Medium tanpa pepton, *yeast extract*, maupun sumber nitrogen lain memiliki warna pigmen yang lebih muda dibandingkan medium dengan pepton, *yeast extract*, dan sumber nitrogen lain.

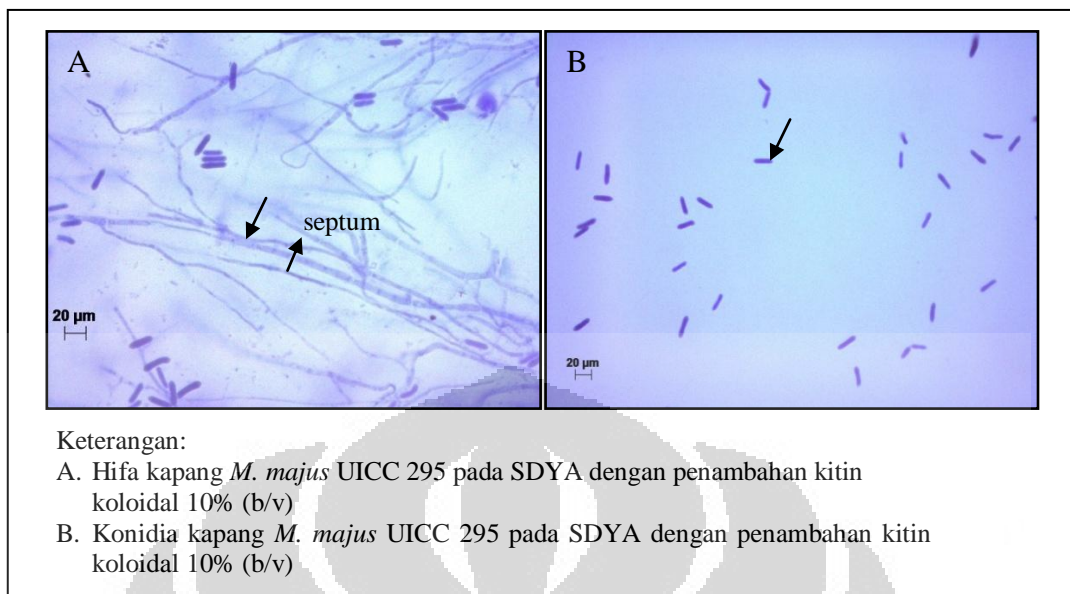


Gambar 4.1.2 Koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA dengan kitin koloidal 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v)

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Berdasarkan Shah dkk. (2005: 2), besar rasio unsur karbon dan nitrogen yang berbeda pada medium pertumbuhan diketahui memiliki efek yang berbeda terhadap pertumbuhan beberapa spesies kapang. Rasio C:N yang berbeda pada medium pertumbuhan dapat mempengaruhi produksi konidia, kecepatan germinasi, dan pembentukan apresorium. Medium *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) diketahui memiliki rasio C:N sebesar 35:1, sedangkan 1% *yeast extract* diketahui memiliki rasio C:N sebesar 3,6:1 dan 1% kitin sebesar 6,9:1. Berdasarkan Jackson dan Schisler (1992: 2260 & 2263), jumlah konidia *Colletotrichum truncatum* NRRL 13737 terbanyak dihasilkan kapang pada medium dengan rasio C:N sebesar 30:1, namun germinasi konidia *Col. truncatum* NRRL 13737 tercepat terjadi pada medium dengan rasio C:N sebesar 10:1. Protein dan lipid yang terkandung dalam sel kapang juga dipengaruhi oleh besar rasio C:N pada medium. Protein yang terkandung dalam sel kapang *Col. truncatum* NRRL 13737 diketahui paling tinggi ketika kapang ditumbuhkan pada medium dengan rasio 10:1 yaitu sebesar 33% dari total berat kering, dibandingkan dengan rasio 20:1 (28% dari total berat kering) dan 30:1 (17% dari total berat kering). Protein endogen diketahui berkorelasi dengan germinasi konidia dan pembentukan apresorium. Lipid yang terkandung dalam sel kapang *Col. truncatum* NRRL 13737 diketahui paling tinggi ketika kapang ditumbuhkan pada medium dengan rasio 30:1 yaitu sebesar 31% dari total berat kering dibandingkan dengan rasio 20:1 (20% dari total berat kering) dan 10:1 (18% dari total berat kering). Lipid diketahui berkorelasi dengan pembentukan konidia.

Hasil pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 secara mikroskopik yang dilakukan pada kapang berumur 21 hari pada medium SDYA dan kapang berumur 14 hari pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) dapat dilihat pada Lampiran 8, Lampiran 9, Lampiran 10, dan Lampiran 11. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa hifa *M. majus* UICC 295 pada masing-masing medium memiliki hifa bercabang dan berseptum. Berdasarkan Tzean dkk. (1997: 150), *M. anisopliae* var. *majus* merupakan fungi tingkat tinggi yang memiliki septum pada hifa.

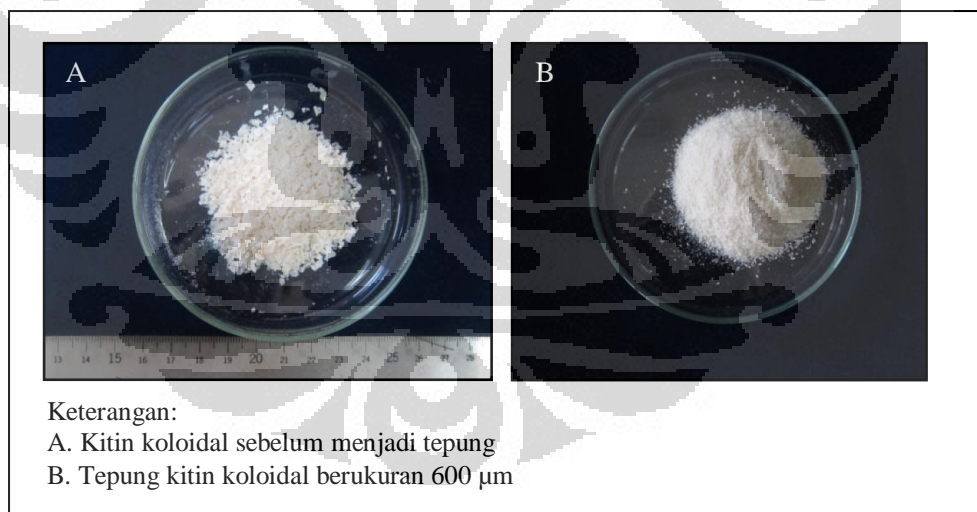


Gambar 4.1.3 Mikromorfologi kapang *M. majus* UICC pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% umur 14 hari suhu 27° C [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Hasil pengamatan morfologi secara mikroskopik menunjukkan bahwa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) memiliki lebar hifa terbesar dengan kisaran (3,09--6,26) µm dan juga ukuran konidia terbesar dengan kisaran (20,70--30,98) x (5,08--7,83) µm. Ukuran hifa dan konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal relatif lebih besar dari *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA tanpa penambahan kitin koloidal. Perbedaan ukuran hifa dan konidia tersebut juga disebabkan oleh perbedaan komponen medium, antara lain karbon dan nitrogen. Berdasarkan Bischoff dkk. (2009: 516), *M. majus* merupakan spesies dari genus *Metarhizium* yang memiliki ukuran konidia paling besar. *Metarhizium majus* yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan suhu inkubasi 23° C umur 14 hari memiliki ukuran konidia (8,5--14,5) x (2,5--5,0) µm dan berwarna *olive green*. Berdasarkan Shah dkk. (2005: 6), karbon dan nitrogen merupakan unsur utama pada medium pertumbuhan kapang dan diketahui merupakan makronutrien yang esensial bagi pembentukan karbohidrat, asam nukleat, protein struktural, seperti sitoskeleton dan membran pada sel, dan juga protein fungsional, seperti enzim, yang mendukung pertumbuhan kapang.

Hasil pengamatan secara mikroskopik menunjukkan penurunan ukuran hifa dan konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 15% (b/v). Hal tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi kitin yang terlalu tinggi dapat menghambat pertumbuhan kapang. Berdasarkan Jackson dan Bothast (1990: 3438), konsentrasi karbon yang terlalu tinggi di dalam medium akan menyebabkan pembentukan masa hifa padat seperti sklerotium dan melanisasi pada kapang *Col. truncatum* NRRL 13737. Masa hifa padat tersebut menghambat pembentukan konidia dan juga pertumbuhan hifa *Col. truncatum* NRRL 13737.

Partikel kitin koloidal yang digunakan dalam pembuatan medium berukuran 600 μm . Semakin kecil partikel substrat, maka semakin besar luas permukaan substrat yang dapat dicapai oleh enzim hidrolitik kapang sehingga penguraian substrat akan lebih efisien. Berdasarkan Leger dkk. (1986: 1512), ukuran partikel kitin koloidal yang digunakan dalam pembuatan medium diketahui memiliki pengaruh terhadap kemampuan kapang *M. anisopliae* dalam menggunakan substrat tersebut. Kemampuan kapang dalam menggunakan



Gambar 4.1.4 Kitin koloidal

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

substrat kitin koloidal akan mempengaruhi pertumbuhan kapang dan juga produksi enzim kitinase. Pertumbuhan paling baik dan produksi enzim kitinase pada *M. anisopliae* paling tinggi terlihat pada medium dengan penambahan kitin

koloidal 1% (b/v) yang memiliki ukuran partikel kurang dari 200 μm , dibandingkan kitin koloidal 1% (b/v) yang memiliki ukuran partikel 500 μm .

Hasil pengamatan morfologi secara mikroskopik menunjukkan bahwa penambahan kitin koloidal memengaruhi pertumbuhan hifa dan konidia, ditandai dengan peningkatan ukuran rata-rata dan kisaran lebar hifa, panjang konidia, dan lebar konidia. Berdasarkan uji statistik ANOVA (Lampiran 12, Lampiran 13, Lampiran 14), terdapat perbedaan antara ukuran lebar hifa serta ukuran panjang dan lebar konidia pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) dengan ukuran lebar hifa dan ukuran panjang dan lebar konidia pada medium SDYA tanpa penambahan kitin koloidal. Hasil uji Tukey (Lampiran 15) menunjukkan bahwa ukuran lebar hifa pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 5% (b/v), 10% (b/v), dan 15% (b/v) berbeda nyata dengan ukuran lebar hifa pada medium SDYA, namun ukuran panjang dan lebar konidia tidak berbeda nyata.

Hasil pengamatan morfologi secara makroskopik maupun mikroskopik menunjukkan bahwa konsentrasi substrat kitin koloidal sebanyak 10% (b/v) merupakan konsentrasi yang paling mendukung pertumbuhan *M. majus* UICC 295, ditandai dengan ukuran diameter koloni, serta ukuran hifa dan konidia yang lebih besar daripada *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan substrat kitin koloidal sebesar 5% (b/v) dan 15% (b/v). Oleh karena itu, *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) digunakan pada aplikasi kapang dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros*.

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

Hasil enumerasi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 sebelum diaplikasikan pada larva *O. rhinoceros* dapat dilihat pada Tabel 4.2.1 (enumerasi dengan hemositometer), serai Tabel 4.2.2 dan 4.2.3 (enumerasi dengan metode TPC). Penghitungan jumlah konidia menggunakan hemositometer pada penelitian bertujuan untuk mempersiapkan inokulum kapang *M. majus* UICC 295 dengan

jumlah konidia yang sama untuk diaplikasikan terhadap larva *O. rhinoceros*. Jumlah konidia/hifa yang diaplikasikan akan menentukan keberhasilan infeksi kapang pada larva.

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

Ruang	Jumlah konidia			
	<i>M. majus</i> (SDYA)		<i>M. majus</i> (SDYA + kitin koloidal)	
	Ulangan ke-1	Ulangan ke-2	Ulangan ke-1	Ulangan ke-2
1	35	33	63	54
2	25	39	52	45
3	45	31	49	42
4	44	28	68	39
5	37	31	47	45
Σ konidia terhitung	186	162	279	225
Rata-rata	174		252	
Σ konidia/ml	8,7 x 10 ⁶		1,26 x 10 ⁷	

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

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

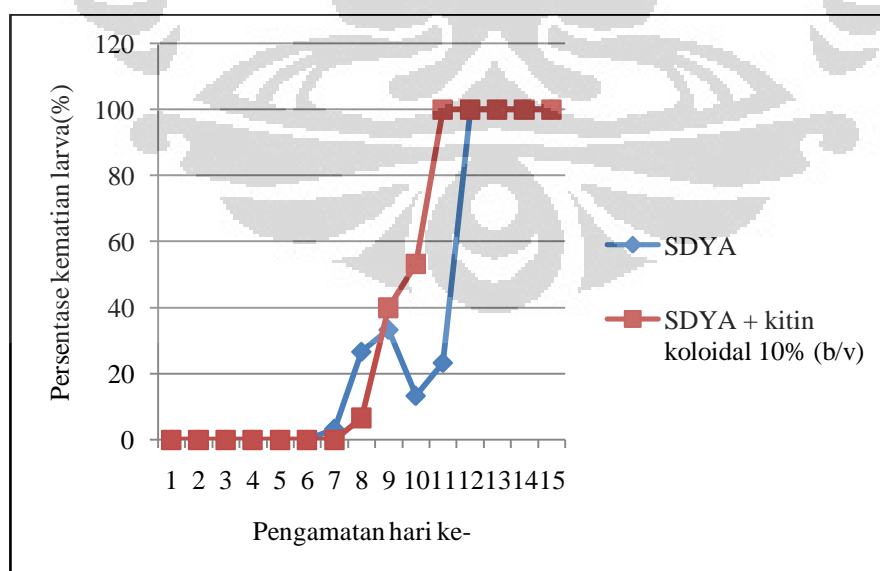
Tabel 4.2.3. Hasil TPC *M. majus* UICC 295 umur 23 hari pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) suhu 28° C dengan kondisi gelap

Kapang	Pengenceran	pengulangan	Σ koloni	Σ CFU (CFU/ml)	Σ CFU rata-rata (CFU/ml)
<i>M. majus</i> UICC 295	10^{-3}	1	196	$2,16 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$
		2	236		
		3	>300		
	10^{-4}	1	46	$5,4 \times 10^6$	
		2	48		
		3	68		
	10^{-5}	1	3	$2,33 \times 10^6$	
		2	2		
		3	2		

Inokulum yang digunakan pada aplikasi *M. majus* UICC 295 yang berasal dari medium SDYA tanpa penambahan kitin terhadap larva *O. rhinoceros* adalah sebesar 10^6 sel/ml, sedangkan inokulum yang digunakan pada aplikasi *M. majus* UICC 295 yang berasal dari medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) terhadap larva *O. rhinoceros* adalah sebesar 10^7 sel/ml. Berdasarkan Prayogo dkk. (2005: 22), mortalitas serangga dipengaruhi jumlah konidia kapang yang diaplikasikan. Umumnya, semakin tinggi jumlah konidia maka semakin tinggi pula tingkat mortalitas serangga yang diuji. *Metarhizium anisopliae* dengan jumlah konidia 10^6 CFU/ml dapat menyebabkan kematian larva ulat grayak *Spodoptera litura* sebesar 64,33% pada hari ke-12 setelah aplikasi, sedangkan *M. anisopliae* dengan jumlah konidia 10^7 CFU/ml dapat menyebabkan kematian larva *S. litura* sebesar 83,33% pada hari ke-12 setelah aplikasi.

