

PENAMBAHAN SENYAWA KITIN UNTUK MENINGKATKAN VIRULENSI CENDAWAN ENTOMOPATOGEN *BEAVERIA BASSIANA* DALAM MEMBUNUH SERANGGA HAMA

*The Addition of Chitin Compounds to Increase the Virulence of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* in Killing Insect Pests*

Yusmani Prayogo¹, Aminudin Afandi², Retno D Puspitarini², Rima Q Rachmawati³

ABSTRAK

Beauveria bassiana merupakan salah satu jenis cendawan entomopatogen yang memiliki kisaran inang cukup luas dan mudah dikembangbiakkan sebagai agens pengendalian berbagai jenis hama. Perbanyak cendawan entomopatogen di media alami terus menerus menyebabkan penurunan viabilitas, sehingga berpengaruh langsung terhadap virulensi cendawan. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari virulensi cendawan *B. bassiana* yang dikulturkan pada media tumbuh mengandung kitin. Perlakuan adalah jenis kitin yang diperoleh dari serangga *Gryllus assimilis*, *Perna viridis*, dan *Scylla serrata*. Masing-masing serangga sebagai sumber kitin dikeringkan di bawah sinar matahari, selanjutnya digiling hingga berbentuk tepung, setelah itu ditambahkan pada media tumbuh dari agar dektose kentang (ADK). Cendawan *B. bassiana* dikulturkan pada media tumbuh di dalam cawan Petri berdiameter 9 cm kemudian diamati produksi konidia, viabilitas dan virulensi cendawan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan kitin dari serangga *G. assimilis*, *P. viridis*, dan *S. serrata* pada media tumbuh ADK tidak mampu meningkatkan produksi konidia, tetapi mampu meningkatkan viabilitas dan virulensi cendawan. Kitin dari serangga *P. viridis* konsentrasi 0,5% yang ditambahkan ke dalam media tumbuh mampu memacu produksi konidia *B. bassiana* terbanyak ($20,5 \times 10^7$ /ml) dibandingkan kitin dari serangga *G. assimilis* maupun *S. serrata*. Selain itu, kitin dari *P. viridis* 0,5% pada biakan cendawan *B. bassiana* mampu menyebabkan mortalitas *Spodoptera litura* mencapai 60%. Namun kitin dalam bentuk tepung yang ditambahkan dalam konsentrasi yang tinggi menyebabkan peningkatan kepadatan media tumbuh sehingga pertumbuhan dan perkembangan cendawan *B. bassiana* lebih

lambat dibandingkan kontrol sebab kitin sulit larut dalam air. Oleh karena itu, untuk memperoleh jenis kitin dan konsentrasi yang tepat dalam meningkatkan virulensi cendawan *B. bassiana* masih diperlukan penelitian lebih lanjut.

Kata kunci: *B. bassiana*, konidia, mortalitas, *S. litura*, virulensi

ABSTRACT

Beauveria bassiana as one of the entomopathogenic fungi has a broad spectrum host and easily developed as biological control agents of several pests. Multiplication of entomopathogenic fungi in natural media continuously caused will loss of viability so that directly affect the virulence of the fungi. The aim of this research was to study the virulence of *B. bassiana* that was cultured on growth media containing chitin. The treatment of types of chitin were obtained from *Gryllus assimilis*, *Perna viridis*, and *Scylla serrata*. The insects as a chitin source were sun dried then mashed into powder, and added in the growth medium containing potato dextrose agar. The fungus of *B. bassiana* cultured on growth medium in a Petri dish 9 cm in diameter was then observed with conidial production, viability and virulence of the fungus. The results showed that the addition of chitin from *G. assimilis*, *P. viridis* and *S. serrata* on growth medium was unable to increase the production of conidia, but able to increase viability and virulence of the fungi. Chitin concentration of 0.5% *P. viridis* added to the growing medium was able to stimulate the production of *B. bassiana* conidia up to 20.5×10^7 conidia/ml compared to chitin of *G. assimilis* and *S. Serrata* insects. In addition, the growth medium containing of 0.5% chitin from *P. viridis* was also capable of causing the highest mortality of *S. litura* reaching 60%. Chitin powder that was added to the potato dextrose agar increased the density growth media that trigger the growth and development of *B. bassiana* because chitin difficult to dissolve in the water. Therefore, to obtain the type of chitin and appropriate concentrations in increasing the virulence of the fungus *B. bassiana* was still needed in the further research.

Keywords: *B. bassiana*, conidia, mortality, *S. litura*, virulence

¹Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi
Jl. Raya Kendalpayak Km 8, Kotak Pos 66, Malang
65101 e-mail: yusmani.prayogo@yahoo.com

²Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya Jalan
Veteran Malang 65145

³Mahasiswa Agroteknologi Universitas Brawijaya
Naskah diterima 20 Februari 2017; disetujui
untuk diterbitkan tanggal 23 Juni 2017.

PENDAHULUAN

Beauveria bassiana merupakan salah satu cendawan entomopatogen yang memiliki efikasi cukup tinggi dalam membunuh beberapa ordo serangga hama, baik tanaman perkebunan, hortikultura maupun tanaman pangan (Trizelia 2005; Marcic *et al.* 2013; Barbara *et al.* 2015). Hasil penelitian Li *et al.* (2013) dan Reddy *et al.* (2013) mengindikasikan bahwa cendawan *B. bassiana* efektif membunuh nimfa maupun menggagalkan penetasan telur wereng cokelat (*Nilaparvata lugens*). Sementara itu, *B. bassiana* mampu menurunkan fekunditas, menggagalkan penetasan telur dan pergantian kulit (*moulting*) pada stadia larva *Cylas formicarus* sehingga serangga tidak dapat melangsungkan hidupnya menjadi imago (Ondiaka *et al.* 2008). Laporan lain menunjukkan bahwa *B. bassiana* efektif menekan perkembangan kutu kebul (*Bemisia tabaci*), pemakan polong (*Helicoverpa armigera*), dan penggerek polong kacang hijau (*Maruca testulalis*) (Sandhu *et al.* 2000; Ekési *et al.* 2002; Espinel *et al.* 2009).

Beberapa keunggulan biopestisida dari cendawan *B. bassiana* sebagai agens hayati untuk pengendalian hama antara lain; (1) mudah diperbanyak atau dikembangkan pada media alami atau buatan; (2) mudah dikembangkan dan dilakukan oleh setiap orang; (3) tidak menyebabkan resistensi pada hama sasaran; (4) aman terhadap lingkungan, sumber air maupun ternak; serta (5) kualitas produk yang dihasilkan semakin meningkat karena bebas residu (Zimmermann 2007; Kim *et al.* 2013; Latifian *et al.* 2013; Kim *et al.* 2014; Kassa *et al.* 2015; Khosvari *et al.* 2015).

Hasil penelitian sebelumnya mengindikasikan bahwa efikasi cendawan *B. bassiana* ditentukan oleh isolat cendawan, stadia serangga yang dikendalikan, kerapatan konidia, jumlah dan frekuensi aplikasi, serta waktu aplikasi (Stafford dan Allan 2010; Trizelia *et al.* 2012). Salah satu kelemahan biopestisida yang berasal dari cendawan terutama *B. bassiana* adalah penurunan virulensi akibat diproduksi secara massal secara terus menerus pada media alami. Kondisi ini disebabkan karena cendawan entomopatogen bersifat parasit dengan cara memarasit serangga inang yang mengambil darah serangga sebagai sumber makanan untuk berkembangbiakan cendawan. Dalam perbanyakannya cendawan untuk memperoleh jumlah konidia yang berlimpah sebagai organ infeksi maka harus

diperbanyak pada media alami. Untuk meningkatkan virulensi cendawan dianjurkan untuk ditumbuhkan pada media yang banyak mengandung kitin dari serangga atau diinfeksi ulang pada serangga inang.

Kitin merupakan sumber karbon dan nitrogen (Fan *et al.* 2007; Dhar dan Kaur 2009; Hanti *et al.* 2012). Kitin adalah polimer linier dari N-asetil-glukosamin dengan sub-unit yang dihubungkan oleh ikatan α -(1,4)-glukosida (Screen *et al.* 2001; Combet *et al.* 2002; Matsumoto 2006; Ashokan *et al.* 2010). Fan *et al.* (2007) dan Mishra *et al.* (2013) melaporkan senyawa kitin merupakan biopolimer alami yang dapat ditemukan pada cangkang Crustacea, dinding sel cendawan, dan serangga (Fan *et al.* 2007). Penambahan kitin pada media tumbuh dapat merangsang produksi kitinase yang berfungsi dalam mempertahankan kemampuan infeksi cendawan entomopatogen (Herlinda *et al.* 2006).

