

KERAGAMAN GENETIK *Metarhizium anisopliae* DAN VIRULENSINYA PADA LARVA KUMBANG BADAK (*Oryctes rhinoceros*)

GENETIC DIVERSITY of *Metarhizium anisopliae* AND VIRULENCE TOWARD LARVAE OF RHINOCEROS BEETLE (*Oryctes rhinoceros*)

Aisyah Surya Bintang^{1)*}, Arif Wibowo¹⁾, & Tri Harjaka¹⁾

¹⁾Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada
Jln. Flora 1, Bulaksumur, Sleman, Yogyakarta 55281

*Penulis untuk korespondensi. E-mail: bintang.aisyahsurya@gmail.com

ABSTRACT

Rhinoceros beetle (Oryctes rhinoceros) is one of the important pests of coconut tree. One of eco-friendly control applied for this pest is by using entomopathogenic fungi Metarhizium anisopliae. There is not much information about the variability and virulence of M. anisopliae toward O. rhinoceros. M. anisopliae isolates obtained from Biological Control Laboratory, Faculty of Agriculture, Universitas Gadjah Mada were cultured on PDA medium. M. anisopliae isolates was isolated from O. rhinoceros larvae (MaOr), Lepidiota stigma larvae (MaLs), Brontispa longissima beetle (MaBl). O. rhinoceros beetles were obtained from Kulon Progo, DIY. This study used molecular test, and virulence test toward 3rd stadium of O. rhinoceros larvae by using dipping method. Molecular test by sequence and phylogenetic analysis, showed that MaOr was located at different group (out group) with MaLs and MaBr. On the density 10⁷ conidium/ml MaOr and MaLs were more virulent than MaBl towards 3rd stadium of O. rhinoceros larvae.

Keywords: genetic diversity, Metarhizium anisopliae, Oryctes rhinoceros, virulence

INTISARI

Kumbang badak (*Oryctes rhinoceros*) merupakan salah satu hama penting pada tanaman kelapa. Salah satu upaya pengendalian yang ramah lingkungan adalah dengan menggunakan jamur entomopatogen, yakni *Metarhizium anisopliae*. Belum banyak diketahui mengenai keragaman dan juga virulensi dari *M. anisopliae* terhadap *O. rhinoceros*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman genetik *M. anisopliae* dan virulensinya pada larva kumbang badak. Isolat yang digunakan berasal dari Laboratorium Pengendalian Hayati, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada dalam bentuk kultur murni pada medium PDA. Isolat yang digunakan diisolasi dari larva *Oryctes rhinoceros* (MaOr), larva *Lepidiota stigma* (MaLs), dan kumbang *Brontispa longissima* (MaBl). Serangga yang diuji berasal dari daerah Kulon Progo, DIY. Pengujian secara molekuler dengan analisis sekuensing dan filogenetik, menunjukkan bahwa isolat MaOr terletak pada grup yang berbeda dengan MaLs dan MaBl berdasarkan pada urutan basa DNA. Pada kerapatan 10⁷ konidium/ml isolat MaOr dan MaLs lebih virulen terhadap larva *O. rhinoceros* instar 3 dibandingkan dengan MaBl.

Kata kunci: keragaman genetik, *Metarhizium anisopliae*, *Oryctes rhinoceros*, virulensi

PENGANTAR

Oryctes rhinoceros atau kumbang badak adalah salah satu hama penting pada pertanaman kelapa. Stadium *O. rhinoceros* yang menyebabkan kerusakan pada tanaman kelapa adalah imago, baik jantan maupun betina (Anonim, 1980). Serangan *O. rhinoceros* tersebut dapat mengurangi hasil panen, mematikan bibit muda pada persemaian dan tanaman tua, serta merusak areal tanaman baru (*replanting*) (Bedford, 1980). Pada tanaman kelapa dengan serangan ringan, *O. rhinoceros* menyebabkan gejala daun seperti tergunting dan daya hasil menurun, bahkan pada saat awal pertumbuhan generatif produksi dapat tertunda. Kumbang dewasa masuk ke dalam daerah titik tumbuh dan memakan bagian yang lunak. Bila serangan sampai ke titik tumbuh, maka tanaman akan mati (Rahman, 2010).