Tabel 4.2.4 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	7	2	12	5	4	1	10	-	-	-	-	88	28
10	5	3	8	16	2	1	1	4	-	-	-	-	88	27.5
11	-	-	-	-	1	3	3	7	-	-	-	-	88	28.1
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	90	27.2
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	90	27.1
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	27.6
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	27.4
Total	10	10	10	30	10	10	10	30	-	-	-	-		
	Rata-rata											87 ± 5.05	27.8 ± 0.39	



Gambar 4.2.1. Grafik persentase kematian larva *O. rhinoceros*

4.2.5. Persentase kematian larva *O. rhinoceros* selama 15 hari pengamatan

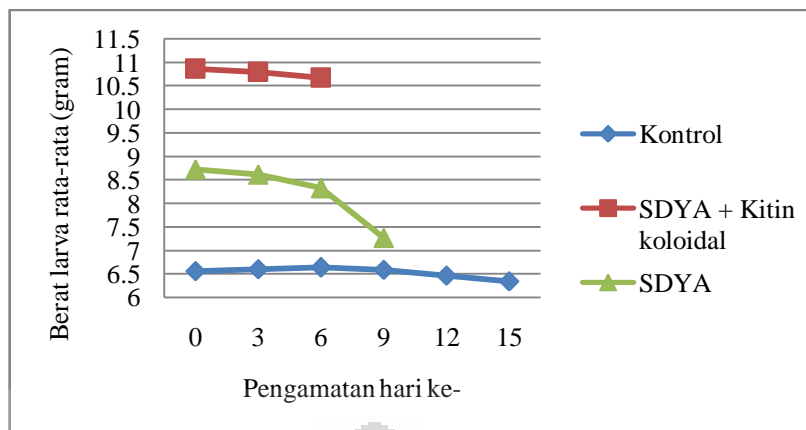
Pengamatan hari ke-	SDYA		SDYA + kitin koloidal 10% (b/v)	
	Σ larva mati	Persentase kematian larva (%)	Σ larva mati	Persentase kematian larva (%)
1	-	0	-	0
2	-	0	-	0
3	-	0	-	0
4	-	0	-	0
5	-	0	-	0
6	-	0	-	0
7	1	3,33	-	0
8	8	26,67	2	6,67
9	10	33,33	12	40
10	4	13,33	16	53,33
11	7	23,33	-	0
Total	30	100	30	100

Penghitungan jumlah larva yang mati setelah aplikasi dilakukan setiap hari selama 15 hari dan pengukuran berat tubuh larva dilakukan setiap 3 hari sekali selama 15 hari. Jumlah larva yang mati dan pengukuran berat tubuh larva selama 15 hari pengamatan dapat dilihat pada Tabel 4.2.1. Seluruh larva pada kelompok perlakuan mengalami kematian (100%). Larva pada kelompok kontrol tidak mengalami kematian.

Larva yang telah diaplikasikan dengan suspensi konidia/hifa dari medium SDYA mulai mengalami kematian pada hari ke-7, sebesar 3,33%, setelah aplikasi dan mencapai persentase kematian 100% pada hari ke-11 setelah aplikasi. Larva yang telah diaplikasikan dengan suspensi konidia/hifa yang dari medium SDYA dengan penambahan substrat kitin koloidal 10% (b/v) mulai mengalami kematian pada hari ke-8, sebesar 6,67%, setelah aplikasi dan mencapai persentase kematian 100% pada hari ke-10 setelah aplikasi. Persentase kematian larva dapat dilihat pada Tabel 4.2.5.

Larva *O. rhinoceros* cenderung mengalami penurunan berat badan setelah diaplikasikan dengan *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v). Larva kontrol tidak mengalami penurunan berat badan. Hasil pengukuran berat badan larva yang masih hidup dapat dilihat pada Lampiran 12 (kelompok kontrol), Lampiran 13 (kelompok perlakuan SDYA dengan penambahan kitin koloidal), dan Lampiran 14 (kelompok perlakuan SDYA).

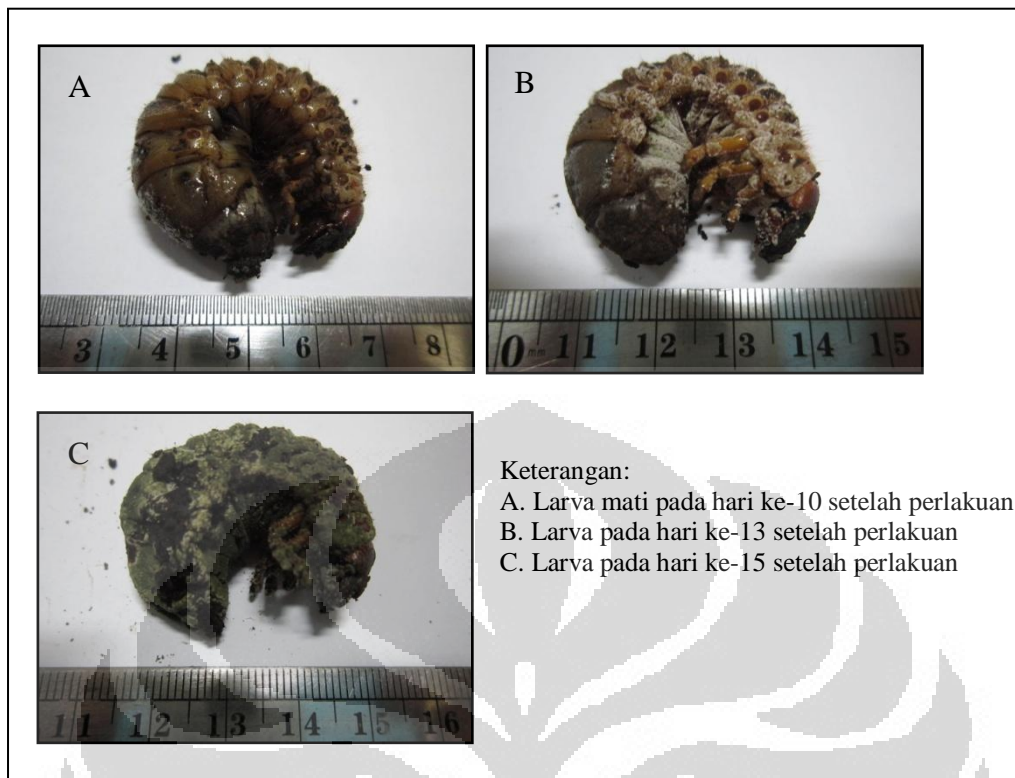
Gejala infeksi *M. majus* UICC 295 terhadap larva *O. rhinoceros* terlihat pada seluruh larva dari kelompok perlakuan. Gejala awal pada larva setelah aplikasi adalah gerakan larva menjadi lambat, warna tubuh menjadi kusam, dan timbul bercak-bercak cokelat di sekitar permukaan tubuh larva. Infeksi kapang juga menyebabkan penurunan nafsu makan pada larva. Penurunan nafsu makan pada larva diduga dapat disebabkan produksi senyawa destruksin oleh *M. majus* UICC 295 yang menyebabkan otot-otot pada saluran pencernaan larva berkontraksi terus-menerus. Terganggunya aktivitas otot pada saluran pencernaan larva menghambat penyerapan nutrisi. Penurunan nafsu makan menyebabkan larva kekurangan nutrisi sehingga energi yang dihasilkan dari proses metabolisme berkurang dan menyebabkan gerakan larva menjadi lambat. Kekurangan nutrisi pada tubuh larva juga diakibatkan oleh kapang yang memanfaatkan sumber nutrisi di dalam tubuh larva. Berdasarkan Sambiran dan Hosang (2007: 7), gejala awal larva *O. rhinoceros* yang terinfeksi *M. anisopliae* adalah tubuh larva menjadi kusam, nafsu makan larva berkurang, dan gerakan larva menjadi lambat. Berdasarkan Okaraonye dan Ikewuchi (2009: 36), larva *O. rhinoceros* memiliki kandungan protein yang tinggi (42,29% berat basah). Larva *O. rhinoceros* juga merupakan sumber asam amino seperti histidin, metionin, valin dan fenilalanin, serta merupakan sumber asam lemak tak jenuh dan sumber mineral seperti kalsium, magnesium, kalium, tembaga, dan fosfor.



Gambar 4.2.2. Grafik perbandingan berat larva rata-rata yang masih hidup setelah aplikasi pada pengujian suspensi konidia/hifa *M. majus* UICC 295

Gejala awal yang terlihat pada larva setelah aplikasi dengan *M. majus* UICC 295, yaitu timbul bercak cokelat. Bercak cokelat mulai terlihat pada hari ke-5 setelah aplikasi. Bercak tersebut terlihat pada tubuh larva bagian bawah, dekat anus, dan antar segmen tubuh. Bercak cokelat tersebut adalah melanin yang merupakan respon pertahanan tubuh serangga. Berdasarkan Schmid-Hempel (2005: 531), melanin terbentuk karena adanya antigen pada tubuh serangga yang menyebabkan tubuh serangga menghasilkan enzim fenoloksidase (PO). Enzim PO mengubah fenol menjadi quinon yang selanjutnya akan berpolimerisasi menjadi melanin.

Berdasarkan Khachatourians dan Qazi (2008: 35--40 & 43), kematian serangga disebabkan sekresi enzim-enzim oleh badan hifa kapang untuk menghancurkan jaringan tubuh serangga. Enzim-enzim tersebut adalah protease dan peptidase, berfungsi untuk mendegradasi protein, kitinase untuk mendegradasi kitin, serta lipase dan lipoksigenase untuk mendegradasi lipoprotein, lemak, dan lapisan lilin yang selanjutnya digunakan oleh kapang sebagai sumber nutrisi. Berdasarkan Samuels (1998: 230 & 234), kematian serangga juga dapat disebabkan oleh senyawa destruksin yang dihasilkan kapang *Metarhizium*. Destruksin dapat melumpuhkan dan mematikan serangga. Destruksin menyebabkan terjadinya kelumpuhan otot dengan meningkatkan konsentrasi ion Ca^{2+} pada miofibril sehingga terjadi kontraksi otot secara terus menerus.



Gambar 4.2.3. Pertumbuhan *M. majus* UICC 295 pada larva *O. rhinoceros* mati
 [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Berdasarkan Wang dan Leger (2006: 6648), infeksi kapang *M. anisopliae* didukung oleh kemampuan *M. anisopliae* dalam mengelabui sistem imun serangga inang. Kemampuan tersebut dipengaruhi oleh gen *Mcl1* (*Metarhizium collagen-like*) yang terdapat pada badan hifa. Protein yang terbentuk dari ekspresi gen *Mcl1* berfungsi sebagai lapisan pelindung terhadap fagositosis dan enkapsulasi karena dapat mengubah komponen dinding sel sehingga dinding sel kapang kehilangan sifat imunogeniknya.

Tubuh larva mulai mengeras setelah larva mengalami kematian. Dua hari setelah larva mengalami kematian mulai terlihat tumbuhnya hifa berwarna putih pada permukaan tubuh larva. Hifa menutupi seluruh permukaan tubuh larva pada hari ke-3 setelah kematian dan konidia mulai muncul pada hari ke-4 setelah kematian. Tujuh hari setelah larva mengalami kematian, tubuh larva sudah ditutupi oleh konidia berwarna *olive green*. Warna konidia yang terbentuk pada larva serupa dengan warna konidia *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10%, namun berbeda dengan

M. majus UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA tanpa penambahan kitin koloidal. Hal tersebut menunjukkan bahwa medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal memiliki komposisi nutrisi yang mirip dengan komposisi nutrisi pada substrat alami *M. majus* UICC 295. Berdasarkan Sembel (2010: 178), infeksi *Metarhizium* pada hama *O. rhinoceros* ditandai dengan munculnya konidia berwarna hijau yang menutupi permukaan tubuh inang saat inang sudah mengalami kematian.