Gryllus assimilis Fabricius (Orthoptera: Gryllidae) merupakan serangga cengkerik yang sering digunakan sebagai pakan burung yang berkembangbiak sepanjang tahun dan mudah diperbanyak di laboratorium (David *et al.* 2003; Walker, 2014). *Scylla serrata* Forskal (Decapoda: Portunidae) dan *Perna viridis* L. (Anisomyria: Mytilidae) merupakan limbah perikanan yang tersedia dalam jumlah banyak, namun hanya sedikit yang dimanfaatkan sebagai sumber kitin (Andrade *et al.* 2003; Yama 2012). Sementara itu, *G. assimilis*, *S. serrata* dan *P. viridis* yang ditambahkan pada media perbanyakannya dapat meningkatkan virulensi *Metarhizium majus* (Johnst) (Hypocreales: Clavicipitaceae) pada larva *Oryctes rhinoceros* L. (Coleoptera: Scarabaeidae) (Ayu 2012).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan sumber kitin yang berasal dari *G. assimilis*, *S. serrata*, dan *P. viridis* untuk meningkatkan virulensi cendawan *B. bassiana* dalam membunuh serangga hama.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biopestisida, Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi (Balitkabi) yang dimulai dari bulan Maret sampai Juni 2015. Percobaan disusun menggunakan rancangan acak lengkap dengan lima ulangan. Perlakuan adalah jenis dan konsentrasi kitin yang berasal dari tiga jenis serangga yang ditambahkan pada media

tumbuh agar dektrosa kentang (ADK) dan disusun sebagai berikut: P0 = (kontrol tanpa kitin); P1 = kitin dari *G. Similis* 0,5%; P2 = kitin dari *G. similis* 1%; P3 = kitin dari *S. serrata* 0,5%; P4 = kitin dari *S. serrata* 1%; P5 = kitin dari *P. viridis* 0,5%; dan P6 = kitin dari *P. viridis* 1%.

Pembuatan tepung kitin

Serangga yang digunakan dalam penelitian ini adalah *G. similis* yang diperoleh dari pasar burung di Malang, sedangkan *S. serrate* dan *P. viridis* diperoleh dari rumah makan di Sidoarjo. Masing-masing jenis serangga sebagai sumber kitin dikeringkan di bawah sinar matahari, selanjutnya digiling hingga halus menjadi tepung. Untuk menentukan konsentrasi yang tepat maka tiga jenis tepung dari serangga dianalisis kandungan kitin dan proksimat di Laboratorium Biologi, Universitas Muhammadiyah Malang. Masing-masing jenis kitin sebagai perlakuan ditambahkan ke dalam media tumbuh menggunakan agar dektrosa kentang (ADK) yang disterilisasi di dalam *autoclave* selama 30 menit pada temperatur 121°C. Perlakuan kontrol hanya menggunakan media ADK tanpa bahan kitin. Media tumbuh dimasukkan ke dalam cawan petri berdiameter 9 cm.

Inokulasi cendawan *B. bassiana* pada media tumbuh

Isolat cendawan *B. Bassiana* diperoleh dengan cara mengisolasi serangga penggerek ubijalar (*Cylas formicarius*) yang mati dan menunjukkan adanya infeksi cendawan *B. bassiana*. Gejala infeksi cendawan ditandai dengan adanya miselium yang berwarna putih mengkoloni organ tubuh khususnya integumen atau tungkai serangga. Bangkai imago *C. formicarius* direndam di dalam larutan NaOCl 0,25% selama 30 detik untuk membunuh kontaminan. Setelah itu, bangkai *C. formicarius* direndam dalam air steril selama 60 detik, kemudian bangkai serangga diletakkan di atas kertas saring steril untuk menghilangkan air pada tubuh bangkai hingga kering. Bangkai serangga diinkubasi pada media tumbuh ADK dalam cawan Petri, setelah tumbuh dilakukan identifikasi berdasarkan karakter morfologi dan fisiologi cendawan mengikuti metode yang dikembangkan Safavi (2010) atau Wang dan Zheng (2012).

Koloni cendawan *B. bassiana* yang sudah teridentifikasi kemudian dimurnikan dan ditumbuhkan pada media ADK. Pada umur 21 hari setelah inokulasi (HSI), koloni cendawan dilubangi menggunakan perforator berukuran 1 cm, kemudian koloni yang berukuran 1 cm diinkubasi pada masing-masing media ADK yang sudah mengandung masing-masing jenis dan konsentrasi kitin sesuai dengan perlakuan. Biakan cendawan disimpan dalam suhu ruangan (27 °C).

Uji virulensi cendawan *B. bassiana* terhadap larva *Spodoptera litura*

Serangga uji yang digunakan untuk mengetahui virulensi cendawan *B. bassiana* adalah *Spodoptera litura* instar III. Serangga diperoleh dari tanaman kedelai di Kebun Percobaan (KP) Kendalpayak kemudian dikembangkan dalam toples plastik. Setiap hari serangga diberi pakan daun kedelai segar hingga berkembang menjadi stadia instar akhir. Pupa yang terbentuk dari stadia instar akhir dipisahkan dan dimasukkan ke dalam toples yang diisi daun segar untuk mempertahankan kelembaban hingga pupa berkembang menjadi imago. Kelompok imago dimasukkan ke dalam toples, pada bagian dinding toples diselipkan kapas yang sudah dibasahi dengan larutan madu 10% sebagai pakan imago. Toples ditutup kain warna hitam sebagai tempat peletakan telur oleh imago betina. Telur dikumpulkan di dalam toples, telur yang menetas membentuk instar I diberi pakan daun kedelai setiap hari. Pemeliharaan serangga terus dilakukan hingga memperoleh larva instar III yang seragam umurnya sebagai perlakuan.

Serangga uji sebagai perlakuan dimasukkan ke dalam milar plastik, diameter 10 cm, tinggi 30 cm, tiap milar berisi 20 ekor. Larva *S. litura* disemprot dengan suspensi konidia cendawan *B. bassiana* menggunakan kerapatan 10⁷/ml. Dosis aplikasi suspensi konidia sebanyak 200 ml/100 ekor larva yang disemprotkan ke seluruh tubuh. Serangga uji diberi pakan daun kedelai setiap hari. Peubah yang diamati adalah sebagai berikut;

- (1). Karakter koloni *B. bassiana* dari masing-masing media tumbuh mengandung kitin yang meliputi bentuk koloni, warna koloni, ukuran konidia dan konidiofor.
- (2). Diameter koloni diamati dengan cara mengukur pertambahan jari-jari koloni cendawan setiap 24 jam.

- (3). Produksi konidia yang terbentuk dengan cara menambahkan air 10 ml ke dalam masing-masing cawan Petri pada tiap perlakuan, selanjutnya koloni dikerok menggunakan kuas halus dan dikocok menggunakan *shaker* selama 60 detik agar homogen. Suspensi konidia dihitung menggunakan *haemocytometer* dengan bantuan mikroskop.
- (4). Viabilitas konidia ditentukan berdasarkan metode Herlinda *et al.* (2006) dengan menginkubasi suspensi konidia selama 24 jam kemudian diamati menggunakan mikroskop dengan menghitung jumlah konidia yang membentuk tabung kecambah. Viabilitas konidia dihitung berdasarkan rumus:

$$V = G/U \times 100\%$$

V = viabilitas konidia setelah 24 jam diinkubasi (%)
 G = jumlah konidia yang berkecambah satu sudut pandang mikroskopis.
 U = jumlah konidia yang tidak berkecambah satu sudut pandang mikroskopis.
- (5). Virulensi cendawan dinilai dari jumlah serangga uji *S. litura* yang mati akibat infeksi cendawan *B. bassiana*.