Sejauh ini pengendalian hama tanaman yang dilakukan oleh para petani masih mengandalkan insektisida kimia (Marwoto, 1992). Petani umumnya menggunakan insektisida dengan frekuensi dan dosis yang tinggi. Ini membawa dampak negatif penggunaan pestisida seperti, resistensi, resurgensi hama, terbunuhnya musuh alami, peningkatan residu pada hasil, pencemaran lingkungan dan gangguan kesehatan bagi pengguna. Secara hayati, pengendalian *O. rhinoceros* dapat dilakukan dengan menggunakan jamur entomopatogen *Metarhizium anisopliae* (Untung, 2001).

Pattemore *et al.* (2014) mengemukakan bahwa *M. anisopliae* dikelompokkan bersama tiga spesies lainnya, yaitu *M. pingshaense*, *M. robertsii*, dan *M. brunneum*. Menurut Freed *et al.* (2011), melalui metode SSR (*Sample Sequence Repeats*) ditemukan

bahwa *M. anisopliae* yang berasal dari China, Laos, Singapura, Belanda, dan Korea menunjukkan tingkat keragaman morfologi yang rendah meskipun memiliki distribusi yang luas. Hasil tersebut diperkuat dengan penggunaan analisis sekuen ITS-rDNA yang juga menyatakan bahwa *M. anisopliae* yang diuji memiliki tingkat keragaman secara genetik yang rendah atau tidak bervariasi. Rendahnya tingkat keragaman ini bisa jadi karena adanya kesamaan topografi dari masing-masing lokasi pengambilan sampel. Kemungkinan lain juga disebabkan karena imigrasi *M. anisopliae* ke daerah-daerah sekitar, serta adanya kemungkinan bahwa jamur-jamur yang telah tersebar tersebut berasal dari tetua yang sama. Di daerah Barat Daya Cina, kesamaan genotip pada *M. anisopliae* banyak ditemukan meskipun sampel diambil dari ekosistem geografis yang berbeda (pertanian, hutan, dan pemukiman). Untuk saat ini, belum banyak pengetahuan mengenai keragaman genetik dan virulensi dari *M. anisopliae* di Indonesia. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik *M. anisopliae* dan virulensinya terhadap larva kumbang badak.

BAHAN DAN METODE

Sumber Serangga Uji

Pada penelitian ini digunakan larva *O. rhinoceros* instar 3. Larva tersebut didapat dari lokasi perkembangbiakan *O. rhinoceros* yaitu tumpukan kotoran ternak di daerah Kulon Progo, Daerah Istimewa Yogyakarta.

Sumber Isolat Jamur

Isolat *M. anisopliae* diperoleh dari isolat yang berasal dari Laboratorium Pengendalian Hayati Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada yang terdiri dari (1) isolat *M. anisopliae* yang berasal dari kumbang *Brontispa longissima* (MaBl), (2) isolat *M. anisopliae* yang berasal dari larva *O. rhinoceros* (MaOr), (3) isolat *M. anisopliae* yang berasal dari larva *Lepidiota stigma* (MaLs). Isolasi dan pemurnian masing-masing jamur tersebut dilakukan dengan menggunakan medium PDA.

Uji Molekuler

Ekstraksi DNA. Sebanyak 0,5 gram miselium jamur yang sebelumnya dibiakkan dengan medium *potato dextrose broth* (PDB) diekstraksi/diisolasi DNA-nya menggunakan CTAB 2% (CTAB, Tris HCl 1M, EDTA 0,5 M, NaCl 5M, *B-mercapto-ethanol* 1%, aquades steril).

Amplifikasi DNA menggunakan primer spesifik DNA hasil ekstraksi diamplifikasi dengan menggunakan teknik PCR mengikuti prosedur dari Curran *et al.* (1994) *cit* Lei Liu *et al.* (2012) menggunakan

primer *forward* TW81 (5'-GTTTCCGTAGGTGAA CCTGC-3') dan primer *reverse* AB21 (5'-ATATG CTTAAGTTCAGCGGGT-3') yang akan mengamplifikasi DNA dengan berat molekul 500 bp. Total volume untuk reaksi PCR dengan komposisi bahan yaitu DNA template 1 µl, primer *forward* dan *reverse* masing-masing 1 µl, PCR kit sebanyak 12,5 µl dan *Milli-Q water* sebanyak 9,5 µl. Proses amplifikasi berikut ini: pada tahap denaturasi hingga ekstensi diulang sebanyak 33 siklus menggunakan suhu sebagai berikut: Pra denaturasi pada 94°C selama 4 menit; denaturasi 94°C selama 30 detik; *annealing* pada 55°C selama 30 detik; ekstensi 72°C selama 1 menit; dan pos ekstensi pada 72°C selama 4 menit.

