

**KARAKTERISASI FENOTIPE, MOLEKULER DAN UJI VIRULENSI
BEBERAPA ISOLAT *Metarhizium* sp. UNTUK MENGENDALIKAN URET
TEBU (*Lepidiotia stigma*) Fabricius**

TESIS

**Diajukan Untuk Memenuhi Sebagian Persyaratan
Guna Memperoleh Gelar Magister**

PROGRAM STUDI MAGISTER AGROTEKNOLOGI



Diajukan oleh:

HANIK SULISTYAWATI
NPM. 22063020015

**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS PEMBANGUNAN NASIONAL "VETERAN"
JAWA TIMUR
SURABAYA
2025**

LEMBAR PENGESAHAN

TESIS

KARAKTERISASI FENOTIPE, MOLEKULER DAN UJI VIRULENSI
BEBERAPA ISOLAT *Metarhizium* sp. UNTUK MENGENDALIKAN URET
TEBU (*Lepidolota stigma*) Fabricius

Yang dipersiapkan dan disusun oleh:

HANIK SULISTYAWATI
NPM. 22063020015

Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
pada tanggal 31 Juli 2025 dan dinyatakan telah
memenuhi syarat untuk diterima

Pembimbing Utama


Dr. Ir. Wiwin Windriyanti, MP.
NIP. 19620816 199003 2002

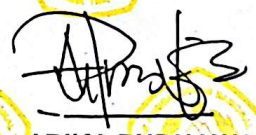
Anggota Dewan Penguji


Dr. Dra. Endang Triwahyu P., Msi
NIP. 19641203 199103 2001

Pembimbing Pendamping


Dr. Ir. Yenny Wuryandari, MP.
NIP. 19660114 199203 2 001

Anggota Dewan Penguji


Dr. Ir. ARIKA PURNAWATI, MP
NIP. 19650422 199003 2 001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Pertanian

Plt. Ketua Program Studi
Magister Agroteknologi


Prof. Dr. Ir. WANTI MINDARI, M.P
NIP. 19631208 199003 2001


Dr. Ir. Bakti Wisnu Widjajani, MP.
NIP. 19631005 198703 2 001

**PERNYATAAN
ORISINALITAS TESIS**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Hanik Sulistyawati
NPM : 22063020015
Program : Magister (S2)
Program Studi : Agroteknologi
Fakultas : Pertanian

Menyatakan bahwa dalam dokumentasi ilmiah Tugas Akhir Tesis ini tidak terdapat bagian dari karya ilmiah lain yang telah diajukan untuk memperoleh gelar akademik di suatu Lembaga Pendidikan Tinggi, dan juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang/Lembaga lain, kecuali secara tertulis disitasi dalam dokumen ini dan disebutkan secara lengkap dalam daftar pustaka.

Dan saya menyatakan bahwa dokumen ilmiah ini bebas dari unsur-unsur plagiasi. Apabila dikemudian hari ditemukan indikasi plagiat pada tesis ini, saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya tanpa ada paksaan dari siapapun juga dan untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 14 Maret 2025
Mahasiswa



HANIK SULISTYAWATI
NPM. 22063020015

**KARAKTERISASI FENOTIPE, MOLEKULER DAN UJI VIRULENSI
BEBERAPA ISOLAT *Metarhizium* sp. UNTUK MENGENDALIKAN URET
TEBU (*Lepidiotia stigma*) Fabricius**

ABSTRAK

Lepidiotia stigma telah menjadi permasalahan yang serius pada budidaya tebu di Jawa Timur. *Metarhizium anisopliae* sebagai entomopatogen diharapkan mampu untuk mengendalikan serangan *L. stigma*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi isolat yang ditemukan, kepadatan spora yang diperlukan untuk mematikan larva serta spesies dan senyawa yang dihasilkan *Metarhizium* sp. dari hasil eksplorasi yang berpotensi sebagai entomopatogen terhadap *L. stigma*.

Penelitian dimulai pada bulan Agustus 2024 sampai Maret 2025 di laboratorium Kesehatan tanaman Fakultas Pertanian UPN “Veteran” Jawa Timur, Genetika Science Laboratory dan ResearchHub Malang. Penelitian dimulai dengan melakukan eksplorasi isolat *Metarhizium* sp. yang selanjutnya dilakukan identifikasi secara morfologi. Uji kemampuan 20 isolat *Metarhizium* sp. terhadap kematian *L. stigma*, dengan parameter yang diamati adalah mortalitas larva pada pengamatan 10 HSA. Selanjutnya dilakukan uji virulensi tahap dua dengan faktor kepadatan spora 10^6 spora/ml, 10^7 spora/ml dan 10^8 spora/ml dan 5 isolat yang memberikan kematian terbaik terhadap *L. stigma* pada uji virulensi tahap pertama. Parameter yang diamati adalah mortalitas *L. stigma*. Dua isolat yang terbaik selanjutnya dilakukan identifikasi secara molekuler dan satu isolat terbaik dilakukan pengujian senyawa metabolitnya.