Seluruh data yang terkumpul dianalisis menggunakan sidik ragam, jika respon dari perlakuan berpengaruh nyata, dilanjutkan dengan uji Duncan 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakter Koloni *B. bassiana*

Pengamatan terhadap karakter koloni cendawan *B. bassiana* tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan pada tiga jenis kitin dan konsentrasi yang diuji pada media tumbuh ADK. Karakter koloni cendawan *B. bassiana* yang digunakan pada penelitian ini adalah

farinaceous yaitu koloni berbentuk seperti tepung, setelah ditumbuhkan pada ADK yang mengandung kitin tidak mengalami perubahan (Tabel 1). Penambahan kitin pada konsentrasi yang berbeda juga tidak menyebabkan perubahan warna koloni cendawan *B. bassiana* meskipun media tumbuh mengandung kitin dari serangga yang berbeda. Warna koloni *B. bassiana* pada media tumbuh yang mengandung kitin dari serangga *G. assimillis*, *P. viridis* maupun *S. serrate* adalah putih, namun dengan bertambahnya umur koloni berubah menjadi agak kuning dan agak keruh.

Ukuran konidia *B. bassiana* yang ditumbuhkan pada media yang mengandung kitin dari berbagai jenis serangga tidak mengalami perbedaan, berkisar antara 2-3 x 2-3 mm. Penambahan kitin ke dalam media tumbuh juga tidak menyebabkan perubahan ukuran konidiofor cendawan *B. bassiana* berkisar antara 12 x 5,4-5,5 mm. Rehner *et al.* (2011) menyatakan bahwa cendawan *B. bassiana* yang virulen memiliki karakter koloni *farinaceous* dengan koloni berbentuk kapas dan bertepung, koloni berwarna putih kemudian berubah menjadi kuning pucat. Menurut Prayogo (2009), untuk memperoleh isolat cendawan entomopatogen *Lecanicillium lecanii* yang virulen harus menyeleksi karakter koloni yang bersifat *wholly* dengan pertumbuhan miselium lebih cepat, miselium seperti berbulu, warna putih kapas, dan mampu memproduksi konidia dalam jumlah berlimpah.

Produksi Konidia *B. bassiana*

Hasil penambahan senyawa kitin dalam bentuk tepung pada media tumbuh tidak berpengaruh nyata terhadap produksi konidia cendawan *B. bassiana* yang terbentuk. Penambahan kitin dari tiga jenis serangga, baik konsentrasi 0,5% maupun 1%, pada media tumbuh menyebabkan terbentuknya konidia cendawan *B. Bassiana* lebih rendah

Tabel 1. Bentuk dan warna koloni, ukuran konidia dan konidium cendawan *B.bassiana* pada tiga media tumbuh yang mengandung kitin

Jenis kitin	Karakter koloni				
	Karakter	Deskripsi	Warna	Ukuran konidia (mm)	Ukuran konidiofor (mm)
<i>G. assimillis</i>	<i>Farinaceous</i>	Koloni tepung	Putih (keruh)	2-3 x 2-3	12 x 5-5,5
<i>P. viridis</i>	<i>Farinaceous</i>	Koloni tepung	Putih (keruh)	2-3 x 2-3	12 x 5-5,4
<i>S. serrate</i>	<i>Farinaceous</i>	Koloni tepung	Putih (keruh)	2-3 x 2-3	12 x 5-5,5

dibandingkan dengan media ADK (kontrol). Jumlah konidia *B. bassiana* terbanyak terdapat pada perlakuan penambahan kitin dari *P. Viridis* 0,5% yaitu $2,05 \times 10^7/\text{ml}$ (Gambar 1). Sementara itu penambahan kitin dari *P. viridis* 1%, kitin dari *S. serrata* 0,5% atau 1%, serta *G. assimilis* 0,5% menghasilkan jumlah konidia yang tidak berbeda nyata, masing-masing $1,88 \times 10^7/\text{ml}$; $1,79 \times 10^7/\text{ml}$; $1,84 \times 10^7/\text{ml}$; dan $1,74 \times 10^7/\text{ml}$. Penambahan kitin dari *G. assimilis* yang dinaikkan konsentrasinya menjadi 1% menyebabkan pembentukan konidia lebih sedikit, hanya $1,28 \times 10^7/\text{ml}$. Jumlah konidia *B. bassiana* yang terbentuk pada media tumbuh ADK sebagai kontrol jauh lebih banyak, mencapai $3,13 \times 10^7/\text{ml}$.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa semakin banyak jumlah kitin yang ditambahkan pada media tumbuh semakin menurun jumlah konidia yang terbentuk. Rendahnya jumlah konidia *B. bassiana* yang terbentuk pada media mengandung kitin diduga jumlah kitin yang ditambahkan pada media tumbuh konsentrasinya terlalu tinggi. Konsentrasi kitin yang diuji pada penelitian ini rentangnya cukup jauh yaitu dengan kelipatan 0,5 dari masing-masing konsentrasi. Oleh karena itu, untuk memperoleh konsentrasi yang tepat dan jenis kitin yang cocok masih diperlukan penelitian lebih lanjut. Hendarsyah *et al.* (2006) menyatakan kitin merupakan material yang sulit larut dalam air dan menyerupai selulosa sehingga daya larut dan reaktivitas kimianya sangat rendah. Hasil penelitian Herlinda *et al.* (2006) mengindikasikan bahwa penambahan kitin dalam bentuk tepung lebih dari 0,5% dapat menghambat pembentukan konidia *B. bassiana* karena terjadi penumpukan metabolit dan memacu terbentuknya enzim yang dapat menghambat metabolisme cendawan entomopatogen. Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan Rasminah *et al.* (1997) yang mengindikasikan bahwa penambahan tepung ke dalam media tumbuh menyebabkan media tersebut semakin memadat sehingga memicu cendawan untuk membentuk konidia dengan jumlah semakin banyak. Namun Agus *et al.* (2015) menegaskan bahwa penambahan kitin pada media tumbuh berpengaruh langsung terhadap produksi konidia dan viabilitas cendawan *Penicillium* sp. jika jenis dan konsentrasi kitin yang ditambahkan tepat.

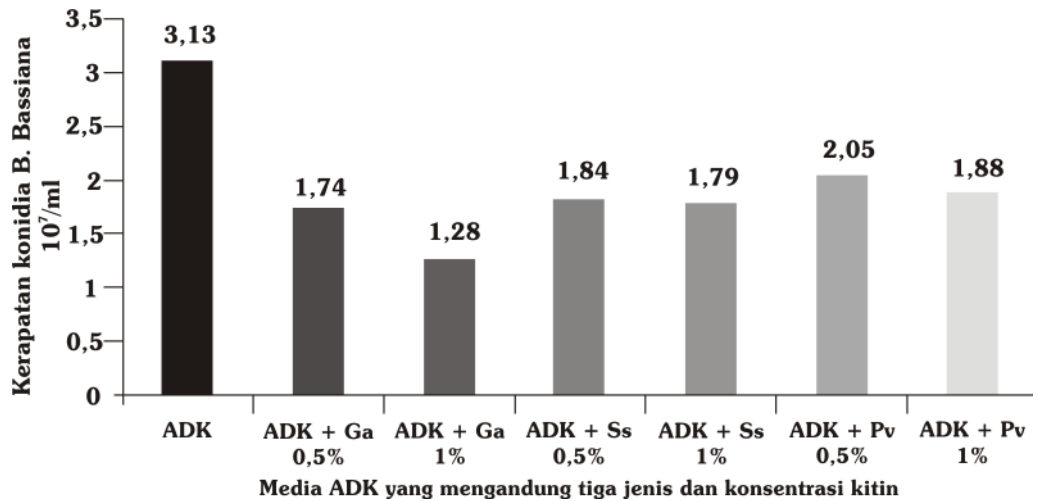
Kitin merupakan sumber nutrisi yang dibutuhkan cendawan untuk membangun

energi sehingga konidia yang dibentuk memiliki kualitas yang lebih baik dibandingkan dengan cendawan yang ditumbuhkan pada media yang tidak mengandung kitin. Matsumoto (2006); Senthiraja *et al.* (2010) melaporkan bahwa kitin merupakan sumber karbon dan nitrogen yang berfungsi sebagai nutrisi dan energi. Karbon dan nitrogen yang terdapat pada media tumbuh dapat meningkatkan pembentukan miselium dan perkecambahan konidia (Guerrero *et al.* 2007; Hoeet *et al.* 2009; Nuryanti *et al.* 2012; Kim *et al.* 2014). Sementara itu, media tumbuh yang kekurangan protein akan menyebabkan perkecambahan konidia semakin rendah sehingga mortalitas serangga juga rendah (Rosalind 2000, dan Magan 2001).