Amplifikasi DNA menggunakan primer universal.

DNA hasil ekstraksi diamplifikasi dengan menggunakan teknik PCR menggunakan primer *forward* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTTGCGG-3') dan primer *reverse* ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGAT ATGC-3') yang akan mengamplifikasi DNA dengan berat molekul pada kisaran 500 bp (Tangthirasunun *et al.*, 2010). Total volume untuk reaksi PCR dengan komposisi bahan yaitu DNA template 1 µl, primer *forward* dan *reverse* masing-masing 1 µl, PCR kit sebanyak 12,5 µl dan *Milli-Q water* sebanyak 9,5 µl. Proses amplifikasi pada tahap denaturasi hingga ekstensi diulang sebanyak 32 siklus menggunakan suhu berikut ini (Pereira de Lyra *et al.*, 2012): Pra denaturasi pada 95°C selama 3 menit; denaturasi 94°C selama 1 menit; *annealing* pada 50°C selama 1 menit; ekstensi 72°C selama 1 menit; dan *post-ekstensi* pada 72°C selama 5 menit.

Elektroforesis dan visualisasi hasil amplifikasi.

Elektroforesis hasil amplifikasi menggunakan agarose 1% (dalam TBE 1X) yang direndam dalam *ethidium bromide*. Untuk pengukuran DNA digunakan marker 100 bp *ladder*. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 90 V selama 45 menit. Hasil elektroforesis divisualisasi dengan *transilluminator ultra violet* dan hasilnya difoto dengan menggunakan *Gel Documentation*.

DNA sequencing dan identifikasi molekuler.

Sampel dikirim ke FirstBase Malaysia. Hasil sekuensing yang telah didapatkan selanjutnya dianalisis berdasarkan data *GeneBank* pada *National Center for Biotechnology International* (NCBI) dengan program BLAST (*Basic Local Alignment Tools*). Setelah diperoleh hasil BLAST, ditentukan sejumlah spesies acuan yang memiliki persentase tingkat similaritas mendekati 100% untuk konstruksi pohon filogenetik dengan menggunakan *software* MEGA 5.0.

Uji Virulensi Isolat

Uji infeksi jamur terhadap *O. rhinoceros* dilakukan dengan metode *dipping*, yaitu larva *O. rhinoceros*

instar 3 dimasukkan ke dalam suspensi jamur dengan kerapatan 10^7 konidium/ml dalam cawan petri kurang lebih selama 15 detik atau sampai konidium menempel pada kutikula larva. Larva yang telah diperlakukan dipindahkan ke dalam stoples isolat yang berisi serbuk gergaji steril. Sebagai kontrol, larva dicelupkan ke dalam air steril. Larva dipelihara selama 14 hari. Pengamatan mortalitas larva *O. rhinoceros* dilakukan setiap hari selama 14 hari. Parameter yang diamati adalah persentase larva bergejala atau mati. Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis varian apabila terdapat beda nyata dilanjutkan dengan uji DMRT pada taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Molekuler

Identifikasi spesies secara molekuler. Dengan menggunakan primer AB21 dan TW81 yang merupakan primer spesifik untuk spesies *M. anisopliae*, pita tunggal fragmen DNA dari ketiga isolat tersebut teramplifikasi pada nilai optimasi sekitar 500 bp (Gambar 1) yang menunjukkan bahwa ketiga isolat tersebut merupakan spesies *M. anisopliae*.