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam dan uji lanjut DMRT pada taraf 5% pada uji virulensi tahap 1, isolat M3, M5, M7, M9, dan M12 menyebabkan 100% kematian selama periode pengamatan sehingga merupakan isolat yang akan dilakukan untuk dilakukan uji virulensi tahap kedua. Sedangkan berdasarkan analisis sidik ragam dan uji lanjut DMRT pada uji virulensi tahap 2, tidak didapatkan interaksi antara faktor sumber isolat dan kepadatan spora terhadap mortalitas. Faktor jenis isolat secara parsial berpengaruh nyata terhadap mortalitas pada hari ke-3 hingga hari ke-7, sedangkan faktor kepadatan spora secara parsial mempengaruhi mortalitas pada hari ke-3 hingga hari ke-6 dan hari ke-8 hingga hari ke-10. Isolat M3 secara umum merupakan isolat terbaik dengan pengaruh mortalitas tertinggi dan menyebabkan mortalitas sejak hari ke 2 dan menyebabkan mortalitas harian yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Sedangkan pada faktor kepadatan spora, tingkat kepadatan 10^8 spora/ml menghasilkan mortalitas yang secara signifikan lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Isolat M3 dan M7 dilakukan pengujian secara molekuler dan ditemukan bahwa *Metarhizium* sp. dari hasil eksplorasi merupakan *M. anisopliae*, sedangkan dari uji metabolomic senyawa metabolit sekunder ditemukan bahwa *Metarhizium* sp. hasil eksplorasi mengandung destruxin E, A4 dan Ed1 Destruxin E memiliki peran paling krusial dalam mematikan serangga berkaitan dengan pengaruhnya sebagai antifeedant, mengganggu sistem imun dan menginduksi kelumpuhan dan kontraksi otot serangga.

Kata kunci : *L. stigma*, entomopatogen, PCR, senyawa metabolit

ABSTRACTS

Lepidiotia stigma has become a serious problem in sugarcane cultivation in East Java. *Metarhizium anisopliae*, as an entomopathogen, is expected to be able to control *L. stigma* attacks. This study aims to determine the potential of the isolates found, the spore density required to kill larvae, and the species and compounds produced by *Metarhizium* sp. based on the exploration results that have the potential as entomopathogens against *L. stigma*. The study was conducted from August 2024 to March 2025 at the Plant Health Laboratory, Faculty of Agriculture, UPN "Veteran" East Java, the Genetics Science Laboratory in Tangerang, and ResearchHub in Malang.

The study began by exploring the *Metarhizium* sp. isolates, which were then identified morphologically. Test the ability of 20 *Metarhizium* sp. isolates against the death of *L. stigma*, with the parameters observed being larval mortality at 10 HSA observations. Next, a second-stage virulence test was conducted with spore densities of 10^6 spores/mL, 10^7 spores/mL, and 10^8 spores/mL, using 5 isolates that showed the best mortality against *L. stigma* in the first-stage virulence test. The parameters observed were *L. stigma* mortality. The two best isolates were then molecularly identified, and one best isolates was tested for its metabolite compounds.

Based on the results of the analysis of variance and DMRT further tests at the 5% level in the virulence test stage 1, isolates M3, M5, M7, M9, and M12 caused 100% mortality during the observation period so that they were the isolates that would be used for the second-stage virulence test. Meanwhile, based on the analysis of variance and DMRT, further tests in the virulence test stage 2, there was no interaction between the isolate source factor and spore density on mortality. The isolate type factor partially had a significant effect on mortality on days 3 to 7, while the spore density factor partially affected mortality on days 3 to 6 and days 8 to 10. Isolate M3 is generally the best isolate with the highest mortality effect and causes mortality since day 2 and causes higher daily mortality compared to other treatments. While in the spore density factor, the density level of 108 spores/ml produces significantly higher mortality compared to other treatments. Isolates M3 and M7 were tested molecularly, and it was found that the *Metarhizium* sp. identified from the exploration results was *M. anisopliae*. Additionally, the metabolomic test of secondary metabolite compounds revealed that the *Metarhizium* sp. from the exploration results contained destruxin E, A4, and Ed1. Destruxin E is the most crucial role in killing insects related to its effect as an antifeedant, disrupting the immune system, and inducing paralysis and muscle contractions in insects.