Viabilitas Konidia Cendawan *B. bassiana* pada Media Mengandung Kitin

Hasil penelitian menunjukkan penambahan kitin pada media tumbuh ADK berpengaruh nyata terhadap viabilitas konidia cendawan entomopatogen *B. bassiana*. Namun semakin tinggi konsentrasi kitin yang ditambahkan ke media tumbuh semakin menurun viabilitas konidia *B. bassiana*. Viabilitas konidia *B. bassiana* tertinggi terjadi pada perlakuan penambahan kitin *P. viridis* 0,5%, mencapai 57,07% (Gambar 2). Perlakuan penambahan kitin yang berasal dari *P. viridis* dari 0,5% menjadi 1% menyebabkan penurunan viabilitas sekitar 2%, menjadi 55,03% dan tidak berbeda nyata dengan perlakuan kitin dari *S. serrata* 0,5% maupun 1% serta perlakuan kitin dari *G. assimilis* konsentrasi 0,5%.

Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa penambahan kitin mampu meningkatkan viabilitas konidia *B. bassiana* meskipun hanya 10%. Hasil ini tampak dari viabilitas konidia pada perlakuan kontrol (media ADK) 47%, sedangkan viabilitas konidia pada perlakuan kitin berkisar antara 49-58%. Jika dilihat dari jumlah konidia yang terbentuk (Gambar 1) dan kemampuan konidia membentuk tabung kecambah maka peluang konidia yang dapat menginfeksi serangga tertinggi terjadi pada perlakuan kitin dari *P. viridis* 0,5% (58,35%) selanjutnya diikuti oleh *P. viridis* 1% (55,03%), *S. serrata* 0,5% (53,89%), *S. serrata* 1% (53,82%), *G. assimilis* 0,5% (53,19%) dan *G. assimilis* 1% (49,05%). Tingginya viabilitas konidia pada perlakuan kitin dari *P. viridis* 0,5% diduga karena terjadi penumpukan atau kelebihan



Gambar 1. Kerapatan konidia cendawan *B. bassiana* pada media tumbuh yang mengandung berbagai jenis dan konsentrasi kitin. Keterangan: ADK (agar dektrosa kentang), Ga (*G. assimilis*), Ss (*S. serrata*), Pv (*P. viridis*).

Tabel 2. Analisis kimia tepung kitin dari serangga *G. assimilis*, *S. serrata* dan *P. viridis*.

Serangga	Kandungan/100 g tepung (%)				
	Protein	Lemak	Air	Abu	Kitin
<i>G. assimilis</i>	49,96	0,64	5,35	35,59	29,80
<i>S. serrate</i>	30,38	0,34	5,36	49,12	11,50
<i>P. viridis</i>	39,02	0,59	5,73	41,58	9,89

kandungan kitin yang ditambahkan pada media tumbuh.

Kitin yang ditambahkan sebagai perlakuan pada media tumbuh adalah dalam bentuk tepung dari masing-masing jenis serangga yang dihaluskan. Hasil analisis kimia dari tepung masing-masing serangga tampak kandungan kitin dari serangga *P. viridis* sangat rendah dibandingkan dengan serangga *G. assimilis* maupun *S. serrata* (Tabel 2). Kitin dari serangga *G. assimilis* maupun *S. serrata* berturut-turut 29,80% dan 11,50% sedangkan kitin dari *P. viridis* hanya 9,80%.

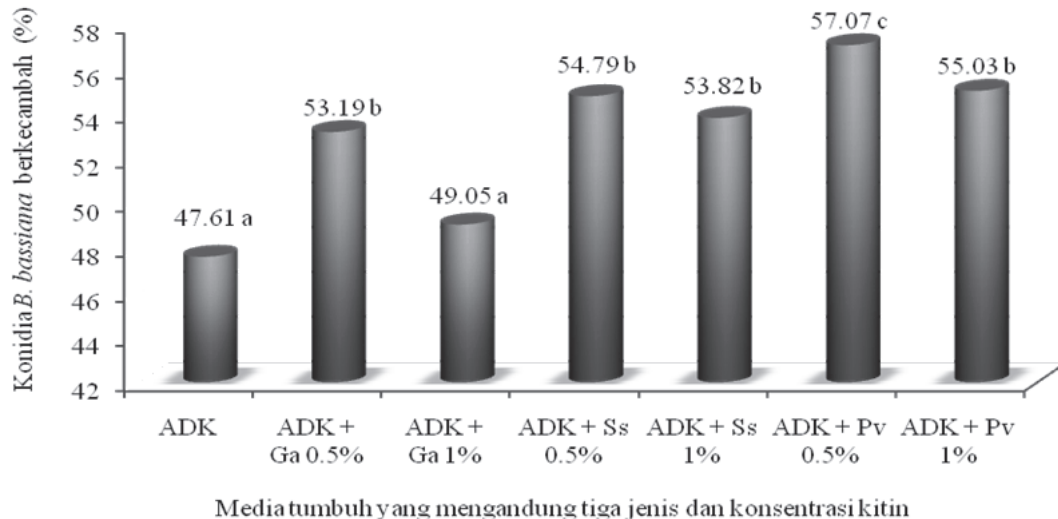
Hasil beberapa penelitian menunjukkan bahwa media tumbuh yang kaya nutrisi berpengaruh terhadap perkecambahan dan viabilitas konidia cendawan entomopatogen (Guerrero *et al.* 2007; Lopes *et al.* 2013; Kim *et al.* 2014). Namun Francisco *et al.* (2006) melaporkan bahwa cendawan entomopatogen *B. bassiana* yang ditumbuhkan pada media yang kurang nutrisi ditemukan lebih banyak konidia yang berkecambah dibandingkan dengan

konidia yang ditumbuhkan pada media yang banyak mengandung nutrisi. Fenomena ini diduga terjadi karena cendawan berusaha mempertahankan diri dari cekaman lingkungan yang kurang mendukung agar tetap bertahan untuk melangsungkan hidupnya. Produksi dan perkecambahan konidia cendawan *B. bassiana* dipengaruhi oleh kandungan gula dan nitrogen pada media tumbuh yang digunakan (Ying dan Feng 2006; Mustafa dan Kaur 2009; Mishra dan Malik 2013; Liu *et al.* 2015).

Ditinjau dari jumlah konidia yang terbentuk dan viabilitas konidia dari hasil penambahan kitin maka masih diperlukan kajian lebih mendalam untuk mengeksplorasi jenis kitin dan dosis yang tepat untuk memperoleh kualitas konidia yang tinggi. Hal ini didorong oleh keragaman jenis kitin yang tersedia cukup berlimpah dari berbagai limbah seperti cangkang kepiting, bekicot maupun limbah dari perikanan yang belum dimanfaatkan secara maksimal (Kusumaningsih *et al.* 2004; Agusnar 2005; Hargono *dkk.* 2008; Murniati dan Mudasir 2013).

Efikasi Cendawan *B. Bassiana* pada Larva *S. litura*

Salah satu cara untuk mengukur efikasi cendawan entomopatogen dalam membunuh serangga uji adalah dengan mengamati jumlah serangga uji yang mati terinfeksi akibat cendawan yang diaplikasikan. Penambahan senyawa kitin dari tepung *G. assimilis*, *S. serrata*, dan *P. viridis* pada media tumbuh



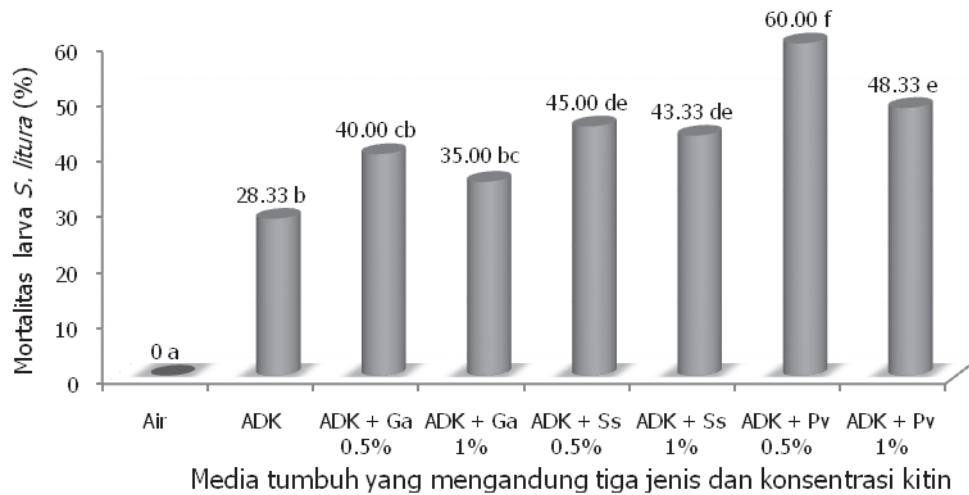
Gambar 2. Viabilitas konidia cendawan *B. bassiana* pada media tumbuh yang mengandung kitin. Keterangan: ADK (agar dektrose kentang), Ga (*G. assimilis*), Ss (*S. serrata*), Pv (*P. viridis*).

berpengaruh nyata terhadap tingkat mortalitas *S. litura*. Mortalitas larva *S. litura* terendah terjadi pada perlakuan ADK yaitu hanya 28,33% (Gambar 3). Sementara itu, mortalitas larva tertinggi terjadi pada perlakuan penambahan kitin *P. viridis* 0,5% yaitu mencapai 60%. Mortalitas pada perlakuan kitin dari *P. viridis* pada konsentrasi 1% juga relatif tinggi dan sedikit lebih tinggi dari perlakuan kitin dari serangga *G. assimilis* maupun *S. serrata*.

Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa penambahan kitin cukup berperan meningkatkan virulensi cendawan. Hal ini tampak dari perlakuan media tumbuh ADK menghasilkan konidia yang kurang berkualitas ditinjau dari persentase larva *S. Litura*, yang mati terinfeksi cendawan *B. Bassiana* hanya 28%. Sementara itu, perlakuan penambahan kitin dari jenis dan konsentrasi yang berbeda menghasilkan konidia yang lebih berkualitas meskipun jumlah konidia yang diproduksi lebih sedikit dibandingkan media tumbuh kontrol (ADK). Hal ini ditunjukkan oleh mortalitas serangga uji lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan dari media tumbuh ADK. Mortalitas serangga uji akibat infeksi cendawan entomopatogen dipengaruhi oleh faktor internal dan eksternal (Anderson *et al.* 2011; Ricario *et al.* 2013). Surtikanti dan Yasin (2009) menyatakan bahwa sifat virulen dari cendawan entomopatogen dipengaruhi oleh produksi mikotoksin dan viabilitas konidia. Senyawa kitin diduga dapat merangsang cendawan *B.*

Bassiana dalam meningkatkan produksi enzim yang berfungsi untuk proses infeksi ke serangga. Herlinda *et al.*(2006) menyatakan bahwa penambahan bahan yang mengandung kitin dan protein pada media pembiakan *B. bassiana* dapat merangsang pembentukan enzim kitinase dan protease yang mempercepat degradasi kutikula serangga inang, sehingga *B. bassiana* lebih mudah penetrasi ke integumen yang selanjutnya masuk ke rongga tubuh serangga dan lebih cepat mematikan. Oleh karena itu, kemampuan degradasi kutikula serangga dibutuhkan cendawan *B. bassiana* untuk melakukan penetrasi ke dalam tubuh dan membunuh serangga (Ortiz-Urquiza dan Keyhani 2013; Akbar *et al.* 2014; Sanchez-Perez *et al.* 2014).

Prayogo *et al.* (2005) menyatakan faktor yang mempengaruhi keefektifan cendawan dalam mengendalikan serangga adalah umur (instar) larva. Semakin bertambahnya umur larva semakin tebal integumen serangga yang terlapis *wax* dalam proses melanisasi, sehingga konidia cendawan semakin sulit melakukan penetrasi. Pergantian kulit (*moulting*) serangga juga mempengaruhi keberhasilan aplikasi cendawan entomopatogen. Serangga *S. litura* selama siklus hidupnya mengalami pergantian kulit enam kali (Prayogo 2006), sehingga aplikasi cendawan harus menghindari waktu menjelang *moulting*. Aplikasi cendawan entomopatogen yang dilakukan menjelang *moulting* menyebabkan konidia yang akan ikut terlepas pada waktu pergantian kulit.



Gambar 3. Mortalitas larva *S. litura* akibat infeksi cendawan *B. bassiana* yang ditumbuhkan pada media yang mengandung tiga jenis dan konsentrasi kitin.

Keterangan: ADK (agar dekstrose kentang), Ga (*G. assimilis*), Ss (*S. serrata*), Pv (*P. viridis*).

Selain instar serangga uji efikasi cendawan entomopatogen juga dipengaruhi oleh kerapatan konidia yang diaplikasikan. Semakin tinggi kerapatan konidia yang diaplikasikan dan semakin muda umur stadia instar maka cendawan tersebut semakin toksik dalam membunuh serangga uji atau semakin efektif pengendalian yang dilakukan (Kaur *et al.* 2011; Arooni-Hesari *et al.* 2015).

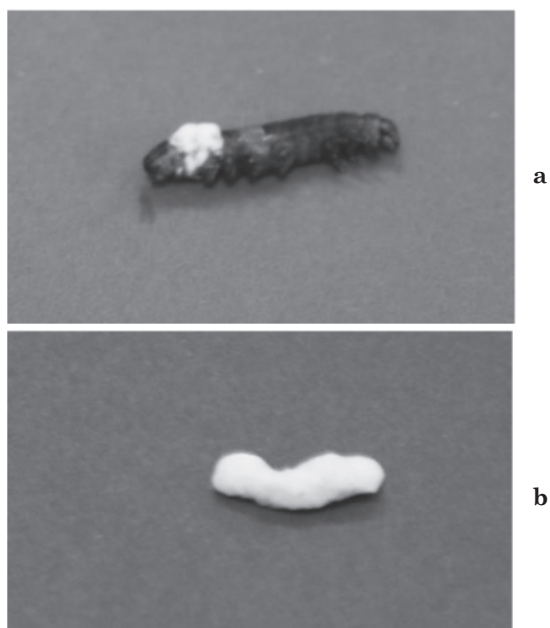
Proses Infeksi Cendawan *B. bassiana* pada Larva *S. litura*

Larva *S. litura* yang terinfeksi cendawan *B. bassiana* mengalami perubahan aktivitas/perilaku serangga yang tampak pada hari ke tiga setelah aplikasi (HSA). Gejala perubahan aktivitas yang tampak adalah nafsu makan berkurang dan pergerakan serangga sangat lamban, bahkan serangga cenderung diam. Perubahan fisiologi serangga yang tampak adalah warna pada integumen larva lebih hitam dibandingkan dengan larva sehat. Pada hari keempat larva *S. litura* yang terinfeksi cendawan *B. bassiana* mengalami kematian meskipun belum ditandai oleh adanya miselium yang tumbuh pada permukaan integumen serangga bagian luar. Seyoum *et al.* (1994 dan 2002) menyatakan bahwa serangga *Schistocerca gregaria* yang terinfeksi cendawan *Metarhizium anisopliae* maupun *M. flavoviride* mengalami penurunan nafsu makan yang signifikan dan pergerakannya lamban sebelum mengalami kematian tiga hari setelah infeksi. Devi dan Rao (2006) menyatakan hal yang sama bahwa kumbang *Mylabris pustulata* yang terinfeksi

cendawan entomopatogen *B. bassiana* juga lamban pergerakannya, bahkan tidak ada nafsu makan. Penurunan nafsu makan mencapai 80% jika serangga *Chilo partellus* instar II terinfeksi cendawan *B. bassiana* (Tefera dan Pringle 2003). Kondisi ini terjadi karena darah serangga (hemolimf) sudah teracuni oleh toksin cendawan *B. bassiana*, sehingga pH dalam hemolimf meningkat dan mengakibatkan syaraf otak tidak mampu bekerja sempurna (Lovallo *et al.* 2000; Qin *et al.* 2010; Bali dan Kaur 2013; Rajitha dan Savithri 2014).

Infeksi cendawan entomopatogen pada tubuh serangga diawali dari proses inokulasi, yaitu menempelnya konidia cendawan sebagai organ infeksi pada integumen serangga. Pada kondisi tersebut kelembaban di sekitar integumen mempunyai peran penting dalam mendukung konidia untuk membentuk tabung kecambah (*germ tube*) (Kumar *et al.* 2009; Gabarty *et al.* 2014; Devi dan Bai 2015). Kelembaban yang sesuai untuk perkecambahan konidia cendawan pada waktu proses penetrasi dan infeksi pada tubuh inang adalah di atas 95% (Luz dan Farques 1997; Estrada *et al.* 2000; Agullo *et al.* 2010; Mwanburi *et al.* 2015). Untuk melakukan penetrasi ke dalam kutikula serangga maka konidia menghasilkan berbagai enzim, yaitu kitinase, protease, dan amilase yang digunakan untuk mendegradasi lapisan tersebut (Meshrif *et al.* 2007; Ortiiz-Urquiza dan Keyhani 2013; Sanchez-Perez *et al.* 2014).