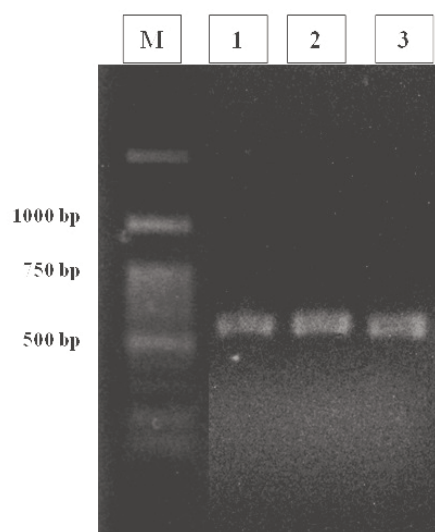
Variabilitas genetik. Hasil *polymerase chain reaction* terhadap tiga isolat jamur *M. anisopliae* (MaOr, MaLs, dan MaBl) memperlihatkan hasil yang sangat baik yaitu dengan teramplifikasinya pita DNA yang sesuai target.

Pita tunggal fragmen DNA isolat MaOr, MaLs, dan MaBl teramplifikasi pada nilai optimasi sekitar

500 bp dengan menggunakan primer universal yakni ITS1 dan ITS4 (Gambar 2). Tangthirasun et al. (2010) menyatakan bahwa isolat-isolat *Metarhizium* spp. yang berasal dari Thailand memiliki pita tunggal fragmen DNA yang teramplifikasi pada kisaran 550 bp dengan menggunakan primer ITS1 dan ITS4. Destéfano et al. (2004) menganalisis dengan primer yang sama, fragmen DNA teramplifikasi pada kisaran 540 bp untuk isolat *M. anisopliae* var. *anisopliae* strain E9, B/Vi, dan isolat C yang berasal dari Brazil. Isolat *M. anisopliae* strain 14 yang berasal dari Australia berada pada kisaran 600 bp.

Analisis hasil sekuensing dan filogenetik. Di dalam pendekatan filogenetik, sebuah kelompok organisme yang anggota-anggotanya memiliki banyak kesamaan karakter atau ciri dianggap memiliki hubungan yang sangat dekat dan diperkirakan diturunkan dari satu nenek moyang. Nenek moyang dan semua turunannya akan membentuk sebuah kelompok monofiletik. Dalam analisis filogenetika kelompok *out group* sangat dibutuhkan dan menyebabkan polarisasi karakter atau ciri, yaitu karakter apomorfik dan plesiomorfik. Karakter apomorfik adalah karakter yang berubah dan diturunkan dan terdapat pada *in group*, sedangkan karakter plesiomorfik merupakan karakter *primitive* yang terdapat dalam *out group*. Karakter sinaporfik adalah karakter yang diturunkan dan terdapat pada kelompok monofiletik (Hidayat & Pancoro, 2006).

Primer universal ITS1 dan ITS4 yang digunakan dalam penelitian ini menunjukkan bahwa isolat *B. longissima* (MaBl), isolat *L. stigma* (MaLs) yang berasal dari inang yang berbeda ternyata memiliki hubungan



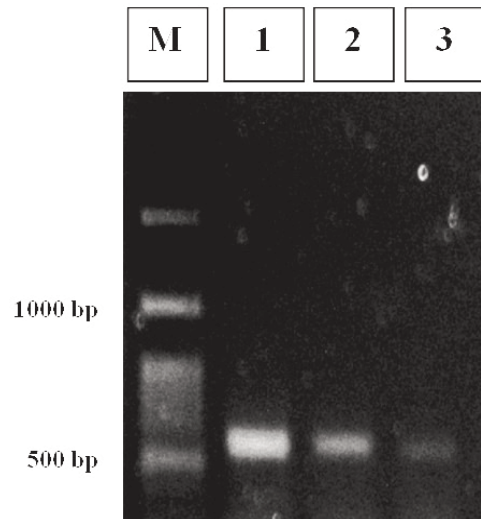
Gambar 1. Hasil elektroforesis PCR dengan primer spesifik *Metarhizium anisopliae* (TW81 dan AB21)