Keywords: *L. stigma*, entomopathogen, PCR, metabolite compounds

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT berkat Rahmat, Hidayah, dan Karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul " Karakterisasi Fenotipe, Molekuler Dan Uji Virulensi Beberapa Isolat *Metarhizium* sp. Untuk Mengendalikan Uret Tebu (*Lepidiotia stigma*) Fabricius". Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister pada program Strata-2 di Fakultas Pertanian Universitas Pembangunan Nasional "Veteran" Jawa Timur.

Penulis menyadari dalam penyusunan tesis ini tidak akan selesai tanpa bantuan dari berbagai pihak. Karena itu pada kesempatan ini kami ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. Ir. Wiwin Windriyanti, M.P., selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah mendidik dan membimbing penulis selama masa perkuliahan dan penyusunan tesis ini;
2. Ibu Dr. Ir.Yenny Wuryandari, M.P., selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah mencurahkan waktu dalam mendampingi dan mengoreksi naskah tesis ini;
3. Ibu Dr. Dra. Endang Triwahyu P., M.Si., selaku Dosen Penguji yang telah memberikan masukan dalam menyempurnakan naskah tesis
4. Ibu Dr. Ir. Arika Purnawati, M.P., selaku Dosen Penguji yang telah memberikan masukan dalam menyempurnakan naskah tesis
5. Bapak/Ibu Kepala Bidang dan Rekan kerja di Bidang Perlindungan Perkebunan Dinas Perkebunan Provinsi Jawa Timur yang telah memberikan dukungan, doa dan semangat kepada penulis dalam menyelesaikan tesis ini;
6. Suami dan anak-anak yang telah menjadi support system terbaik terhadap penulis dalam menyusun tesis.

Meskipun telah berusaha menyelesaikan tesis ini sebaik mungkin, penulis menyadari bahwa tesis ini masih ada kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari para pembaca guna menyempurnakan segala kekurangan dalam penyusunan tesis ini.

Akhir kata, penulis berharap semoga tesis ini berguna bagi para pembaca dan pihak-pihak lain yang berkepentingan.

Surabaya, Juli 2024

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
ABSTRAK.....	iv
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar belakang.....	1
1.2 Perumusan masalah.....	7
1.3 Tujuan penelitian.....	7
1.4 Manfaat penelitian.....	8
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1 Tebu (<i>Saccharum</i> spp).....	9
2.2 Uret (<i>Lepidiota stigma</i>).....	11
2.2.1 Arti Penting Hama Uret.....	11
2.2.2 Gejala serangan Uret.....	14
2.2.3 Karakteristik Hama Uret.....	15
2.2.4 Faktor Lingkungan Yang Mempengaruhi Uret (<i>L. stigma</i>).....	20
2.3 Pengendalian Hayati.....	21
2.4 <i>Metarhizium anisopliae</i>	22
2.5 Identifikasi Entomopatogen Serangga.....	29
2.5.1 Isolasi DNA.....	29
2.5.2 Elektroforesis.....	31
2.5.3 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	32

2.6 Liquid Chromatography High Resolution Mass Spectrometry.....	35
2.7. HIPOTESIS.....	36
III. METODOLOGI PENELITIAN.....	37
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	37
3.2 Alat dan bahan.....	37
3.3 Metode penelitian.....	38
3.3.1 Pembuatan media PDA (Potato Dextrose Agar).....	38
3.3.2 Penyediaan Uret (<i>L. stigma</i>).....	38
3.3.3 Pengambilan Sampel Tanah dan eksplorasi <i>Metarhizium</i> sp....	39
3.3.4 Pengamatan Morfologi <i>Metarhizium</i> sp.....	40
3.3.5 Uji Virulensi Terhadap Larva <i>L. stigma</i>	40
3.3.7 Ekstraksi dan Purifikasi DNA <i>Metarhizium</i> sp.....	43
3.3.8 Spektrofotometri DNA.....	44
3.3.9 Amplifikasi DNA menggunakan primer universal.....	44
3.3.10 Elektroforesis dan visualisasi hasil amplifikasi.....	45
3.3.11 DNA Sequencing Dan Identifikasi Molekuler.....	45
3.3.12 Uji Senyawa <i>Metarhizium</i> sp.....	45
3.3.13 Kerangka konseptual penelitian.....	46
3.3.14 Kerangka operasional penelitian.....	48
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	49
4.1 Hasil Identifikasi Uret Tebu (<i>Lepidiotia stigma</i>).....	49
4.2 Hasil Identifikasi <i>Metarhizium</i> sp. Secara Morfologi.....	50
4.3 Hasil Identifikasi <i>Metarizhium</i> sp. Secara Molekuler.....	57
4.4 Uji Virulensi <i>Metarhizium</i> sp. terhadap Larva Uret Tebu.....	63
4.5 Hasil Uji Senyawa <i>Metarhizium anisopliae</i>	72
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	85
5.1 KESIMPULAN.....	85