Tabung kecambah berkembang membentuk miselium masuk mengabsorpsi nutrisi dalam



Gambar 4. Kolonisasi miselium cendawan *B. bassiana* pada tubuh larva *S. litura*. Cendawan *B. bassiana* tanpa kitin (a) dan *B. bassiana* dengan kitin pada 7 hari aplikasi

hemolimfa, yaitu darah serangga yang banyak mengandung trehalosa, protein, lemak (Hallsworth dan Magan 1994 dan 1996). Cendawan yang memiliki enzim protease dan lipase tumbuh lebih cepat dalam memenuhi ruang hemosoel, sehingga darah serangga segera teracun oleh aktivitas cendawan (Ito *et al.* 2007; Lobo *et al.* 2015; Ondiaka *et al.* 2015). Prayogo *et al.* (2005) melaporkan bahwa serangga yang terinfeksi cendawan entomopatogen mengalami gangguan perilaku karena hemolimf dalam hemosoel teracun oleh toksin cendawan tersebut. Lebih lanjut dilaporkan bahwa akibat toksin cendawan menyebabkan terganggunya pH hemolimf yang pada akhirnya jika hemosoel sudah dipenuhi oleh miselium cendawan menyebabkan kematian karena sistem kerja syaraf otak serangga sudah tidak berfungsi. Pada kondisi tersebut serangga juga berusaha mempertahankan diri dari infeksi cendawan dengan memproduksi berbagai senyawa hormonal atau melanisasi (Vilcinskis dan Matha 1997; Srygley dan Jaronski 2011; Dubovskiy *et al.* 2013; Hou *et al.* 2013). Soetopo dan Indrayani (2007) juga menyatakan bahwa cendawan *B. bassiana* memproduksi toksin beauvericin yang menyebabkan gangguan pada fungsi hemolimfa dan nukleus serangga, sehingga mengakibatkan pembengkakan yang

diakhiri dengan kematian. Serangga kemudian mengalami pengerasan akibat seluruh ruang tubuh sudah dipenuhi oleh miselium. Cendawan berwarna putih sehingga tampak seperti mumi. Proses kolonisasi miselium cendawan *B. bassiana* pada tubuh larva *S. litura* lebih cepat pada perlakuan yang menggunakan penambahan kitin (Gambar 4b). Sementara itu, pada perlakuan kontrol (tanpa kitin), proses kolonisasi miselium berlangsung lambat (Gambar 4a).

Tubuh larva *S. litura* yang diselimuti oleh miselium dan dipenuhi kumpulan konidia merupakan sumber inokulum yang potensial bagi cendawan tersebut sebagai materi diseminasi atau sumber infeksi baru ke serangga inang. Diseminasi cendawan entomopatogen yang umum adalah dengan sistem horizontal, yaitu melalui serangga yang mati terinfeksi cendawan entomopatogen, kemudian pindah (infeksi) ke serangga inang (Lopes *et al.* 2011; Cheraghiet *al.* 2012).

KESIMPULAN DAN SARAN

Penambahan kitin yang berasal dari serangga *G. assimilis*, *S. serrata*, dan *P. viridis* tidak mampu meningkatkan produksi konidia, namun meningkatkan viabilitas dan virulensi konidia cendawan *B. bassiana*. Kitin dalam bentuk tepung yang berasal dari serangga *P. viridis* sebanyak 0,5% merupakan konsentrasi yang sesuai untuk meningkatkan viabilitas dan virulensi cendawan *B. bassiana*. Penambahan kitin dalam bentuk tepung dapat menyebabkan penurunan jumlah konidia yang diproduksi jika konsentrasinya terlalu tinggi dari 0,5%. Masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk memperoleh kitin dari berbagai jenis serangga dan konsentrasi yang tepat dalam meningkatkan virulensi konidia cendawan *B. bassiana*.

DAFTAR PUSTAKA

- Agullo BG, Gomez-Vidal S, Asensio L, Barranco L, Lopez-Llorca LV. 2010. Infection of the red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*) by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: A SEM study. *Microscopy Res & Technique*:1-2.
- Agus N, Saranga AP, Rosmana A, Sugiarti A. 2015. Viability and conidial production of entomopathogenic fungus *Penicillium* sp. *Inter J of Sci & Technol Res* 4(1):193-195.
- Agusnar H. 2005. Analisis sumber kitin dari limbah industri perikanan di Sumatera Utara. *Jurnal*

- Sains Kimia 9(2):85-86.
- Akbar W, Lord JC, Nechols JR, Howard RW. 2004. Diatomaceous earth increase the efficacy of *Beauveria bassiana* against *Tribolium castaneum* larvae and increases conidia attachment. *J of Econ Entomol* 97:273-280.
- Anderson RD, Bell AS, Bianford S, Paaijmans KP, Thomas MB. 2011. Comparative growth kinetics and virulence of four different isolates of entomopathogenic fungi in the house fly (*Musca domestica* L.). *J of Invertebr Pathol* 107:179-184.
- Andreade VS, Neto BB, Fukushima K, Campos-Takaki GM. 2003. Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570). *Revista Iberoamericana de Micol* 20:149-153.
- Arooni-Hesari M, Talaei-Hassanioui R, Sabahi Q. 2015. Simultaneous use of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and Diatomaceous earth against the larvae of Indian meal moth *Plodia interpunctella*. *Advances in Bio Sci and Biotechnol* 6:501-507.
- Ashokan KV, Mundaganur DS, Mundaganur YD. 2010. Catalase: Phylogenetic characterization to explore protein cluster. *J of Res in Bioinfo* 1:1-8.
- Ayu DC. 2012. Pengaruh penambahan tepung jengkerik pada medium pertumbuhan terhadap kemampuan *Metarhizium majus* UICC 295 menginfeksi larva *Oryctes rhinoceros* Linneaus. [Skripsi]. Program Studi Biologi FMIPA Universitas Indonesia.
- Bali GK, Kaur S. 2013. Phenoloxidase activity in haemolymph on *Spodoptera litura* (Fabricius) mediating immune responses challenge with entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillmin. *J of Entomol & Zool Studies* 1(6):118-123.
- Barbara LH, Makgorzata T, Makgorzata G, Agniezka M. 2015. Efficacy of *Beauveria bassiana* and Abamectin in the control of strawberry mite *Phytonemus pallidus* (Barks) (Acari: Tarsopmidae) and the susceptibility of cultivars to pest infestation. *J of Berry Res* 5(1):1-7.
- Cheraghi A, Habibpour B, Sharififard M. 2012. Horizontal transmission of the entomopathogen fungus *Metarhizium anisopliae* in *Microcerotermes diversus* groups. *Insects* 3(3):709-718.
- Combet C, Jambon M, Deleage G, Geourjon C. 2002. Deno3D: Automatic comparative molecular modeling of protein. *Bioinfo* 18(1):213-214.
- David JADeO, Zefa E, Fonttanetti. 2003. Cryptic species of *Gryllus* in the light of bioacoustics (Orthoptera: Gryllidae). *Neotrop Entomol* 32(1):75-80.
- Devi KU, Rao CU. 2006. Allee effect in the infection dynamics of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. on the beetle *Mylabris pustulata*. *Mycopathol* 161(6):385-394.
- Devi PSVP, Bai RM. 2015. Biochemical activity in the haemolymph of silk worm *Bombyx mori* L. during the infection of fungal pathogen *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Inter J of Multidisciplinary Res and Develop* 2(5):320-322.
- Dhar P, Kaur G. 2009. Effects of carbon and nitrogen source on the induction and repression of chitinase enzyme from *Metarhizium anisopliae* isolates. *Ann of Microbiol* 59:545-551.
- Dubouskiy IM, Whitten MMA, Kryukov VY, Yaroslavtseva ON, Erizanova EV, Greig C, Mukherjee K, Vilcinskis A, Mitkovets PV, Glupov VV, Butt TM. 2013. More than colour change-insect melanism, diseases resistance and fecundity. *Proceeding of The Royal B Society*:2-10.
- Ekesi S, Adamu RS, Maniania NK. 2002. Ovicidal activity of entomopathogenic Hyphomycetes to the legume pod borer, *Maruca vitrata* and the pod sucking bug *Clavigralla tomentosicollis*. *Crop Prot* 21:589-595.
- Espinel C, Torres T, Crottes AM. 2009. Effect of entomopathogenic fungi over development stages of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Rev Colomb Entomol* 35:18-21.
- Estrada AB, Dodd JC, Jeffries P. 2000. Effect of humidity and temperature on conidial germination and appressorium development of two Philippine isolates of the mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Pathol* 49:608-618.
- Fan Y, Fang W, Guo S, Pei X, Zhang Y, Xiao Y, Li D, Jin K, Bidochka MJ, Pei Y. 2007. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Appl and Environ Microbiol* 73(1):295-302.
- Francisco EA, Mochi DA, Correia A doCB, Monteiro AC. 2006. Influence of culture media in viability test of conidia of entomopathogenic fungi. *Ciencia Rural, Santa Maria* 36(4):1309-1312.
- Gaborty A, Salem HM, Fauda MA, Abas AA, Ibrahim AA. 2014. Pathogenicity induced by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in *Agrotis ipsilon* (Hubn.). *J of Radition Res & Appl Sci* 7(1):95-100.
- Guerrero JP, Jansson HB, Salinasand J, Lopez-Llorca LV. 2007. Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *J compilation The Soc for Appl Microbiol*. *J of Appl Microbiol* 104:541-553.
- Hallsworth JE, Magan N. 1994. Effect of carbohydrate type and concentration on polyhydroxy alcohol and trehalose content of conidia of three entomopathogenic fungi. *Microbiol* 140:2705-2713.
- Hallsworth JE, Magan N. 1996. Culture age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose content of fungal propagules. *Appl & Environ*