Keterangan: M : Marker 100 bp ladder

1 : Isolat jamur *Metarhizium anisopliae* dari larva *Oryctes rhinoceros*

2 : Isolat jamur *Metarhizium anisopliae* dari larva *Lepidiota stigma*

3 : Isolat jamur *Metarhizium anisopliae* dari kumbang *Brontispa longissima*



Gambar 2. Hasil elektroforesis PCR dengan primer universal ITS1 dan ITS4

Keterangan: M : Marker 100 bp ladder

1 : Isolat jamur *Metarhizium anisopliae* dari larva *Oryctes rhinoceros*

2 : Isolat jamur *Metarhizium anisopliae* dari larva *Lepidiota stigma*

3 : Isolat jamur *Metarhizium anisopliae* dari kumbang *Brontispa longissima*

kekerabatan yang dekat dan terdapat pada grup yang sama (*in group*), sedangkan untuk isolat *O. rhinoceros* (MaOr) sudah terdapat pada grup yang berbeda (*out group*) (Gambar 3). Namun, ketiganya masih termasuk dalam kelompok yang sama, yakni monofiletik, yang berarti bahwa karakternya dapat diturunkan.

Muraji dan Nakahara (2001) melaporkan bahwa hasil analisis morfologi dan untai basa DNA tidak saling mendukung. Hal ini terjadi pada ketiga isolat *M. anisopliae* yang digunakan dalam penelitian ini. Ketiganya memiliki karakter morfologi yang masing-masing berbeda terutama pada warna miselium jamur yang ditumbuhkan pada medium PDA. Isolat MaOr dan MaLs yang memiliki warna miselium yang cenderung sama, yakni hijau zaitun, justru secara urutan basa DNA terletak pada grup yang berlainan. Sementara itu pada isolat MaBl yang memiliki karakter warna miselium yang cenderung berbeda dengan kedua isolat yang lain, secara urutan basa DNA terletak pada grup yang sama dengan isolat MaLs. Tangthirasunun *et al.* (2010) mengemukakan bahwa meskipun isolat diperoleh dari lokasi yang sama, isolat tersebut tidak saling berhubungan satu dengan yang lainnya dalam urutan basa.

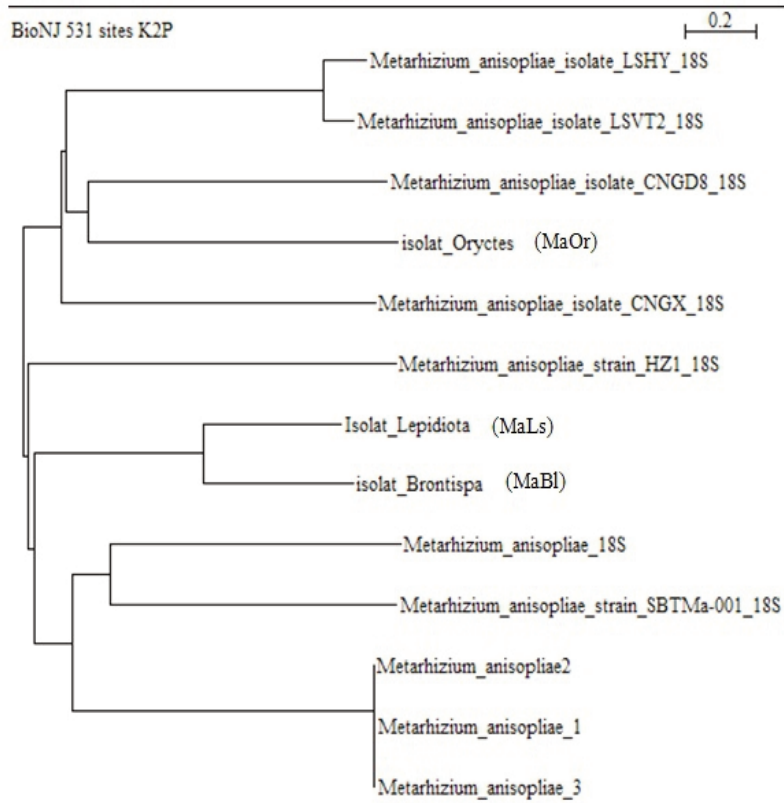
Uji Virulensi

Hasil pengamatan mortalitas larva *O. rhinoceros* akibat infeksi jamur selama 2 minggu menunjukkan bahwa ketiga isolat jamur *M. anisopliae* dengan kerapatan spora 10^7 konidium/ml belum mampu menyebabkan mortalitas larva instar 3 *O. rhinoceros*. Tiga isolat jamur *M. anisopliae* (MaOr, MaLs, dan