5.2 SARAN.....	85
DAFTAR PUSTAKA.....	86
LAMPIRAN.....	97

DAFTAR TABEL

Nomor	Teks	Halaman
1.	Luas Areal Perkebunan Tebu Indonesia menurut Status Pengusahaan 2018-2022.....	10
2.	Sebaran Uret (<i>L. stigma</i>) di beberapa wilayah Provinsi Jawa Timur.	12
3.	Urutan Homologi Isolat M3 Berdasarkan GenBank.....	59
4.	Urutan Homologi Isolat M7 Berdasarkan GenBank.....	60
5.	Mortalitas <i>Lepidiota stigma</i> Tahap Pertama Pada 8 HSA.....	65
6.	Mortalitas <i>Lepidiota stigma</i> tahap kedua sampai hari ke 10.....	70
7.	LC50 Uji Virulensi Tahap 2 <i>Metarhizium</i> sp. Terhadap Larva <i>L. stigma</i>	71
8.	LT50 Uji Virulensi Tahap 2. <i>Metarhizium</i> sp. Terhadap <i>L. stigma</i>	72
9.	Kandungan Senyawa dengan Aktivitas Larvasidal pada Isolat M3.....	76

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Teks	Halaman
1.	Gejala Serangan <i>Lepidiota stigma</i>	15
2.	Pola raster perambutan pada ujung abdomen larva uret	16
3.	Bentuk larva dan pola raster pada uret (1) <i>L. stigma</i> , (2) <i>Euchlora viridis</i> , (3) <i>Holotrichia helleri</i>	17
4.	Morfologi <i>L. stigma</i> (1) telur, (2) Larva, (3) Pupa, (4) imago.....	19
5.	Siklus hidup <i>Lepidiota stigma</i>	19
6.	Mikroskopis jamur <i>M. anisopliae</i> (a). Spora/konidia tunggal berbentuk bulat silinder, (b). konidia dibentuk pada ujung konidiofor, berbentuk tegak, berlapis dan bercabang.....	24
7.	Susunan toksin yang dihasilkan oleh <i>M. anisopliae</i>	25
8.	Tahapan kematian larva serangga karena infeksi <i>M. anisopliae</i>	26
9.	Peta Pengambilan Sampel Tanah di Jawa Timur.....	39
10.	Larva Uret Tebu <i>Lepidiota stigma</i>	49
11.	Pola Perambutan <i>Lepidiota stigma</i>	49
12.	Karakteristik Koloni <i>Metarhizium</i> sp. Secara Makroskopis dan Mikroskopis.....	56
13.	Hasil Visualisasi Amplifikasi Isolat M3 dan M7 pada gel agarose 1% (M) 100 bp DNA ladder), (1) isolat M3, (2) Isolat M7.....	58
14.	Pohon Filogenetik Isolat M3 dengan Bootstrap 1000x.....	61
15.	Pohon Filogenetik Isolat M7 dengan Bootstrap 1000X.....	62
16.	Pohon Filogenetik Isolat M3 dan M7 dengan Bostraap 1000x.....	63
17.	Gejala serangan <i>Lepidiota stigma</i> (a) larva sehat (b) 3 hari setelah aplikasi (HSA) (c) 6 hari setelah aplikasi (d) 7 hari setelah aplikasi, (e) 10 hari setelah aplikasi (f) 12 hari setelah aplikasi.....	68
18.	Daftar Senyawa dan TIC (Total Ion Chromatogram) Isolat M3.....	73
19.	Single Chromatogram Destruxin E.....	77
20.	Single Chromatogram Destruxin A4.....	78

21.	Single Chromatogram Destruxin Ed1.....	79
-----	--	----

LAMPIRAN

1.	Uji ANOVA pada Parameter Mortalitas Tahap 1.....	97
2.	Uji ANOVA pada Parameter Mortalitas Tahap 2.....	99
3.	Hasil Uji LC50.....	101
4.	Hasil Uji LT 50.....	102
5.	Laporan Hasil PCR Isolat M3 dan M7.....	104
6.	Hasil Uji LCHRMS isolat M3.....	109
7.	Dokumentasi Penelitian.....	120