- Microbiol 2435-2442.
- Hanti L, Zach S, Seidi-Seiboth V. 2012. Fungal chitinases; diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Appl Microbiol and Biotechnol* 93(2):533-543.
- Hargono, Abdullah, Sumantri I. 2008. Pembuatan kitosan dari limbah cangkang udang serta aplikasinya dalam mereduksi kolesterol lemak kambing. *J Reaktor* 12(1): 53-57.
- Hendarsyah D. 2006. Karakterisasi kitin deasetilase termotabil isolat bakteri asal Pancuran Tujuh, Baturaden. [Skripsi]. Departemen Teknologi Industri Pertanian, FTP-IPB, Bogor.
- Herlinda S, Muhamad DU, Yulia P, Suwandi. 2006. Kerapatan dan viabilitas spora *Beauveria bassiana* akibat subkultur dan pengayaan media, serta virulensinya terhadap larva *Plutella xylostella* (Linn.). *JHPT Tropika* 6(2):70-78.
- Hoe PK, Boong CFJ, Jugah K, Rajan A. 2009. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycete) isolates and their effect on Subterranean termite *Coptotermes curvignathus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *American J of Agric and Biol Sci* 4(4):289-297.
- Hou CX, Qin GX, Guo XJ. 2013. Differentially expressed genes in the cuticle and hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* injected with the fungus *Beauveria bassiana*. *J of Insect Sci* 13(138):1-17.
- Ito ET, Varea-Peeira G, Miyagui DT, Pinotti MNP, Noves PMOJ. 2007. Production of extracellular protease by a Brazilian strain of *Beauveria bassiana* reactivated on coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. *Brazilian Arch of Biol and Technol* 50(2):217-223.
- Kassa A, Brownbridge M, Parker BL, Skimer M, Gouli V, Gouli S, Guo M, Lee F, Hata T. 2015. Whey for mass production on *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Mycol Res* 112(5):583-591.
- Kaur S, Kaur HP, Kaur K, Kaur A. 2011. Effect of different concentrations of *Beauveria bassiana* on development and reproductive potential of *Spodoptera litura* (Fabricius). *J of Biopes* 4(2):161-168.
- Khosvari R, Sendi JJ, Zibae A, Shokrgozar. 2015. Virulence of four *Beauveria bassiana* (Bals.) (Asc: Hypocreales) isolates on rose sawfly *Arge rosae* under laboratory condition. *J of King Saud University Sci* 27(1):43-53.
- Kim JS, Choi JY, Lee SJ, Lee JH, Fu Z, Skinner M, Parker BL, Je YH. 2013. Transformation of *Beauveria bassiana* to produce EGFP in *Tenebrio molitor* for use as animal feed additives. *Research Letter*:173-178.
- Kim JS, Lee SJ, Skinner M, Parker BL. 2014a. A novel approach *Beauveria bassiana* granules applied to nursery soil for management of rice water weevils in paddy fields. *Pest ManagSci* 70(8):1186-1191.
- Kim JJ, Xie L, Han JH, Lee SY. 2014b. Influence of additives on the yield and pathogenicity of conidia produced by solid state cultivation of an *Isaria javanica* isolate. *Mycobiol* 42(4):346-352.
- Kumar V, Singh GP, Babu AB, Ahsan MM, Data RK. 2009. Germination, penetration, and invasion of *Beauveria bassiana* on silk worm *Bombyx mori* causing white muscardine. *Italian J of Zool* 66:39-43.
- Kusumaningsih T, Masykur A, Arief U. 2004. Pembuatan kitosan dari kitin cangkang bekicot (*Achatina fulica*). *Biofarmasi* 2(2):64-68.
- Latifian M, Rad B, Amani M, Rahkhodaen E. 2013. Mass production of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) by using agricultural products based on liquid-solid diphasic method for date palm pest control. *Inter Jof Agric and Crop Sci*:5-19.
- Li M, Lin H, Li S, Xu A, Feng M. 2013. Efficiency of entomopathogenic fungi in the control of eggs of the brown plant hopper *Nilaparvata lugens* Stal (Homoptera: Delphacidae). *African J of Microbiol Res* 6(44):7162-7167.
- Liu H, Zhao X, Guo M, Liu H. 2015. Growth and metabolism of *Beauveria bassiana* spores and mycelia. *BMC Microbiol* 15(267):1-12.
- Lobo LS, Luz C, Fernandes EK, Juarez MP, Pedrini N. 2015. Assessing gene expression during pathogenesis: uses of QRT-PCR to follow toxin production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* during infection and immune response of the insect host *Triatoma infestans*. *J Invertebr Pathol* 128:14-21.
- Lopes RB, Martins I, Souza DA, Faria M. 2013. Influence of some parameters on the germination assessment of mycopesticides. *J of Invertebr Pathol* 112(3):236-242.
- Lovallo N, Barratt BIP, Legge M, Cor-Faster D. 2000. Effects of *Microtones aethiopoidea* parasitism on haemolymph protein composition across alternate hosts. *Entomol Exp et Appl* 95:213-216.
- Luz C, Farques. 1997. Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana* pathogenic to *Rhodnius prolixus*. *Mycopathol* 136(3):117-125.
- Magan N. 2001. Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents. p:239-252. *In*: Butt LM, Jackson CW, Magan N (ed.). *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problem and Potential*. UK: Biddles Ltd, Guildford and King's Lynn.
- Marcic D, Peric P, Petrarijevic S, Prijovic M, Drobnjakovic T, Milenkovic S. 2013. Efficacy evaluation of the mycopesticide naturalis