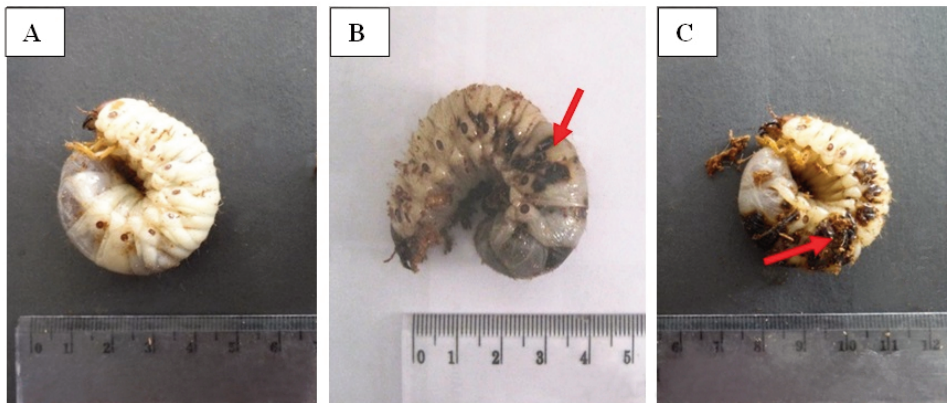
MaBr) dengan kerapatan spora 10^7 konidium/ml dapat menyebabkan gejala sakit pada inang. Larva instar 3 *O. rhinoceros* sebagai serangga uji menunjukkan gejala terinfeksi jamur *M. anisopliae* pada minggu pertama setelah inokulasi. Pada minggu pertama larva menunjukkan gejala terinfeksi jamur yakni munculnya bercak berwarna cokelat kehitaman pada kutikula serangga (Gambar 4).

Persentase larva *O. rhinoceros* bergejala oleh jamur *M. anisopliae* menunjukkan bahwa isolat MaOr memiliki nilai yang paling tinggi yakni 100% kemudian berturut-turut MaLs 66,67% dan MaBl mencapai 6,67% seperti terlihat pada Tabel 1.

Dua isolat jamur *M. anisopliae* MaOr dan MaLs tidak berbeda nyata dalam menyebabkan gejala pada serangga uji *O. rhinoceros*, sedangkan isolat MaBr berbeda nyata. Hal ini diduga karena isolat MaOr dan MaLs berasal dari ordo yang sama yakni ordo Coleoptera dan berasal dari fase yang sama yakni larva, sehingga virulensi dari kedua isolat tersebut tidak berbeda nyata. Isolat yang berasal dari larva *O. rhinoceros* (MaOr) dan isolat yang berasal dari larva *L. stigma* (MaLs) merupakan isolat yang virulen terhadap kumbang badak (*O. rhinoceros*), sedangkan isolat yang berasal dari kumbang *B. longissima* tidak virulen terhadap kumbang badak (*O. rhinoceros*). Diketahui bahwa jamur *M. anisopliae* spesifik inang terhadap hama dari Coleoptera terutama *O. rhinoceros*. Prayoga (2005) menyatakan bahwa jenis hama yang menyerang tanaman akan menentukan keefektifan jamur entomopatogen karena setiap jenis jamur entomopatogen mempunyai inang yang spesifik,



Gambar 3. Pohon filogenetik berdasarkan pada sekuen ITS yang berasal dari isolat *Metarhizium anisopliae* menggunakan analisis *Neighbour-Joining* dan Uji Filogeni Bootstrap 1000 replicates



Gambar 4. Larva *Oryctes rhinoceros* sehat (A); larva *O. rhinoceros* yang terinfeksi oleh jamur *Metarhizium anisopliae* pada hari ketujuh (B); dan pada hari keempat belas setelah inokulasi (C)

Tabel 1. Persentase larva *Oryctes rhinoceros* instar 3 bergejala oleh jamur *Metarhizium anisopliae* pada hari ke-14

Isolat	Kerapatan spora (konidia/ml)	Persentase larva bergejala (%)
MaOr	$5,95 \times 10^7$	100,00 a
MaBr	$5,13 \times 10^7$	6,67 b
MaLs	$5,76 \times 10^7$	66,67 a
Kontrol		0,00 b

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda (DMRT) dengan derajat kesalahan 5%.