Kemampuan menginfeksi *M. majus* UICC 295 terhadap larva *O. rhinoceros* dipengaruhi oleh komposisi medium pertumbuhan. Berdasarkan Shah (dkk. 2005: 2), medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal merupakan sumber makronutrien, khususnya karbon dan nitrogen, dan juga mikronutrien yang esensial dalam pembentukan konidia, germinasi konidia, dan pembentukan enzim. Berdasarkan Leger dkk. (1986: 1515), produksi enzim kitinase pada kapang *M. anisopliae* dipengaruhi oleh mekanisme induksi-represi. Sintesis kitinase terjadi pada *M. anisopliae* yang ditumbuhkan pada medium dengan penambahan kitin koloidal dan glukosamin yang merupakan konstituen dari kitin. Sintesis kitinase tidak terjadi pada medium tanpa penambahan kitin maupun glukosamin atau pada medium dengan penambahan polimer lain seperti pektin dan selulosa. Hal tersebut mengindikasikan bahwa sekresi enzim kitinase diinduksi oleh keberadaan substrat kitin. Katabolisme kitin yang dilakukan oleh *M. anisopliae* akan menghasilkan katabolit. Katabolit yang dihasilkan merupakan represor enzim kitinase, sehingga saat kadar katabolit semakin tinggi maka ekspresi gen akan ditekan, sehingga produksi enzim kitinase terhambat. Berdasarkan Brooker dkk. (2008: 326), sintesis enzim merupakan salah satu bentuk ekspresi gen. Berdasarkan Sin (2008: 2), ekspresi gen yang berhubungan dengan produksi enzim pada mikroorganisme dipengaruhi oleh keberadaan substrat di sekitarnya. Beberapa enzim disekresikan hanya jika terdapat substrat yang spesifik digunakan oleh mikroorganisme tersebut. Berdasarkan Baretto dkk. (2004: 103), kitin merupakan substrat yang spesifik didegradasi oleh kapang *M. anisopliae*. Substrat kitin dapat menginduksi sekresi enzim kitinase pada *M. anisopliae*.

Parameter lingkungan yang diamati adalah kelembaban dan suhu ruangan inkubasi larva setelah diaplikasikan dengan kapang *M. majus* UICC 295. Suhu ruangan selama 15 hari pengamatan berkisar 27,1--28,4° C, sedangkan kelembaban ruangan berkisar 74--91%. Ruangan inkubasi dalam keadaan gelap. Pengukuran suhu dan kelembaban ruangan dilakukan karena kedua parameter tersebut dapat mempengaruhi kecepatan dan kemampuan infeksi kapang pada larva. Kondisi suhu dan kelembaban di luar kisaran yang sesuai dengan pertumbuhan *M. majus* UICC 295 diasumsikan dapat menyebabkan penurunan kecepatan dan kemampuan infeksi kapang. Ruangan gelap dapat mencegah kerusakan sel kapang akibat paparan sinar ultraviolet matahari. Paparan sinar ultraviolet dapat menyebabkan mutasi gen pada konidia kapang, sehingga kapang tidak dapat menyintesis senyawa-senyawa pembentuk sel, dan kapang kehilangan viabilitasnya. Berdasarkan Prayogo dkk. (2005: 20--23), dalam pengujian kapang *M. anisopliae* terhadap serangga uji perlu diperhatikan faktor-faktor lingkungan seperti suhu dan kelembaban, serta paparan sinar ultraviolet. Paparan sinar ultraviolet dapat menyebabkan mutasi gen yang berhubungan dengan pertumbuhan pada konidia kapang *M. anisopliae* sehingga kapang kehilangan viabilitasnya. Kapang *M. anisopliae* tumbuh optimal pada suhu 22--27° C dan kelembaban 90%.

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

Preservasi konidia/hifa *M. majus* UICC 295 dilakukan dengan metode *freezing* -80° C menggunakan akuades, krioprotektan gliserol 10% (v/v) dan, gliserol 10% (v/v) dengan penambahan maltosa 5% (b/v). Enumerasi dilakukan pada preservasi hari ke-1, 14, dan 30.

Hasil pengujian viabilitas kapang menunjukkan bahwa kapang *M. majus* 295 pada SDYA dan SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) tetap dapat tumbuh setelah preservasi -80° C, namun terjadi penurunan viabilitas pada biakan yang dipreservasi menggunakan akuades, krioprotektan gliserol 10% (v/v), maupun gliserol 10% (v/v) dengan penambahan maltosa 5% (b/v). Penurunan viabilitas yang terjadi pada biakan kapang *M. majus* UICC 295 pada medium

SDYA menggunakan krioprotektan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan maltosa 5% (b/v) tidak terlalu signifikan, yaitu masih berkisar pada 10^6 CFU/ml, dengan persentase jumlah konidia/hifa yang hidup setelah preservasi 57,93% (H+1), 40,28% (H+14), dan 28,97% (H+30) (Tabel 4.3.1.). Viabilitas terendah teramati pada biakan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA menggunakan krioprotektan gliserol 10% (v/v). Persentase jumlah konidia/hifa yang hidup setelah preservasi menggunakan gliserol 10% (v/v) yaitu 69,83% (H+1), 4,03% (H+14), dan 1,87% (H+30).

Viabilitas biakan kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) menggunakan krioprotektan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan maltosa 5% (b/v) relatif lebih tinggi jika dibandingkan viabilitas pada preservasi menggunakan gliserol 10% (v/v) tanpa penambahan maltosa 5% (b/v). Jumlah konidia/hifa yang hidup setelah preservasi menggunakan krioprotektan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan maltosa 5% (b/v) yaitu 1,23% (H+1), 1,86% (H+14), dan 1,66% (H+30) (tabel 4.3.1.).

Viabilitas terendah teramati pada biakan *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) menggunakan krioprotektan gliserol 10% (v/v). Persentase jumlah konidia/hifa yang hidup setelah preservasi menggunakan gliserol 10% (v/v) yaitu 15,30% (H+1), 0,18% (H+14), dan 0,65% (H+30). Jumlah *colony forming unit* (CFU/ml) biakan kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% lebih rendah dibandingkan jumlah CFU biakan kapang *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA tanpa penambahan kitin. Hal tersebut mengindikasikan terdapat pengaruh medium yang digunakan pada TPC dalam pengujian viabilitas kapang. Medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) lebih sulit untuk dimanfaatkan kapang karena kitin merupakan makromolekul kompleks. Kapang *M. majus* UICC 295 yang telah dipreservasi sebaiknya ditumbuhkan kembali pada medium dengan komponen yang lebih mudah digunakan oleh kapang sebagai medium adaptasi.

Hasil pengamatan terhadap *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) menunjukkan bahwa biakan yang dipreservasi menggunakan akuades pada -80° C tetap viabel setelah

dipreservasi selama 30 hari. Hal tersebut mengindikasikan bahwa *M. majus* UICC 295 memiliki mekanisme untuk mengatasi perbedaan tekanan osmotik di dalam dan di luar sel dan juga mengatasi pembentukan kristal es kasar yang dapat menyebabkan kerusakan sel. Berdasarkan Dunlap dkk. (2011: 118--119), kapang *B. bassiana* dan *M. anisopliae* memiliki *compatible solute* yang berperan sebagai osmoregulator. *Compatible solute* merupakan senyawa yang memiliki berat molekul rendah dan berperan penting dalam adaptasi fungi terhadap perbedaan tekanan osmotik. Berdasarkan Hallsworth dan Magan (1996: 2435), konidia *M. anisopliae* diketahui memiliki *compatible solute* seperti gliserol dan trehalosa.

Hasil pengamatan terhadap *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) yang dipreservasi pada -80°C menunjukkan bahwa terjadi penurunan viabilitas pada biakan yang dipreservasi dengan krioprotektan gliserol 10% (v/v) dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan maltosa 5% (b/v). Hal tersebut dapat disebabkan waktu dan suhu yang tidak sesuai pada ekuilibrisasi krioprotektan terhadap sel. Waktu dan suhu ekuilibrisasi yang tidak sesuai sebelum preservasi akan menyebabkan krioprotektan gliserol tidak dapat berpenetrasi secara sempurna ke dalam sel dan membentuk kondisi isotonik sehingga menyebabkan kondisi yang hipertonik. Kondisi hipertonik akan menyebabkan *osmotic shock* pada sel ketika preservasi sehingga membran sel mengalami kerusakan. Berdasarkan Hubalek (2003: 216--218), waktu dan suhu yang sesuai dalam ekuilibrisasi krioprotektan berbeda-beda tergantung dari jenis krioprotektan dan biakan yang dipreservasi. Gliserol merupakan *slowly penetrating cryoprotectant* sehingga memerlukan waktu yang lama untuk berpenetrasi ke dalam sel. Preservasi *Trichomonas vaginalis* Donne menggunakan gliserol diketahui memiliki waktu dan suhu ekuilibrisasi lebih efektif pada 37°C selama 100 menit dibandingkan pada 25°C selama 100 menit. Preservasi *Eimeria tenella* Schneider menggunakan gliserol memerlukan waktu ekuilibrisasi 19 jam dibandingkan 15 menit.

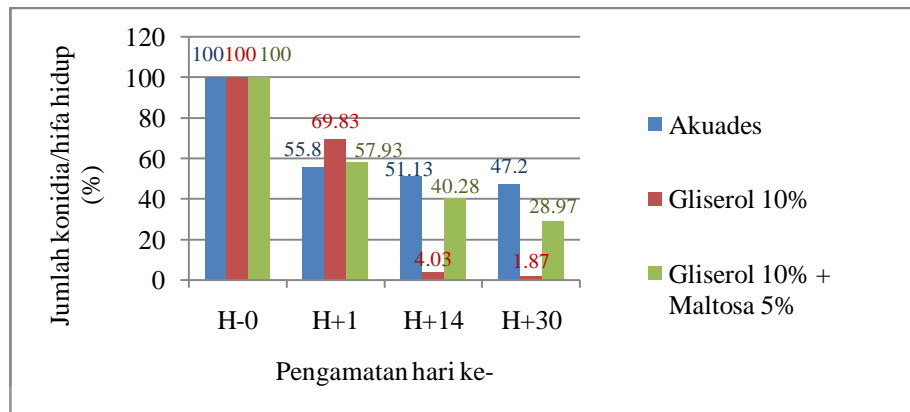
Penggunaan krioprotektan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan maltosa 5% (b/v) dapat mempertahankan viabilitas kapang lebih baik dibandingkan dengan gliserol 10% (v/v) tanpa penambahan maltosa 5% (b/v). Berdasarkan Swain dan Smith (2010: 24--29), gliserol merupakan *penetrating agent* yang

dapat berdifusi ke dalam sel dan dapat menggantikan cairan intraseluler. Gliserol memiliki titik beku yang lebih rendah daripada air sehingga dapat mengurangi pembentukan kristal es di dalam sel.

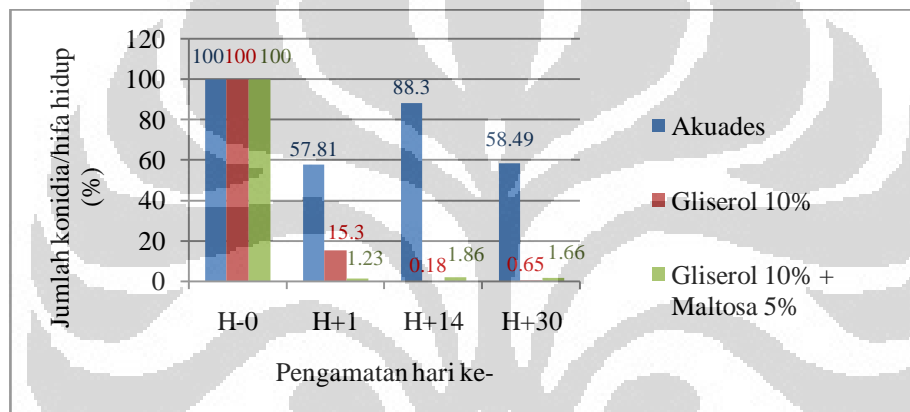
Tabel 4.3.1. Hasil penghitungan jumlah konidia/hifa *M. majus* UICC 295 setelah preservasi

<i>M. majus</i> UICC 295	Krioprotektan	Σ konidia/hifa hidup (CFU/ml)				Σ konidia/hifa hidup (%)		
		(H ₀)	(H ₁)	(H ₁₄)	(H ₃₀)	(H ₁)	(H ₁₄)	(H ₃₀)
	Akuades (Kontrol)	6,63 x 10 ⁶	3,7 x 10 ⁶	3,39 x 10 ⁶	3,13 x 10 ⁶	55,80	51,13	47,20
SDYA	Gliserol 10%	6,63 x 10 ⁶	4,63 x 10 ⁶	2,67 x 10 ⁵	1,24 x 10 ⁵	69,83	4,03	1,87
	Glisero 10% + Maltosa 5%	6,63 x 10 ⁶	2,67 x 10 ⁶	3,09 x 10 ⁶	2,06 x 10 ⁶	57,93	40,28	28,97
SDYA + kitin koloidal 10%	Akuades (Kontrol)	8,89 x 10 ⁶	5,14 x 10 ⁶	7,85 x 10 ⁶	5,2 x 10 ⁶	57,81	88,30	58,49
	Gliserol 10%	8,89 x 10 ⁶	1,36 x 10 ⁶	1,61 x 10 ⁴	5,77 x 10 ⁴	15,30	0,18	0,65
	Glisero 10% + Maltosa 5%	8,89 x 10 ⁶	1,09 x 10 ⁵	1,65 x 10 ⁵	1,48 x 10 ⁵	1,23	1,86	1,66