- (*Beauveria bassiana* strain ATCC 74040) against spider mites (Acari: Tetranychidae) in Serbia. Integrated Control of Plant Feeding mites IOBC-WPRS Bulletin 93:65-71.
- Matsumoto KS. 2006. Fungal chitinase. *Enzyme* 661(186):289-304.
- Mishra S, Malik A. 2013. Nutritional optimization of a native *Beauveria bassiana* isolate (HQ917687) pathogenic to housefly *Musca domestica* L. *J Parasit Dis* 37(2):199-207.
- Mishra S, Kumar P, Malik A. 2013. Effect of process parameters on the enzyme activity of a novel *Beauveria bassiana* isolate. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 2(9):49-56.
- Meshrif WS, Barakat FMS, Rohlfs M, Shohata MG, Seif AI, Hegazi MAM. 2007. Characterization of extracellular enzymes and their role in studying the pathogenicity of Hyphomycete fungi to the cotton leaf worm *Spodoptera litura*. *Ain Shams Sci Bull* 45:1-16.
- Murniati D, Mudasir. 2013. Isolasi kitin dari cangkang kepiting laut (*Portunus pelagicus* Linn.) serta pemanfaatannya untuk adsorbs Fe dan pengompleks 1,10- fenantrolin. *Valensi* 3(1):15-21.
- Mustafa U, Kaur G. 2009. Effects of carbon and nitrogen source and ratio on the germination, growth and sporulation characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates. *African J of Agric Res* 3(10):922-930.
- Mwanburi A, Laing MD, Miller RM. 2015. Effect of surfactants and temperature on germination and vegetative growth of *Beauveria bassiana*. *Brazilian J of Microbiol* 48(1):67-74.
- Nuryanti NSP, Wibowo L, Aziz A. 2012. Penambahan beberapa jenis bahan nutrisi pada media perbanyakan untuk meningkatkan virulensi *Beauveria bassiana* terhadap hama walang sangit. *JHPT Tropika* 12(1):64-70.
- Ondiaka S, Maniania NK, Nyamasyo GHN, Nderitu JH. 2008. Virulence of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metharizium anisopliae* to sweet potato weevil *Cylas puncticollis* and effects on fecundity and egg viability. *Annals Appl Biol* 153:41-48
- Ondiaka SN, Masinde EW, Koenraadt CJM, Taken W, Mukbana WR. 2015. Effects of fungus infection on feeding and survival of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) on plant sugars. *Bio Med Central* 8(35):2-11.
- Ortiz-Urquiza A, Keyhani NO. 2013. Action on the surface entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insect* 4(3):367-374.
- Prayogo Y, Tengkan W, Marwoto. 2005. Prospek cendawan entomopatogen *Metarhizium anisopliae* untuk mengendalikan ulat grayak *Spodoptera litura* pada kedelai. *Jurnal Litbang Pertanian* 24(1):79-90.
- Prayogo Y. 2006. Upaya mempertahankan keefektifan cendawan entomopatogen untuk mengendalikan hama tanaman pangan. *Jurnal Litbang Pertanian* 25(2):47-54.
- Prayogo, Y. 2009. Kajian cendawan entomopatogen *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) (Viegas) Zare & Gams untuk menekan perkembangan telur hama pengisap polong kedelai *Riptortus linearis* (F.) (Hemiptera: Alydidae). [disertasi] Departemen Proteksi Tanaman, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Qin Y, Ying SH, Chen Y, Shen ZC, Feng MG. 2010. Integration of insecticidal protein Vip 3A a1. Into *Beauveria bassiana* enhances fungal virulence to *Spodoptera litura* larvae by cuticle and Per as infection. *Appl Environ Microbiol* 78(14):4611-4618.
- Rajitha K, Savithri G. 2014. Amino acid profiles in the haemolymph of silkworm *Bombyx mori* L. infected with fungal pathogen *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *InterJ of Appl Biol & Pharma Technol* 5(1):163-166.
- Rasminah S, Santoso S, Ratna Y. 1997. Kajian kualitas spora *Beauveria bassiana* pada berbagai jenis media (PDA, jagung, alioshina) dan lama penyimpanan. Prosiding Kongres Nasional XIV dan Seminar Ilmiah Perhimpunan Fitopatologi Indonesia. Palembang, 27-29 Oktober 1997. hlm:310-315.
- Reddy AV, Devi RS, Dhurua S, Reddy DVV. 2013. Study on the efficacy of some entomogenous fungi against brown plant hopper *Nilaparvata lugens* Stalin irrigated rice. *J Biopest* 6(2):139-143.
- Rehner SA, Minnis AM, Sung CH, Luangsa-ard JJ, Devotto L, Humber RA. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* 103(5):1055-1073.
- Ricario J, Guerri-Agulla B, Serra-Sarrias MJ, Rubio-Liorca G, Asensio L, Barranco P, Lopez-Llorca LV. 2013. Evaluation of the pathogenicity of multiple isolates of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) on *Rynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Dryophthoridae) for the assessment of in solid formulation under simulated field conditions. *Florida Entomol* 96(4):1311-1329.
- Rosalind R. 2000. The effect of certain nutrients on conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Agric Res Service, Tektran USDA*.
- Sachez-Perez L de C, Barranco-Florido JE, Rodriguez-Navarro S, Cervates-Mayagoitia JF, Ramos-Lopez MA. 2014. Enzymes of entomopathogenic fungi advances and insights. *Advancin Enzyme Res* 2:65-76.

- Safavi S. 2010. Isolation, identification and pathogenicity assessment of a new isolate of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in Iran. *J of Plant Protect Res* 50(2):158-163.
- Sandhu SS, Unkles SE, Rajak RC, Kingdom JR. 2000. Generation of benomyl resistant *Beauveria bassiana* Strains and their infectivity against *Helicoverpa armigera*. *BiocontSci and Technol* 11:245-250.
- Screen SE, Hu G, St.Leger RJ. 2001. Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *M. anisopliae* sf. *acridum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. *J Invertebr Pathol* 78(4):260-266.
- Senthiraja G, Ariand T, Durairaj C, Raguchander T, Samitappan R. 2010. Chitin-based bioformulation of *Beauveria bassiana* and *Pseudomonas fluorescens* for improved control of leafminer and collar rot in groundnut. *Crop Protec* 29(9):1003-1010.
- Seyoum E, Moore D, Charnley AK. 1994. Reduction in flight activity and food consumption by the desert locust *Schistocerca gregaria* Forskal (Orth, Cyrtacanthacrinae) after infection with *Metarhizium flavoviride*. *J of Appl Entomol* 118(1-5):310-315.
- Seyoum E, Bateman RP, Charnley AK. 2002. The effect of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* on haemolymph energy reserves and flight capability in the desert locust *Schistocerca gregaria*. *J of Appl Entomol* 126(2-3):119-124.
- Soetopo D, Indrayani I. 2007. Status, teknologi, dan prospek *Beauveria bassiana* untuk pengendalian serangga hama. *Jurnal Perpektif* 6(1):29-46.
- Srygley RB, Jaronski ST. 2011. Immune response of of movmon crickets that survived infection by *Beauveria bassiana*. *J of Entomol*:1-5.
- Stafford KC, Alan SA. 2010. Field application of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) for the control of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J of Medical Entomol* 47(6):1107-1115.
- Surtikanti, Yasin M. 2009. Keefektifan entomopatogenik *Beauveria bassiana* Vuill.dari berbagai media tumbuh terhadap *Spodoptera litura* F.(Lepidoptera: Noctuidae) di laboratorium. hlm.358-362. Prosiding Seminar Nasional Serealia; Maros, 29 Jul 2009.
- Tefera T, Pringle KL. 2003. Food consumption by *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae infected with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and effects of feeding natural versus artificial diets on mortality and mycosis. *J of Invertebr Pathol* 84(3):220-225.
- Trizelia. 2005. Cendawan etomopatogen *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycete): Keragaman genetik, karakterisasi fisiologi dan virulensinya terhadap *Crocidolomia pavonana* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae). [disertasi]. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Trizelia, Santoso T, Sosromarsono S, Rauf A, Sudirman LI. 2012. Keragaan genetik berbagai isolate *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) dan virulensinya terhadap *Crocidolomia pavonana*. *Jurnal Natur Indonesia* 14(3):176-183.
- Vilcinskis A, Matha V. 1997. Effect of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on the humora immune response of *Galleria mellonella* larvae (Lepidoptera: Pyralidae). *Eur J Entomol* 94:461-472.
- Waker TJ. 2014. Jamaican field cricket *Gryllus assimilis* (Fabricius) (Insecta: Orthoptera: Gryllidae). Singing insect of North America. <http://edistt.ifas.ufl.edu/pdf/files/IN/IN22600.pdf> [diakses 10 Juni 2015].
- Wang J, Zheng C. 2012. Characterization of a newly discovered *Beauveria bassiana* isolate to *Frankliniella occidentalis* Perganda, a non-native invasive species in China. *Microbiol Res* 167(2):116-120.
- Yama GS. 2012. Pengaruh penambahan tepung cangkang kepiting pada medium pertumbuhan terhadap kemampuan *Metarhizium majus* UICC 295 menginfeksi larva *Oryctes rhinoceros* Linnaeus. [Skripsi]. Program Studi Biologi FMIPA Universitas Indonesia.
- Ying SH, Feng MG. 2006. Medium components and culture conditions affect the thermotolerance of aerial conidia of fungal biocontrol agent *Beauveria bassiana*. *Appl Microbiol* 43(3):331-335.
- Zimmermann. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *B. brongniarti*. *Biocont Sci and Technol* 17(9):553-596.