MaOr : Isolat jamur *Metarhizium anisopliae* dari larva *Oryctes rhinoceros*

MaLs : Isolat jamur *Metarhizium anisopliae* dari larva *Lepidiota stigma*

MaBl : Isolat jamur *Metarhizium anisopliae* dari kumbang *Brontispa longissima*

walaupun ada pula yang mempunyai kisaran inang yang cukup luas (Marheni *et al.*, 2013). Isolat yang berasal dari kumbang *B. longissima* (MaBl) memiliki perbedaan nyata dengan menunjukkan persentase larva bergejala lebih rendah bila dibandingkan dengan kedua isolat yang lain. Hal ini diduga karena isolat MaBr lebih spesifik dalam membunuh kumbang *B. longissima*.

Hasil analisis menunjukkan bahwa perbedaan yang nyata terdapat antara perlakuan dengan kontrol. Seluruh serangga uji pada perlakuan kontrol tidak menunjukkan gejala terinfeksi/sehat, tidak terdapat gejala mikosis yang ditunjukkan dengan bercak coklat kehitaman pada kutikula larva dan larva yang bergerak secara aktif. Hal ini disebabkan oleh ketahanan larva *O. rhinoceros* terhadap *M. anisopliae* yang tidak sama. Meskipun virulensi *M. anisopliae* meningkat namun karena ketahanan larva *O. rhinoceros* juga meningkat, maka tidak diperoleh mortalitas larva instar 3 dalam jangka waktu 14 hari. Larva yang digunakan tidak berasal dari perbanyakan laboratorium, melainkan hanya melalui pemilihan larva dengan ukuran tubuh dan kaput yang hampir sama di lapangan. Meskipun dosis yang digunakan sudah mampu menyebabkan mortalitas pada larva *O. rhinoceros*, ternyata apabila umur larva pada masing-masing perlakuan semakin tua, kepekaan larva terhadap jamur *M. anisopliae* juga semakin rendah. Prayogo *et al.* (2005) menyatakan bahwa keefektifan jamur *M. anisopliae*, di samping dipengaruhi oleh media tumbuh, tingkat virulensi, dan frekuensi aplikasi, juga sangat ditentukan oleh instar serangga tersebut. Media pada saat aplikasi *M. anisopliae* sangatlah menentukan keberhasilan jamur tersebut untuk menginfeksi. Larva yang mati akibat infeksi *M. anisopliae* yang dibawa imago terjadi pada hari pengamatan ke-12 sebanyak 12,5% dan meningkat hingga 100% pada hari ke-56. Sementara itu, kematian larva akibat konidium *M. anisopliae* yang di dalam serbuk gergaji mulai terlihat pada hari pengamatan ke-10 yakni sebesar 12,5% dan meningkat hingga 100% pada hari pengamatan ke-42. Rerata kerapatan konidium *M. anisopliae* yang dibawa oleh imago *O. rhinoceros* untuk dapat menginfeksi dan mengakibatkan larva *O. rhinoceros* mati adalah $6,35 \times 10^6$ konidium/ml (Sartono, 2014).

Kerapatan konidium yang digunakan untuk perlakuan dalam penelitian ini adalah 10^7 konidium/ml dengan cara mencelupkan larva ke dalam suspensi *M. anisopliae* (*dipping method*). Dengan metode tersebut, diduga konidium tidak menempel seluruhnya pada kutikula larva, berbeda dengan metode tular tanah menggunakan medium jagung yang akan menyebabkan terjadinya kontak langsung dengan

kutikula serangga sehingga jumlah konidium jamur yang menempel pada kutikula juga lebih banyak. Semakin tinggi jumlah atau kerapatan konidium, maka akan semakin tinggi pula tingkat infeksi dari jamur tersebut.