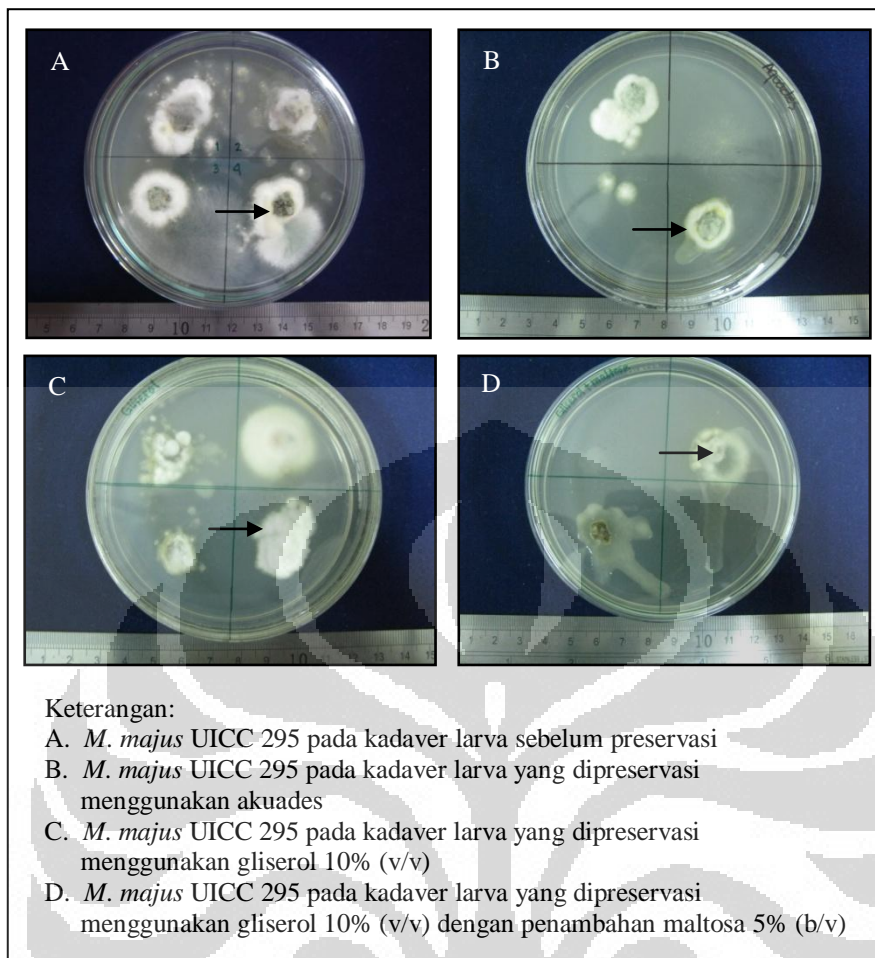
Senyawa sakarida seperti maltosa, sukrosa, laktosa, dan glukosa merupakan krioprotektan yang tidak dapat berpenetrasi ke dalam sel (*non-penetrating agent*) karena memiliki ukuran molekul yang besar. Senyawa sakarida berfungsi untuk melindungi bagian luar membran sel dan untuk menghindari sel dari *osmotic shock* pada saat *thawing*. Berdasarkan Hubalek (2003: 216), perpaduan antara *penetrating cryoprotectant* dan *non-penetrating cryoprotectant* diketahui dapat menimbulkan efek sinergik sehingga dapat melindungi sel lebih baik jika dibandingkan dengan penggunaan salah satu macam krioprotektan. Krioprotektan gliserol 10% (v/v) yang ditambahkan dengan maltosa 5% (b/v) diketahui memiliki efek perlindungan yang lebih baik. Hal tersebut ditandai dengan viabilitas yang lebih tinggi pada khamir *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen, beberapa spesies bakteri, dan alga *Scenedesmus* Meyen dibandingkan dengan penggunaan gliserol 10% tanpa penambahan maltosa 5% (b/v).



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

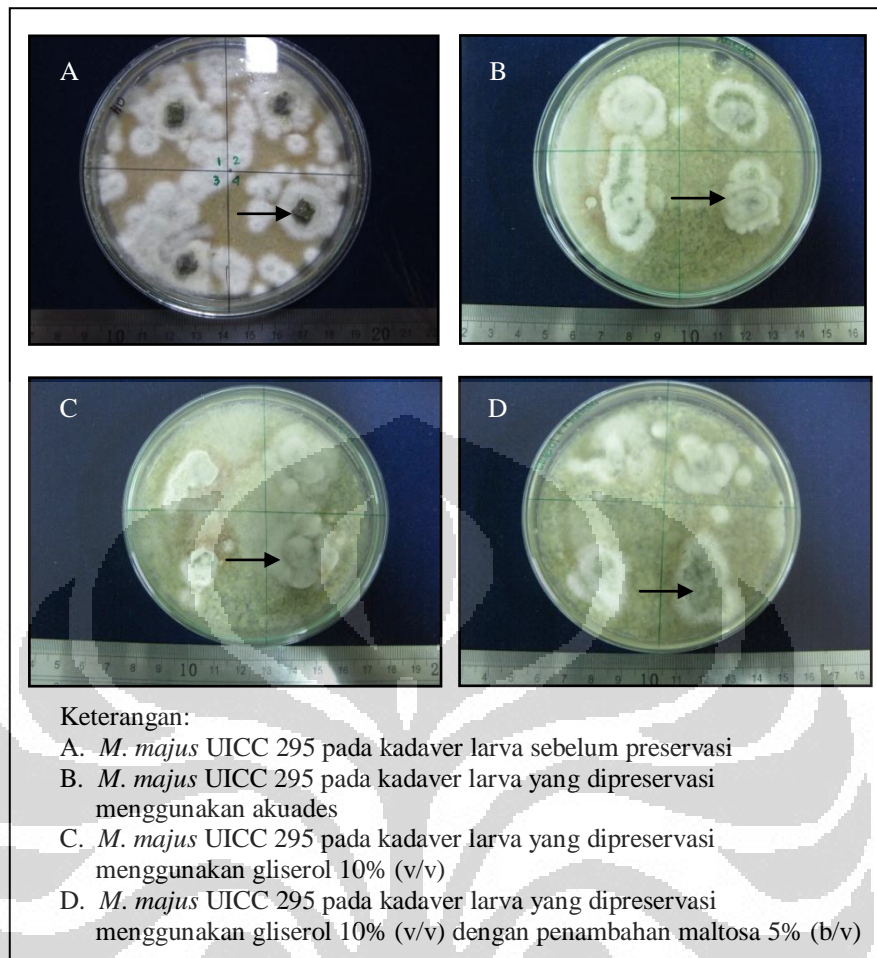


Gambar 4.3.2. Grafik jumlah konidia/hifa hidup *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) setelah preservasi



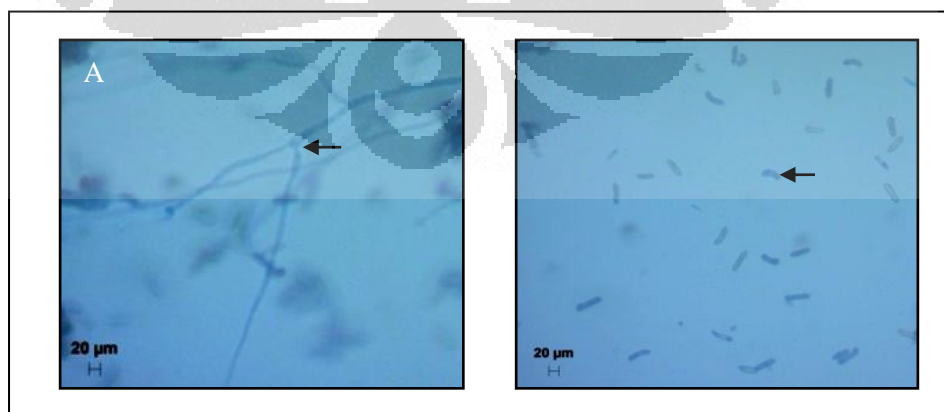
Gambar 4.3.3. Koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi 1 hari dengan kadaver larva [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Hasil preservasi kadaver larva *O. rhinoceros* yang terinfeksi *M. majus* UICC 295 dari medium SDYA dan SDYA dengan penambahan substrat kitin koloidal 10% (b/v) (Gambar 4.3.3. dan 4.3.4.) menunjukkan bahwa kapang tetap dapat tumbuh dengan baik setelah dipreservasi pada -80°C menggunakan krioprotektan gliserol 10% (v/v) dan gliserol dengan penambahan maltosa 5% (b/v). Hal tersebut disebabkan larva *O. rhinoceros* merupakan substrat alami *M. majus*. Preservasi *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva *O. rhinoceros* memiliki kekurangan, yaitu terdapat kontaminan setelah *M. majus* UICC 295 pada kadaver yang telah dipreservasi ketika ditumbuhkan kembali. Hal tersebut disebabkan kadaver larva *O. rhinoceros* yang dipreservasi tidak steril. Preservasi sebaiknya menggunakan kadaver yang telah disterilkan terlebih dahulu agar tidak terdapat kontaminan mikroorganisme lain.



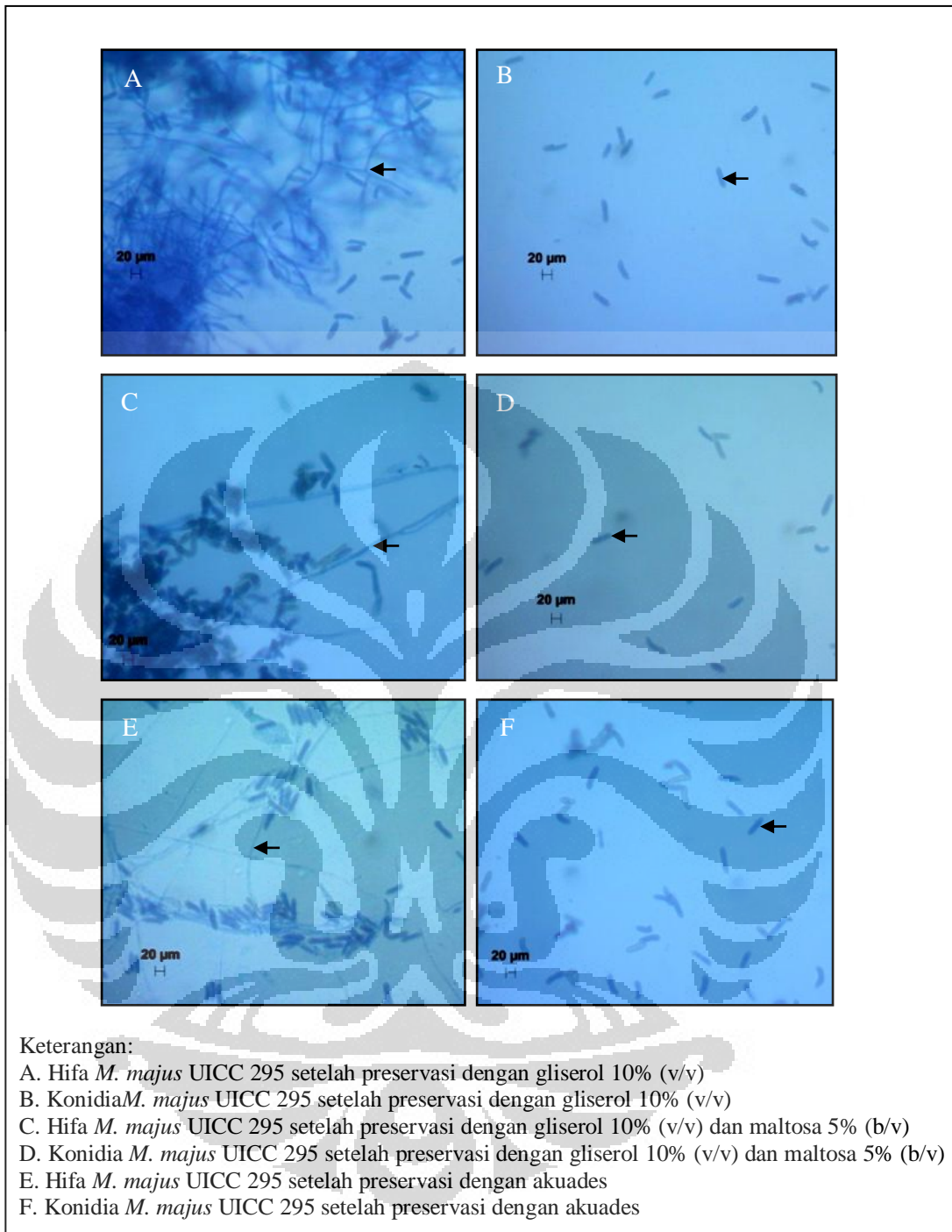
Gambar 4.3.4. Koloni *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) setelah preservasi 1 hari dengan kadaver larva

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.3.5. Hifa (A) dan konidia (B) *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva *O. rhinoceros* sebelum preservasi

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.3.6. Hifa dan konidia *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva *O. rhinoceros* setelah preservasi 1 hari

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Berdasarkan Nakasone dkk. (2004: 38 & 40), preservasi kapang dengan substrat organik dapat dilakukan menggunakan substrat alaminya, seperti kulit kayu, biji gandum, dan juga jaringan tumbuhan atau serangga. Jaringan tubuh inang umum

digunakan dalam preservasi kapang patogenik. *Neozygites fresenii* (Nowak.) Remaud., & Keller yang ditumbuhkan pada medium artifisial kehilangan viabilitasnya setelah dipreservasi pada suhu rendah, namun fungi tersebut tetap viabel jika dipreservasi pada suhu rendah menggunakan kadaver kutu daun yang merupakan substrat alaminya.

Hasil dari penelitian ini memperlihatkan bahwa *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) memiliki kemampuan dalam menginfeksi dan menyebabkan kematian pada larva serangga hama *O. rhinoceros* sebesar 100%. Medium SDYA dengan penambahan substrat kitin koloidal 10% (b/v) terbukti dapat mempertahankan kemampuan *M. majus* UICC 295 menginfeksi larva *O. rhinoceros*. Kapang *M. majus* UICC 295 yang dipreservasi selama 30 hari dengan metode *freezing* -80° C menggunakan krioprotektan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan maltosa 5% (b/v) tetap dapat tumbuh, namun mengalami penurunan viabilitas. Kapang *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva tetap dapat tumbuh dengan baik setelah dipreservasi selama 1 hari dengan metode *freezing* -80° C menggunakan krioprotektan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan maltosa 5% (b/v). Diharapkan penggunaan medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) dapat dimanfaatkan masyarakat untuk perbanyak biomassa kapang *M. majus* UICC 295 sebagai pengganti insektisida kimia. Diharapkan preservasi *M. majus* UICC 295 dapat dimanfaatkan masyarakat dalam penggunaan kapang sebagai agen biologis pengendali hama *O. rhinoceros* jangka panjang.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

1. Konidia/hifa *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) dapat membunuh larva *O. rhinoceros* 6,67%--100% dalam waktu 8--10 hari. Konidia/hifa *M. majus* UICC 295 yang ditumbuhkan pada medium SDYA tanpa penambahan kitin koloidal 10% (b/v) dapat membunuh larva *O. rhinoceros* 3,33%--100% dalam waktu 7--11 hari.
2. Preservasi *M. majus* UICC 295 pada -80°C menggunakan krioprotektan gliserol 10% dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan maltosa 5% (b/v) menyebabkan penurunan viabilitas kapang. Preservasi kapang *M. majus* UICC 295 pada kadaver larva *O. rhinoceros* pada -80°C tetap viabel menggunakan krioprotektan gliserol 10% dan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan maltosa 5% (b/v).