Berdasarkan uji molekuler, isolat MaOr terletak pada grup yang berbeda (*out group*) dengan isolat MaLs dan MaBl. Isolat jamur *M. anisopliae* yang berasal dari larva *O. rhinoceros* (MaOr) dan larva *L. stigma* (MaLs) merupakan isolat virulen, sedangkan isolat yang berasal kumbang *B. longissima* (MaBl) tidak virulen terhadap *O. rhinoceros*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 1980. *Pedoman Hama dan Penyakit Tanaman Kelapa*. Direktorat Jenderal Perkebunan Departemen Pertanian, Jakarta. 100 p.
- Bedford. 1980. Biology, Ecology, and Control of Palm Rhinoceros Beetles. *Annual Review Entomology* 25: 309–339.
- Destéfano, S.H.R., S.A.L. Destéfano., & C.L. Messias. 2004. Detection *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within Infected Sugarcane Borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) Using Specific Primer. *Genetic Molecular Biology* 27: 245–252.
- Freed, S., J. Feng-Liang, & R. Shun-Xiang. 2011. Determination of Genetic Variability among the Isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from Different Geographical Origins. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 359–370.
- Hidayat, T. & A. Pancoro. 2006. *Sistematika dan Filogenetika Molekuler. Kursus Singkat Aplikasi Perangkat Lunak PAUP dan MrBayes untuk Penelitian Filogenetika Molekuler*. Institut Teknologi Bandung, Bandung. 9 p.
- Liu, L., R. Zhan, L. Yang, C. Liang, D. Zeng, & J. Huang. 2012. Isolation and Identification of *Metarhizium anisopliae* from *Chillo venosatus* (Lepidoptera: Pyralidae) cadaver. *African Journal of Biotechnology* 30: 1–9.
- Marheni, Hasanuddin, Pinde, & W, Suziani. 2013. Uji Patogenesis Jamur *Metarhizium anisopliae* dan Jamur *Cordyceps militaris* terhadap Larva Penggerek Pucuk Kelapa Sawit (*Oryctes rhinoceros*) (Coleoptera: Scarabaeidae) di Laboratorium. *Jurnal Universitas Sumatera Utara* 1: 32–41.
- Marwoto. 1992. *Masalah Pengendalian Hama Kedelai di Tingkat Petani*. Balai Penelitian Tanaman Pangan, Malang. 65 p.
- Muraji, S. & S. Nakahara, S. 2001. Phylogenetic Relationships among Fruit Flies, *Bactrocera* (Diptera, Tephritidae), Based on the Mitochondrial rDNA Sequences. *Insect Molecular Biology* 6: 549–559.

- Pattemore, J.A., J.K. Hane, A.H. Williams, B.A. Wilsom, B.J. Stodart, & G.J. Ash. 2014. The Genome Sequence of the Biocontrol Fungus *Metarhizium anisopliae* and Comparative Genomics of *Metarhizium* Species. *BMC Genomics Journal* 15: 660–674.
- Prayogo, Y., T. Wedanambi, & Marwoto. 2005. Pemanfaatan Cendawan Entomopatogen *Metarhizium anisopliae* untuk Mengendalikan Ulat Grayak *Spodoptera litura* pada Kedelai. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian* 1: 19–26.
- Rahman. 2010. *Major Pests of Oil Palm*. <http://www.aarsb.com.my/wp-content/Publication/Newsletter/PDF/2010-Apr.pdf>, diakses 7/10/14.
- Subandiyah, S. 2003. *Cara Kerja Ekstraksi DNA Menggunakan CTAB*. Workshop dan *Training Course on Molecular Detection for Plant and Environmental Protection*. Fakultas Pertanian. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 15–20 Desember 2003.
- Sartono, A.N. 2014. Potensi *Metarhizium anisopliae* sebagai Pengendali *Oryctes rhinoceros*. Skripsi. Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 43 p.
- Tangthirasunun, N., S. Poeaim, K. Soyong, P. Sommartya, & S. Popoonsak. 2010. Variation in Morphology and Ribosomal DNA among Isolates of *Metarhizium anisopliae* from Thailand. *Journal of Agricultural Technology* 2: 317–329.
- Thungrabeab, M., B. Peter, & S. Chen. 2006. Possibilities for Biocontrol of the Onion Thrips *Thrips tabaci* Lindeman (Thys., Thripidae) Using Different Entomopathogenic Fungi from Thailand. *Journal Mitteilungen der Deutsche Entomologischen Gessellschaft Basel* 15: 299–304.
- Untung, K. 2001. *Pengantar Pengelolaan Hama Terpadu*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. 348 p.