5.2 SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian mengenai preservasi kapang *M. majus* UICC 295 menggunakan metode lain selain metode *freezing* pada -80°C untuk mengetahui pengaruh preservasi terhadap viabilitas dan kemampuan kapang dalam menginfeksi *O. rhinoceros*.
2. Perlu dilakukan penelitian mengenai kemampuan *M. majus* UICC 295 yang telah dipreservasi untuk mengetahui kemampuan kapang dalam menginfeksi larva *O. rhinoceros*.

DAFTAR REFERENSI

- Atlas, R.M. 2004. *Handbook of microbiological media*. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton: iii + 2051 hlm.
- Balai Penelitian Kelapa. 1989. *Pengendalian kumbang kelapa secara terpadu*. Direktorat Perlindungan Tanaman Perkebunan, ?: ii + 29 hlm.
- Baretto, C. C, C. C. Staats, A. Schrank & M. H. Vainstein. 2004. Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of *N*-acetylglucosamine in protein secretion. *Current Microbiology* **48**: 102--107.
- Baringbing, W.A. 1991. Hama kumbang kelapa *Oryctes rhinoceros* Linnaeus dan cara pengendaliannya. Dalam: Sriwulan, I., W. Rumini & W. A. Baringbing (eds.). 1991. *Kumpulan makalah seminar tahun 1990/1991*. Departemen Pertanian, ?: 55--62.
- Bischoff, J.F., S.A. Rehner & R.A. Humber 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* **101**: 512--530.
- Brooker, R. J., E. P. Widmaier, L. E. Graham & P. D. Stiling. 2008. *Biology*. McGraw-Hill Companies, New York: xxxii + 1300 hlm.
- Campbell, N. A., J. B. Reece & L. G. Mitchell. 2003. *Biologi*. Jilid II. Terj. Dari *Biology*, oleh Safitri, A., L. Simarmata, H.W. Hardani. Erlangga, Jakarta: xxii + 404 hlm.
- Cappuccino, J.G. & N. Sherman. 1996. *Microbiology: A laboratory manual*. Benjamin Cummings, San Francisco: xvi + 491 hlm.
- Charnley, A. K. & S. A. Collins. 2007. *Entomopathogenic fungi and their role in pest control*. Dalam: Kubicek, C. P. & I. S. Druzhinina. 2007. *The mycota: A comprehensive treatise on fungi as experimental system for basic and applied research*. Volume 4: Environmental and microbial relationships. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 159--187.
- 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 Juni 2012, pk. 20.00.
- Dunlap, C. A., M. A. Jackson & B. C. Saha. 2011. Compatible solutes of sclerotia of *Mycocleptodiscus terrestris* under different culture and drying conditions. *Biocontrol Science and Technology* **21**(1): 113--123.
- Espinel-Ingroff, A., D. Montero & E. Martin-Mazuelos. 2004. Long-term preservation of fungal isolates in commercially prepared cryogenic microbank vials. *Journal of Clinical Microbiology* **42**(3): 1257--1259
- 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 contents of fungal propagules. *Applied and Environmental Microbiology* **62**(7): 2435--2442 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. *Jurnal Hortikultura* **15**(2): 116--123.
- Herlinda, S., M. D. Utama, Y. Pujiastuti & Suwandi. 2006. Kerapatan dan viabilitas spora *Beauveria bassiana* (Bals.) akibat subkultur dan pengayaan media, serta virulensinya terhadap larva *Plutella xylostella* (Linn.). *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika* **6**(2): 70--78.

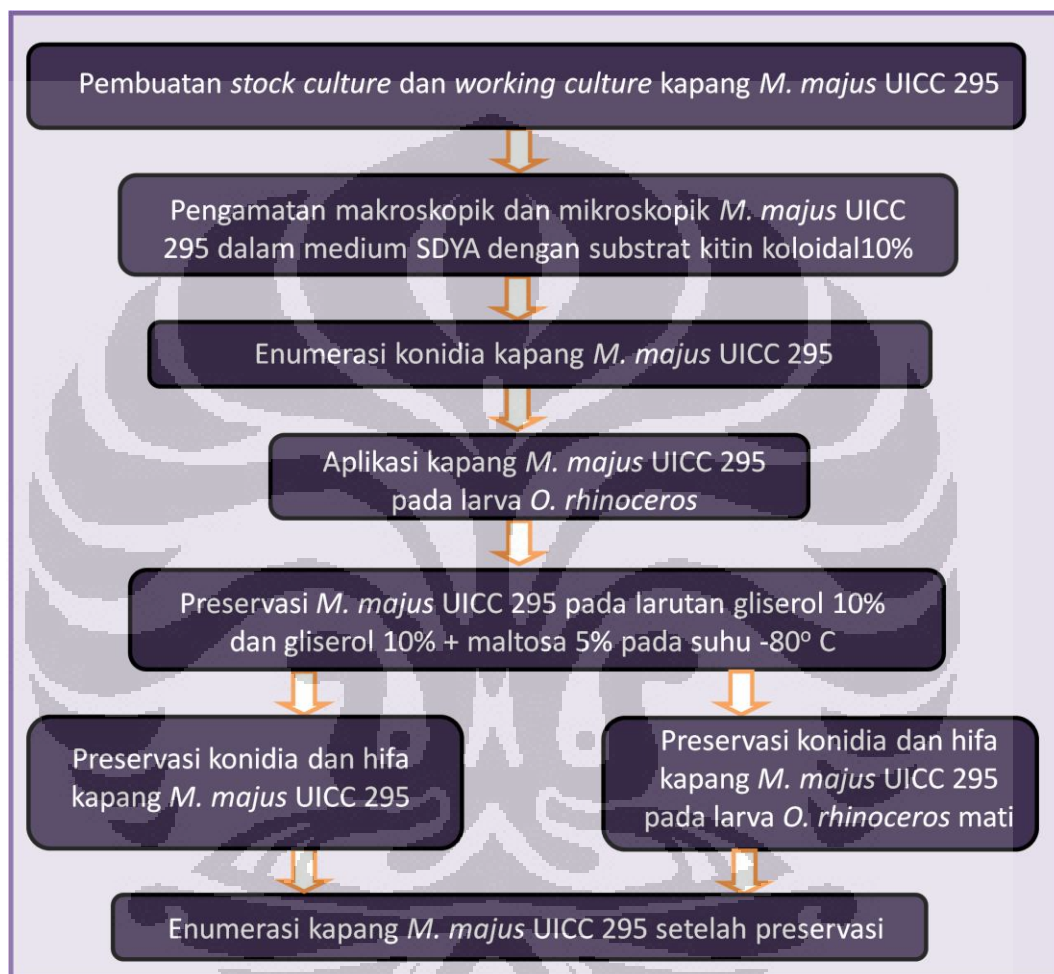
- Herlinda H. S., C. Irsan, Rekamayasari & S. Septariani. 2010. Identification and selection of entomopathogenic fungi as biocontrol agents from South Sumatra *Aphis gossypii*. *Microbiology Indonesia* **4**(3): 137--142.
- Hochberg, M. E. & J. K. Waage. 1991. A model for the biological control of *Oryctes rhinoceros* (Coleoptera: Scarabaeidae) by means of pathogens. *Journal of Applied Ecology* **28**: 514--531.
- Hogg, S. 2005. *Essential microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd., England: xi + 468 hlm.
- Huang, B., C. Li, R. A. Humber, K. T. Hodge, M. Fan & Z. li. 2005. Molecular evidence for the taxonomic status of *Metarhizium taii* and its teleomorph, *Cordyceps taii* (Hypocreales, Clavicipitaceae). *Mycotaxon* **94**: 137-147.
- Hubalek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* **46**: 205--229.
- Hutwimmer, S., S. Wagner, M. Affenzeller, W. Burgstaller & H. Strasser. 2008. Algorithm-based design of synthetic growth media stimulating virulence properties of *Metarhizium anisopliae* conidia. *Journal of Applied Microbiology* **105**: 2026--2034.
- 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
- Jackson, M. A. & R. J. Bothast. 1990. Carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio influence submerged-culture conidiation by the potential bioherbicide *Colletotrichum truncatum* NRRL 13737. *Applied and Environmental Microbiology* **56**(11): 3435--3438.
- 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.
- Khachatourians, G. G. & S. S. Qazi. 2008. Entomopathogenic fungi: Biochemistry and molecular biology. Dalam: Brakhage, A. A. & P. F. Zipfel (eds.). 2008. *The mycota: A comprehensive treatise on fungi as*

- experimental system for basic and applied research. Volume 2: Human and animal relationships*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 33--61.
- Leger, R. J. St., R. M. Cooper & A. K. Charnley. 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation production of chitinolytic enzymes. *Journal of General Microbiology* **132**: 1509--1517.
- Leger, R. J. St., L. Joshi, M. J. Bidochka, N. W. Rizzo & D. W. Roberts. 1996. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Applied and Environmental Microbiology* **62**(3): 907--912.
- Liu, Y. Z., Liang Z. Q., Whalley A. J., Yao Y. J. & Liu A. Y. 2001. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *Journal of Invertebrate Pathology* **78**: 178--182.
- Male, K.B., Y-M. Tzeng, J. Montes, B-L. Liu, W-C. Liao, A. Kamen & J.H.T. Luong. 2009. Probing inhibitory effects of destruxins from *Metarhizium anisopliae* using insect cell based impedance spectroscopy: Inhibition vs chemical structure. *Analyst* **134**: 1447--1452.
- Nakasone K. K., S. W. Peterson & S. C. Jong. 2004. *Preservation and distribution of fungal cultures*. Dalam: Mueller, G. M., G. F. Bills & M. S. Foster. 2004. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, Massachusetts: xvi + 777 hlm
- Nayar, K.K., T.N. Ananthkrishnan & B.V. David. 1976. *General and applied entomology*. Tata McGraw-Hill, New Delhi: xii + 589 hlm.
- Nishi O., K. Iiyama, C. Yasunaga-Aoki & S. Shimizu. 2010. Incongruence between EF-1 α phylogeny and morphology of *Metarhizium majus* and *Metarhizium guizhouense* in Japan. *Entomotech* **34**: 19--23.
- Okaraonye, C. C. & J. C. Ikewuchi. 2009. Nutritional potential of *Oryctes rhinoceros* larva. *Pakistan Journal of Nutrition* **8**(1): 35--38.
- Pointing, S.B. & K. D. Hyde. 2001. Bio-exploitation of filamentous fungi. *Fungal Diversity Research Series* **6**: 1--467.

- Prayogo, Y., W. Tengkanu & Marwoto. 2005. Prospek cendawan entomopatogen *Metarhizium anisopliae* untuk mengendalikan ulat grayak *Spodoptera litura* pada kedelai. *Jurnal Litbang Pertanian* **24**(1): 19--26.
- Prayogo, Y. 2006. Upaya mempertahankan keefektifan cendawan entomopatogen untuk mengendalikan hama tanaman pangan. *Jurnal Litbang Pertanian* **25**(2): 47--54.
- Putra, R. P. 2009. Isolasi dan pengujian kemampuan *Metarhizium majus* (Johnst.) Bisch., Rehner & Humber sebagai kapang entomopatogen dengan metode kontak langsung pada larva *Oryctes rhinoceros* Linn. Skripsi Sarjana Departemen Biologi FMIPA-UI, Depok: xii + 125 hlm.
- Rosadi, D. A. 2011. Pembuatan dan pengujian formula *M. majus* UICC 295 dengan media pembawa kentang (*Solanum tuberosum*) dalam membunuh larva *O. rhinoceros*. Skripsi sarjana Departemen Biologi FMIPA-UI, Depok: xiii + 61 hlm.
- Publitek. 2012. *Oryctes rhinoceros* stock and photos images. <http://www.fotosearch.com/photos-images/oryctes-rhinoceros.html>, 20 Juni 2012, pk. 22.00.
- Sambiran, W. J. & M. L. A. Hosang. 2007. Patogenisitas *Metarhizium anisopliae* dari beberapa media air kelapa terhadap *Oryctes rhinoceros* L. *Buletin Palma* (32): 1--11.
- Samuels, R. I. 1998. Systematics, morphology and physiology: A sensitive bioassay for destruxins, cyclodepsipeptides from the culture filtrates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Annual Society Entomology Brasil* **27**(2): 229--235.
- Sembel, T. D. 2010. *Pengendalian hayati: hama-hama serangga tropis dan gulma*. CV. Andi Offset, Yogyakarta: 286 hlm.
- Schmid-Hempel, P. 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annual Reviews Entomology* **50**: 529--51.
- Shah, P. A & J. K. Pell. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology Biotechnology*. **61**: 413--423.
- Shah, F. A., C. S. Wang & T. M. Butt. 2005. Nutrition influences growth and virulence of insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Federation*

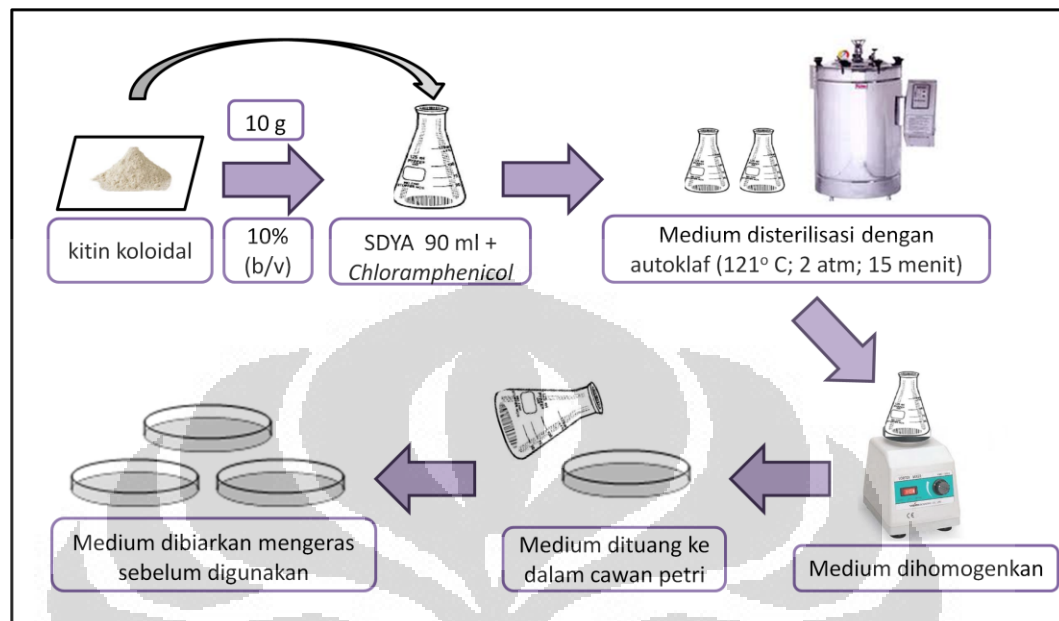
- of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. **251**(2): 259-266.
- Shanmugaiah, V., N. Mathivanan, N. Balasubramanian & P. T. Manoharan. 2008. Optimization of cultural conditions for production of chitinase by *Bacillus laterosporous* MML2270 isolated from rice rhizosphere soil. *African Journal of Biotechnology* **7**(15): 2562--2568.
- Shrestha, B., W. H. Lee, S. K. Han & J. M. Sung. 2006. Observations on some of the mycelial growth and pigmentations characteristics of *Cordyceps militaris* isolates. *Mycobiology* **34**(2): 83--91.
- Sin, T. L. 2008. Degradation of shrimp waste using chitinase produced by *Trichoderma virens* UKM1 through media selection. Degree of Master Thesis Universiti Putra Malaysia, Selangor: xiii + 139 hlm.
- Sumbali, G. & R. S. Mehrotra. 2009. *Principles of microbiology*. Tata McGraw Hill Education Private Ltd., New Delhi: xxii + 924 hlm.
- Swain, J. E. & G.D. Smith. *Cryoprotectant*. Dalam: Chian, R. C. & P. Quinn. 2010. *Cryopreservation in Female Fertility Preservation*. Cambridge University Press, Cambridge: xiii + 288 hlm.
- Talaro, K. P. 2009. *Foundations in microbiology*. McGraw Hill, New York: xxxii + 830 hlm.
- Wang, C. & R. J. St. Leger. 2006. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**(17): 6647--6652.
- Webster J. & R. W. S. Weber. 2007. *Introduction to fungi*. Cambridge University Press, New York: xiv + 841 hlm.

LAMPIRAN

Lampiran 1.
Skema kerja penelitian

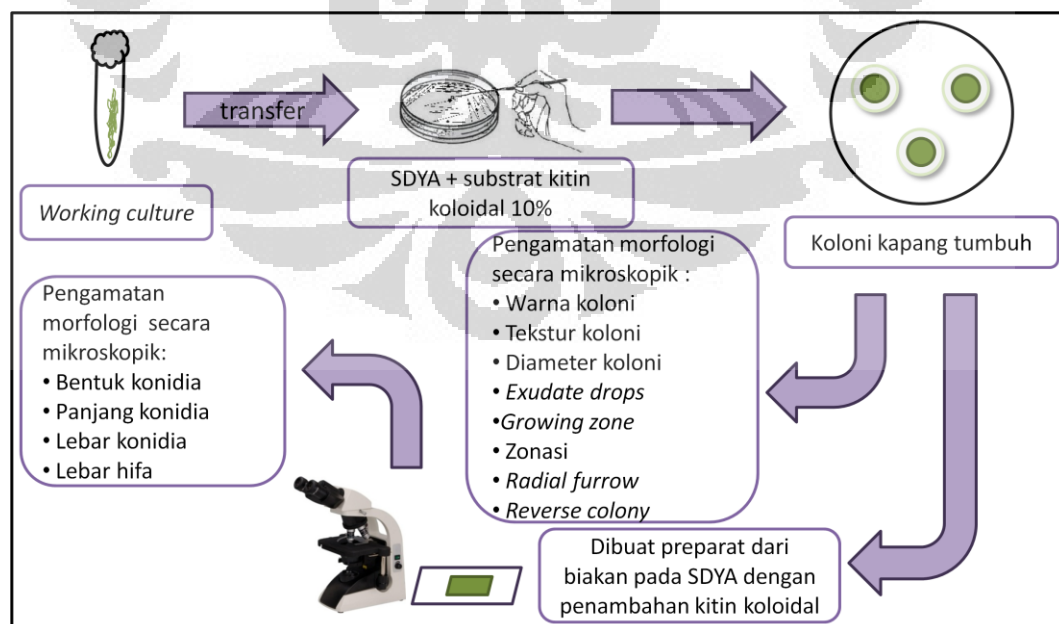
Lampiran 2.

Cara kerja pembuatan medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v)

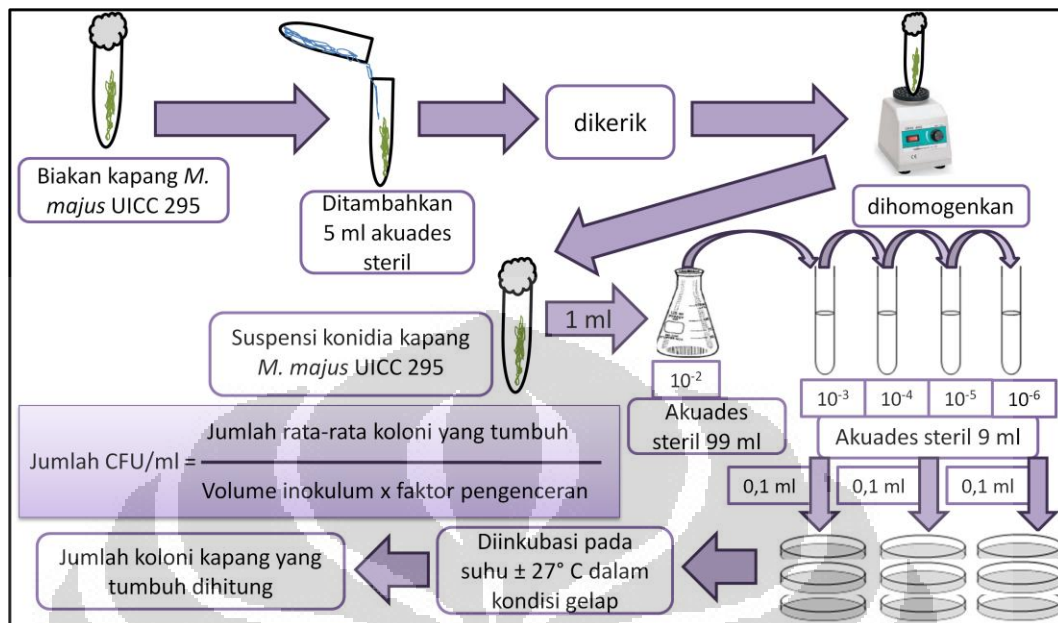


Lampiran 3.

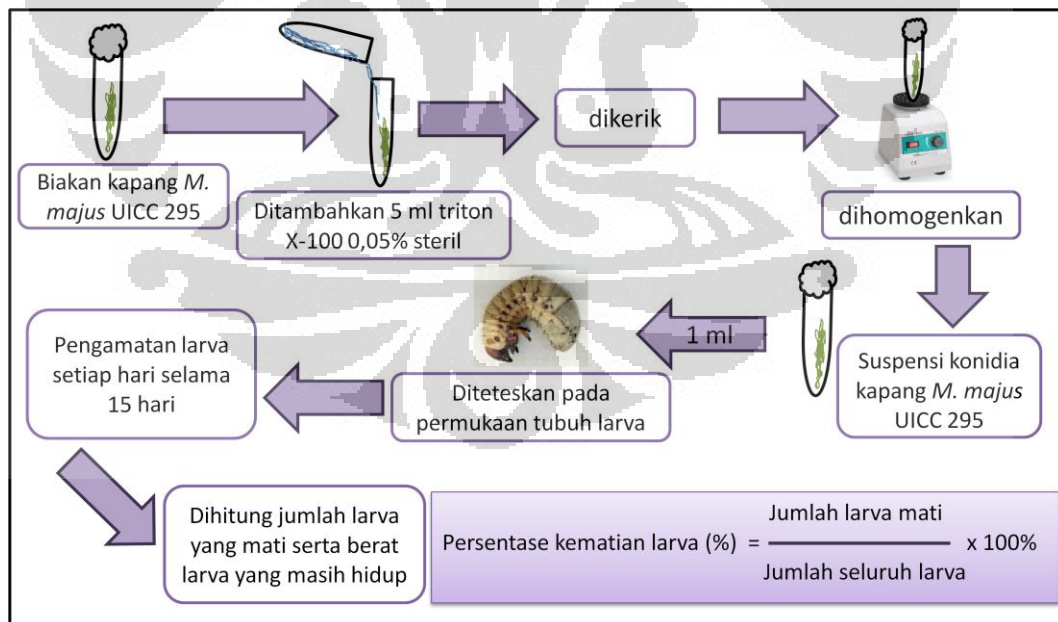
Cara kerja pengamatan morfologi *M. majus* UICC 295 secara makroskopik dan mikroskopik



Lampiran 4.
Cara kerja enumerasi *M. majus* UICC 295 menggunakan metode TPC

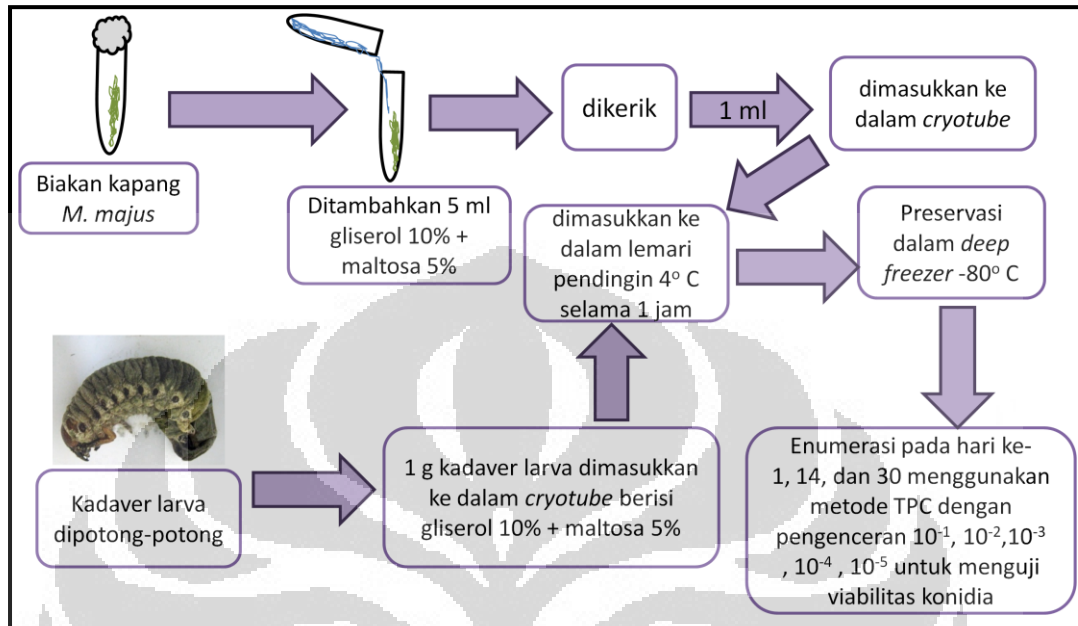


Lampiran 5.
Cara kerja aplikasi *M. majus* UICC 295 pada larva *O. rhinoceros*



Lampiran 6.

Cara kerja preservasi *M. majus* UICC 295 dengan metode *freezing* -80°C menggunakan krioprotektan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan maltosa 5% (b/v)



Lampiran 7.
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 8.

Hasil pengukuran konidia dan hifa *M. majus* UICC 295 umur 14 hari dalam medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 5% pada suhu 28° C

Ulangan ke-	Konidia		Panjang hifa (μm)
	Panjang (μm)	Lebar (μm)	
1	26,67	6,39	4,34
2	23,46	6,59	3,96
3	21,87	5,56	4,11
4	23,75	5,82	4,98
5	27,17	5,52	4,24
6	23,22	6,79	4,53
7	24,34	6,51	2,80
8	26,62	5,98	4,60
9	22,84	6,96	3,35
10	25,34	5,82	4,36
11	20,79	3,96	4,95
12	20,06	5,36	4,80
13	22,87	6,26	3,32
14	22,88	5,36	3,90
15	21,79	4,89	4,34
16	25,47	4,53	4,60
17	23,42	5,89	3,71
18	24,27	4,36	4,74
19	24,38	6,84	4,24
20	23,10	7,19	3,71
Kisaran	20,06--27,17	3,96--7,19	2,80--4,74
Rata-rata	23,72	5,83	4,18
SD	1,89	0,90	0,58

Keterangan:

SD: Standar deviasi

Lampiran 9.
 Hasil pengukuran konidia dan hifa *M. majus* UICC 295 umur
 14 hari dalam medium SDYA dengan penambahan kitin
 koloidal 10% pada suhu 28° C

Ulangan ke-	Konidia		Panjang hifa (µm)
	Panjang (µm)	Lebar (µm)	
1	30,98	6,51	4,60
2	22,88	6,39	4,55
3	23,00	6,17	4,36
4	23,28	7,20	5,24
5	24,21	6,26	4,74
6	25,37	5,08	4,24
7	21,70	6,59	4,36
8	24,01	7,27	4,55
9	27,23	6,59	5,20
10	24,66	6,92	3,71
11	24,08	7,27	3,96
12	24,66	6,26	4,36
13	22,01	7,27	3,90
14	24,86	5,61	6,26
15	20,70	7,83	4,80
16	23,92	6,14	4,69
17	26,22	6,70	4,53
18	23,82	6,90	4,60
19	26,74	5,98	3,59
20	23,28	6,54	3,09
Kisaran	20,70--30,98	5,08--7,83	3,09--6,26
Rata-rata	24,38	6,57	4,47
SD	2,24	0,64	0,67

Keterangan:
 SD: Standar deviasi

Lampiran 10.
 Hasil pengukuran konidia dan hifa *M. majus* UICC 295
 umur 14 hari dalam medium SDYA dengan penambahan
 kitin koloidal 15% pada suhu 28° C

Ulangan ke-	Konidia		Panjang hifa (µm)
	Panjang (µm)	Lebar (µm)	
1	25,56	6,84	4,80
2	21,48	5,36	3,59
3	21,68	5,69	4,02
4	21,10	6,26	2,48
5	22,54	4,95	5,51
6	25,78	6,46	4,34
7	23,62	3,96	4,69
8	23,75	5,54	5,24
9	22,77	5,20	5,24
10	19,78	6,14	4,89
11	19,21	5,54	4,89
12	22,72	4,89	4,23
13	20,33	5,76	4,03
14	26,04	6,19	4,11
15	22,20	5,54	4,39
16	20,18	5,98	5,26
17	19,32	6,92	3,68
18	16,87	5,52	5,14
19	25,22	6,84	4,41
20	23,28	5,61	5,19
Kisaran	16,87--26,04	3,96--6,92	2,48--5,51
Rata-rata	22,17	5,76	4,51
SD	2,46	0,73	0,74

Keterangan:
 SD: Standar deviasi

Lampiran 11.
 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

Keterangan:
 SD: Standar deviasi

Lampiran 12.

Hasil uji ANOVA panjang konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan tepung kitin koloidal

SDYA dengan penambahan kitin koloidal (b/v)	Panjang rata-rata (μm)	SD	Nilai P
0%	23,76	2,11	0,015
5%	23,72	1,89	
10%	24,38	2,24	
15%	22,17	2,46	

*Terdapat perbedaan nyata jika nilai $P \leq 0,05$

Lampiran 13.

Hasil uji ANOVA lebar konidia *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan tepung kitin koloidal

SDYA dengan penambahan kitin koloidal (b/v)	Lebar rata-rata (μm)	SD	Nilai P
0%	6,04	0,73	0,004
5%	5,83	0,90	
10%	6,57	0,64	
15%	5,76	0,73	

*Terdapat perbedaan nyata jika nilai $P \leq 0,05$

Lampiran 14.

Hasil uji ANOVA lebar hifa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan medium SDYA dengan penambahan tepung kitin koloidal

SDYA dengan penambahan kitin koloidal (b/v)	Lebar rata-rata (μm)	SD	Nilai P
0%	2,34	0,38	0,000
5%	4,18	0,58	
10%	4,47	0,67	
15%	4,51	0,74	

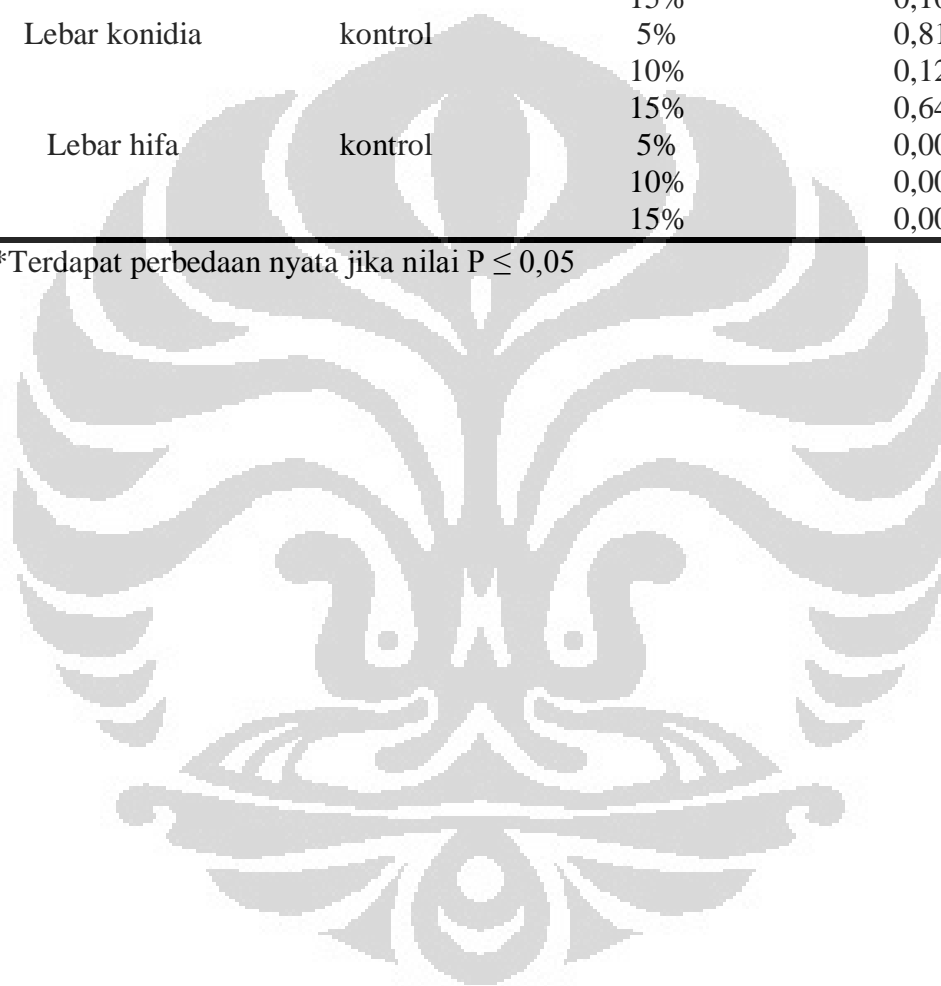
*Terdapat perbedaan nyata jika nilai $P \leq 0,05$

Lampiran 15

Hasil *multiple comparisons* menggunakan uji Tukey panjang konidia, lebar konidia, dan lebar hifa *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dan SDYA dengan penambahan tepung kitin koloidal

Variabel tetap	Perlakuan	SDYA dengan penambahan kitin koloidal (b/v)	Nilai P
Panjang konidia	kontrol	5%	1,000
		10%	0,804
		15%	0,109
Lebar konidia	kontrol	5%	0,814
		10%	0,125
		15%	0,646
Lebar hifa	kontrol	5%	0,000
		10%	0,000
		15%	0,000

*Terdapat perbedaan nyata jika nilai $P \leq 0,05$



Lampiran 16.
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 17.

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

Kode	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
KPK 1.1	11.31	11.25	11.16	9.35	mati	mati
KPK 1.2	11.3	11.08	10.96	mati	mati	mati
KPK 1.3	11.26	11.43	11.62	10.81	mati	mati
KPK 1.4	11.24	11.37	11.44	9.6	mati	mati
KPK 1.5	11.12	11.09	11.05	mati	mati	mati
KPK 1.6	11.12	10.92	10.6	mati	mati	mati
KPK 1.7	11.11	11.16	11.28	10.1	mati	mati
KPK 1.8	11.07	11.09	11.21	9.87	mati	mati
KPK 1.9	11.04	10.99	10.85	mati	mati	mati
KPK 1.10	10.99	10.95	10.85	mati	mati	mati
Rata-rata	11.16 ± 0.11	11.13 ± 0.17	11.10 ± 0.30	9.95 ± 0.56		
KPK 2.1	10.98	10.76	10.5	mati	mati	mati
KPK 2.2	10.93	11.74	12.48	mati	mati	mati
KPK 2.3	10.89	10.76	10.61	8.86	mati	mati
KPK 2.4	10.83	10.91	11.07	mati	mati	mati
KPK 2.5	10.83	10.88	10.97	9.7	mati	mati
KPK 2.6	10.82	10.43	9.02	mati	mati	mati
KPK 2.7	10.81	10.35	9.73	mati	mati	mati
KPK 2.8	10.8	10.82	10.77	mati	mati	mati
KPK 2.9	10.8	10.77	10.64	9.4	mati	mati
KPK 2.10	10.76	10.81	10.8	mati	mati	mati
Rata-rata	10.85 ± 0.07	10.82 ± 0.371	10.66 ± 0.89	9.32 ± 0.43		
KPK 3.1	10.74	10.7	10.62	mati	mati	mati
KPK 3.2	10.69	10.72	10.8	9.12	mati	mati
KPK 3.3	10.66	10.68	10.73	mati	mati	mati
KPK 3.4	10.6	10.32	9.98	6.89	mati	mati
KPK 3.5	10.55	10.62	10.88	mati	mati	mati
KPK 3.6	10.54	9.87	9.69	mati	mati	mati
KPK 3.7	10.5	10.78	11.02	mati	mati	mati
KPK 3.8	10.47	10.21	9.78	mati	mati	mati
KPK 3.9	10.45	10.42	10.37	mati	mati	mati
KPK 3.10	10.44	9.97	8.73	mati	mati	mati
Rata-rata	10.56 ± 0.11	10.43 ± 0.33	10.26 ± 0.71	8.00 ± 1.58		

Keterangan:

KPK : Kelompok perlakuan kitin koloidal

Lampiran 18.

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

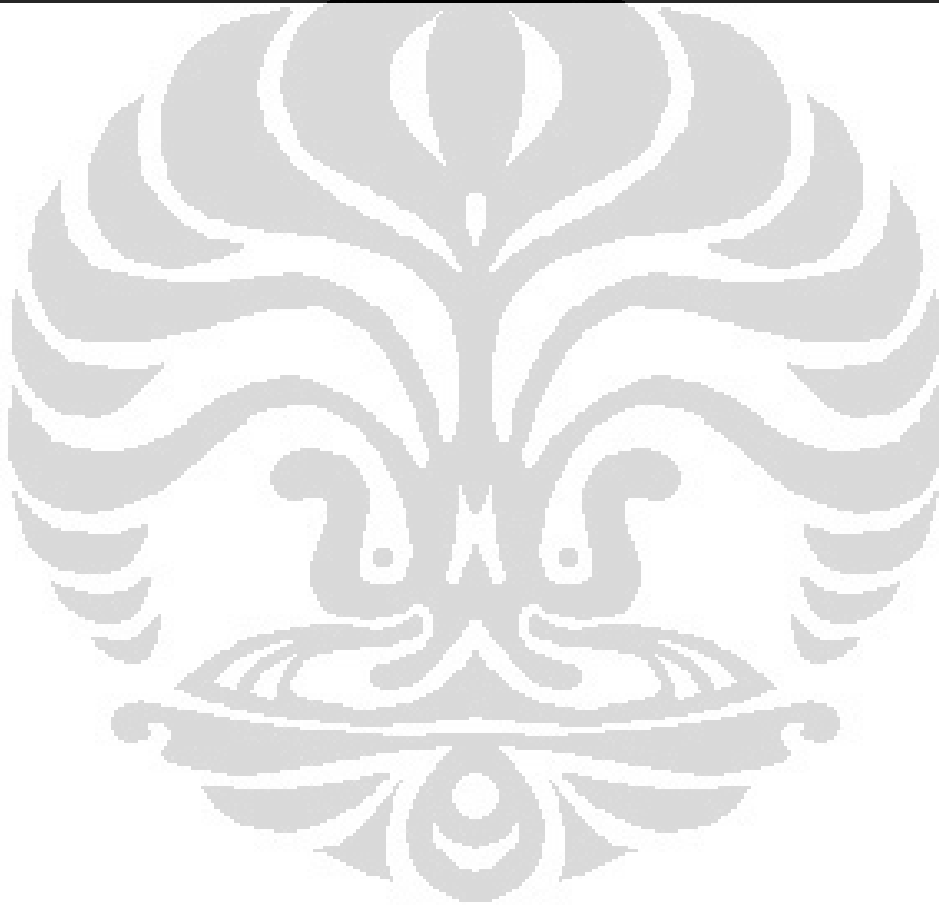
KPS : Kelompok perlakuan SDYA

Lampiran 19.
 Hasil TPC *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi pada -80°
 C 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	-	1,67 x 10 ⁶		
		2	>300	158				
		3	>300	161				
	10 ⁻⁴	1	56	44	6,2 x 10 ⁶	4,4 x 10 ⁶	6,6 x 10 ⁶	4,46 x 10 ⁶
		2	55	45				
		3	75	44				
	10 ⁻⁵	1	10	9	7 x 10 ⁶	7,3 x 10 ⁶		
		2	5	5				
		3	6	8				
1	10 ⁻³	1	>300	135	-	1,29 x 10 ⁶		
		2	>300	112				
		3	>300	139				
	10 ⁻⁴	1	29	35	5,1 x 10 ⁶	2,40 x 10 ⁶	3,7 x 10 ⁶	1,56 x 10 ⁶
		2	41	20				
		3	84	17				
	10 ⁻⁵	1	1	1	2,3 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶		
		2	4	1				
		3	2	1				
14	10 ⁻³	1	101	98	1,06 x 10 ⁶	1,08 x 10 ⁶		
		2	113	118				
		3	104	109				
	10 ⁻⁴	1	40	18	4,8 x 10 ⁶	1,77 x 10 ⁶	3,4 x 10 ⁶	1,51 x 10 ⁶
		2	54	17				
		3	50	18				
	10 ⁻⁵	1	4	2	4,3 x 10 ⁶	1,67 x 10 ⁶		
		2	4	2				
		3	5	1				

Lampiran 19. (lanjutan)

30	10^{-3}	1	144	101	$1,92 \times 10^6$	$1,02 \times 10^6$	$3,25 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
		2	194	100				
		3	133	105				
	10^{-4}	1	32	11	$3,5 \times 10^6$	$1,26 \times 10^6$	$3,25 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
		2	36	15				
		3	37	12				
	10^{-5}	1	7	1	$4,33 \times 10^6$	$1,33 \times 10^6$		
		2	3	1				
		3	3	2				

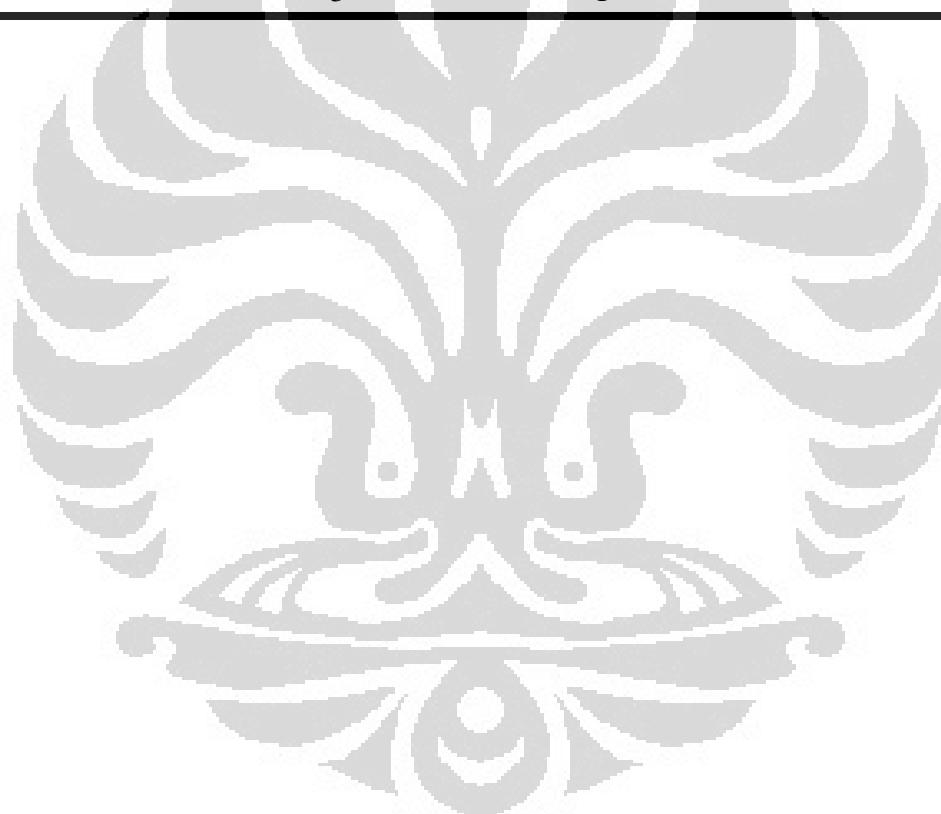


Lampiran 20.
 Hasil TPC *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi
 menggunakan krioprotektan gliserol 10% (v/v)

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	2	1	2	1	2
0	10 ⁻³	1	>300	186				
		2	>300	158	-	1,67		
		3	>300	161		x 10 ⁶		
	10 ⁻⁴	1	56	44	6,2 x	4,4 x	6,6 x	4,46
		2	55	45	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	x 10 ⁶
		3	75	44				
	10 ⁻⁵	1	10	9				
		2	5	5	7 x	7,3 x		
		3	6	8	10 ⁶	10 ⁶		
1	10 ⁻³	1	160	121				
		2	164	134	1,52	1,26		
		3	131	124	x 10 ⁶	x 10 ⁶		
	10 ⁻⁴	1	65	32	7,03	3,76	4,63 x	2,67
		2	75	46	x 10 ⁶	x 10 ⁶	10 ⁶	x 10 ⁶
		3	71	35				
	10 ⁻⁵	1	8	5				
		2	2	3	5,33	3,33		
		3	6	2	x 10 ⁶	x 10 ⁶		
14	10 ⁻²	1	159	122				
		2	163	138	1,44	1,26		
		3	112	117	x 10 ⁵	x 10 ⁵		
	10 ⁻³	1	17	10	3,90	1,47		
		2	30	14	x 10 ⁵	x 10 ⁵		
		3	30	21			3,11 x	2,02
	10 ⁻⁴	1	5	4			10 ⁵	x 10 ⁵
		2	4	3	4,00	3,33		
		3	3	3	x 10 ⁵	x 10 ⁵		
10 ⁻⁵	1	-	-					
	2	-	-	-	-			
	3	-	-					

Lampiran 20. (lanjutan)

30	10^{-1}	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10^{-2}	1	111	127				
		2	148	112	$1,33 \times 10^5$	$1,20 \times 10^5$		
		3	141	121			$1,25 \times 10^5$	$1,11 \times 10^5$
	10^{-3}	1	7	11				
		2	17	10	$1,17 \times 10^5$	$1,13 \times 10^5$		
		3	11	13				
	10^{-4}	1	-	1				
		2	-	1	-	$1,05 \times 10^5$		
		3	-	1				



Lampiran 21.

Hasil TPC *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA setelah preservasi menggunakan krioprotektan gliserol 10% (v/v) dengan penambahan maltosa 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
0	10 ⁻³	1	>300	186				
		2	>300	158	-	1,67		
		3	>300	161		x 10 ⁶		
	10 ⁻⁴	1	56	44	6,2 x	4,4 x	6,6 x	4,46 x
		2	55	45	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
		3	75	44				
	10 ⁻⁵	1	10	9				
		2	5	5	7 x	7,3 x		
		3	6	8	10 ⁶	10 ⁶		
1	10 ⁻³	1	136	129				
		2	185	132	1,66	1,32		
		3	178	136	x 10 ⁶	x 10 ⁶		
	10 ⁻⁴	1	34	38	3,43	3,6 x	2,92	3,07 x
		2	35	29	x 10 ⁶	10 ⁶	x 10 ⁶	10 ⁶
		3	34	41				
	10 ⁻⁵	1	2	3				
		2	3	5	3,67	4,3 x		
		3	6	5	x 10 ⁶	10 ⁶		
14	10 ⁻²	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10 ⁻³	1	124	118				
		2	131	134	1,24	1,29		
		3	116	135	x 10 ⁶	x 10 ⁶	2,03	1,77 x
	10 ⁻⁴	1	23	32			x 10 ⁶	10 ⁶
		2	28	20	2,53	2,7 x		
		3	25	29	x 10 ⁶	10 ⁶		
10 ⁻⁵	1	4	2					
	2	1	1	2,33	1,33			
	3	2	1	x 10 ⁶	x 10 ⁶			

Lampiran 21. (lanjutan)

30	10^{-2}	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10^{-3}	1	102	105				
		2	97	100	1×10^6	$1,02 \times 10^6$		
		3	101	102				
	10^{-4}	1	22	16				
		2	12	17	$1,7 \times 10^6$	$1,47 \times 10^6$	$1,46 \times 10^6$	$1,39 \times 10^6$
		3	17	11				
	10^{-5}	1	1	2				
		2	1	2	$1,67 \times 10^6$	$1,67 \times 10^6$		
		3	3	1				



Lampiran 22.
 Hasil TPC *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 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	84	72	8 x 10 ⁶	8,03 x 10 ⁶	8,89 x 10 ⁶	9,34 x 10 ⁶
		2	77	88				
		3	79	81				
	10 ⁻⁵	1	5	12	8,67 x 10 ⁶	1 x 10 ⁷		
		2	10	8				
		3	11	10				
	10 ⁻⁶	1	1	-	1 x 10 ⁷	1 x 10 ⁷		
		2	1	2				
		3	1	1				
1	10 ⁻³	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10 ⁻⁴	1	40	58	5,63 x 10 ⁶	5,13 x 10 ⁶	5,14 x 10 ⁶	4,23 x 10 ⁶
		2	54	53				
		3	75	43				
	10 ⁻⁵	1	5	2	4,67 x 10 ⁶	3,33 x 10 ⁶		
		2	1	1				
		3	8	7				
14	10 ⁻³	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10 ⁻⁴	1	81	78	7,03 x 10 ⁶	6,83 x 10 ⁶	7,85 x 10 ⁶	6,92 x 10 ⁶
		2	62	65				
		3	68	62				
	10 ⁻⁵	1	6	7	8,67 x 10 ⁶	7 x 10 ⁶		
		2	12	5				
		3	8	9				

Lampiran 22. (lanjutan)

30	10^{-2}	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10^{-3}	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10^{-4}	1	72	65				
		2	63	66	7,07 $\times 10^6$	6,8 \times 10^6	5,2 \times 10^6	5,24 $\times 10^6$
		3	77	73				
	10^{-5}	1	5	3				
		2	2	4	3,33 $\times 10_6$	3,67 $\times 10^6$		
		3	3	4				



Lampiran 23.

Hasil TPC *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) setelah preservasi menggunakan krioprotektan 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	>300					
		2	>300	>300	-	-			
		3	>300	>300					
	10 ⁻⁴	1	84	72					
		2	77	88	8 x 10 ⁶	8,03 x 10 ⁶			
		3	79	81			8,89 x 10 ⁶	9,34 x 10 ⁶	
	10 ⁻⁵	1	5	12					
		2	10	8	8,67 x 10 ⁶	1 x 10 ⁷			
		3	11	10					
	10 ⁻⁶	1	1	-					
		2	1	2	1 x 10 ⁷	1 x 10 ⁷			
		3	1	1					
	1	10 ⁻³	1	67	62				
			2	61	58	6,43 x 10 ⁵	6,3 x 10 ⁵		
			3	65	69				
10 ⁻⁴		1	29	14					
		2	11	21	1,77 x 10 ⁶	1,67 x 10 ⁶	1,36 x 10 ⁶	1,21 x 10 ⁶	
		3	13	15					
10 ⁻⁵		1	3	1					
		2	1	1	1,67 x 10 ⁶	1,33 x 10 ⁶			
		3	1	2					

Lampiran 23. (lanjutan)

14	10^0	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-			
		3	>300	>300				
	10^{-1}	1	80	95	9,43	9,13		
		2	102	97	$\times 10^3$	$\times 10^3$		
		3	101	82				
	10^{-2}	1	12	11	1,57	1,37		
		2	14	15	$\times 10^4$	$\times 10^4$		
		3	21	15			1,61	1,65 x
	10^{-3}	1	2	3	2,33	2,67	$\times 10^4$	10^4
		2	3	4	$\times 10^4$	$\times 10^4$		
		3	2	1				
	10^{-4}	1	-	-				
		2	-	-	-	-		
		3	-	-				
10^{-5}	1	-	-					
	2	-	-	-	-			
	3	-	-					
30	10^0	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10^{-1}	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300			5,77	5,3 x
	10^{-2}	1	72	67	6,87	6,93	$\times 10^4$	10^4
		2	76	78	$\times 10^4$	$\times 10^4$		
		3	58	63				
	10^{-3}	1	3	5	4,67	3,67		
		2	4	4	$\times 10^4$	$\times 10^4$		
		3	7	2				

Lampiran 24.

Hasil TPC *M. majus* UICC 295 pada medium SDYA dengan penambahan kitin koloidal 10% (b/v) setelah preservasi menggunakan krioprotektan gliserol 10% (v/v) dan maltosa 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	
0	10 ⁻³	1	>300	>300					
		2	>300	>300	-	-			
		3	>300	>300					
	10 ⁻⁴	1	84	72					
		2	77	88	8 x 10 ⁶	8,03 x 10 ⁶			
		3	79	81			8,89 x 10 ⁶	9,34 x 10 ⁶	
	10 ⁻⁵	1	5	12					
		2	10	8	8,67 x 10 ⁶	1 x 10 ⁷			
		3	11	10					
	10 ⁻⁶	1	1	-					
		2	1	2	1 x 10 ⁷	1 x 10 ⁷			
		3	1	1					
	1	10 ⁰	1		>300				
			2		>300	-	-		
			3		>300				
10 ⁻¹		1		>300					
		2		>300	-	-			
		3		>300					
10 ⁻²		1		Tidak dilakukan	120				
		2			105	-	1,1 x 10 ⁵		
		3			104			1,09 x 10 ⁵ 1,81 x 10 ⁵	
10 ⁻³		1	15	16					
		2	18	11	1,17 x 10 ⁵	1,33 x 10 ⁵			
		3	12	13					
10 ⁻⁴		1	3	3					
		2	1	4	1 x 10 ⁵	3 x 10 ⁵			
		3	7	2					
10 ⁻⁵	1	-	-						
	2	-	-	-	-				
	3	-	-						

Lampiran 24. (lanjutan)

14	10^0	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10^{-1}	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10^{-2}	1	85	95				
		2	104	87	$8,9 \times 10^4$	$8,83 \times 10^4$		
		3	78	83			$1,65 \times 10^5$	$1,58 \times 10^5$
10^{-3}	1	12	14					
	2	11	11	$1,07 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$			
	3	9	11					
10^{-4}	1	2	1					
	2	4	5	3×10^5	$2,67 \times 10^5$			
	3	3	2					
30	10^0	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10^{-1}	1	>300	>300				
		2	>300	>300	-	-		
		3	>300	>300				
	10^{-2}	1	95	109				
		2	101	97	$1,01 \times 10^5$	$1,03 \times 10^5$	$1,48 \times 10^5$	$1,33 \times 10^5$
		3	107	102				
10^{-3}	1	23	18					
	2	10	16	$1,67 \times 10^5$	$1,63 \times 10^5$			
	3	17	15					
10^{-4}	1	3	1					
	2	1	2	$1,67 \times 10^5$	$1,33 \times 10^5$			
	3	1	1					