
Penambahan Massa Jamur Semi-kultur untuk Meningkatkan Sensitivitas Deteksi Entomopatogen dengan Metode *Quantitative real time Polymerase Chain Reaction*

Syaiful Amri Saragih^{*)}, Wan Arfiani Barus, Widi Hastuty, Dafni Mawar Tarigan

Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, Indonesia.
Jl. Kapten Muchtar Basri No. 3, Glugur Darat II, Kecamatan Medan Timur, Kota Medan, Sumatera Utara
20238, Indonesia.

*Correspondence author: nyaifulamrisaragih@umsu.ac.id

Abstrak

Banyak penelitian telah dilakukan untuk mendeteksi jamur entomopatogen di dalam tanah menggunakan metode qPCR. Namun, beberapa penelitian menunjukkan bahwa metode qPCR belum mampu mendeteksi jamur di sampel tanah yang disebabkan oleh sedikitnya kelimpahan jamur pada sampel tanah yang diuji. Untuk mengatasi masalah tersebut, pada penelitian ini dilakukan penambahan massa jamur target di dalam tanah pada tingkat tertentu melalui metode semi-kultur dengan tujuan untuk meningkatkan sensitivitas qPCR. Pertama, dipilih media selektif yang cocok untuk kultur keempat target jamur entomopatogen (*Cordyceps militaris*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, dan *Metarhizium anisopliae*). Kedua, dengan menggunakan media yang dikembangkan, hubungan antara unit pembentuk koloni (CFU) dan DNA tanah standar ditentukan. Ketiga, qPCR dilakukan terhadap ekstrak DNA yang diperoleh dari koloni jamur tiap level. Hasil menunjukkan bahwa media kultur tipe 3b menjadi media selektif yang terbaik untuk kultur jamur. Namun, hubungan linier dengan korelasi kuat antara suspensi jamur dengan nilai Ct belum dapat diperoleh sehingga metodologi semi-kultur tidak berhasil meningkatkan sensitivitas deteksi jamur entomopatogen dari sampel tanah menggunakan metode qPCR. Modifikasi ekstraksi DNA untuk meningkatkan kepadatan DNA dalam ekstrak perlu dilakukan untuk keberhasilan deteksi jamur entomopatogen.

Kata kunci: *Cordyceps militaris*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae*.

Increasing of Semi-cultured Fungal Mass to Increase the Sensitivity of Entomopathogen Detection using the *Quantitative real time Polymerase Chain Reaction Method*

Abstract

Many studies have been carried out to detect entomopathogenic fungi in soil using qPCR. However, several studies have shown that qPCR has not been able to detect fungi in soil samples due to the low abundance of fungi. To overcome this problem, in this study, the mass of target fungi in the soil was increased at a certain level using a semi-culture method to increase the sensitivity of qPCR. First, selective media were selected that were suitable for culturing the four target entomopathogenic fungi (*Cordyceps militaris*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, and *Metarhizium anisopliae*). Second, using the developed media, the relationship between colony forming units (CFU) and standard soil DNA was determined. Third, qPCR was carried out on DNA extracts obtained from fungal colonies at each level. The results showed that media type 3b became the best selective media for fungal culture. However, a linear relationship with a strong correlation between fungal suspensions and Ct values could not be generated so that the semi-culture methodology was not successful in increasing the sensitivity of detecting entomopathogenic fungi from soil samples using qPCR. Modification of DNA extraction to increase DNA density in the extract is necessary for successful detection of entomopathogenic fungi.

Keywords: *Cordyceps militaris*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae*.

Received: 08 December 2023; **Revised:** 09 Maret 2023; **Accepted:** 02 May 2024

PENDAHULUAN

Jamur entomopatogen telah dikenal sebagai salah satu penghambat dan pengendali serangga hama selama lebih dari satu abad dan terus digunakan dalam pengelolaan hama di seluruh dunia (Wang et al., 2011b; Behie and Bidochka, 2014; Jaber dan Enkerli, 2017). Beberapa penelitian mengungkapkan peran jamur entomopatogen sebagai pengatur populasi serangga dan hama arthropoda lainnya seperti belalang, rayap, noktuida, larva kumbang scarabid, kutu busuk, dan hemipteran lainnya (Hasan, 2014; Sultana et al., 2017). Lebih dari 750 spesies jamur entomopatogen telah diisolasi dan dideskripsikan di seluruh dunia, seperti *Cordyceps militaris*, *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, Genus *Isaria* (*Isaria farinosa*, *Isaria fumosorosea*), dan *Metarhizium anisopliae* (Mantzoukas et al., 2015; Ondráčková, 2015; Sevim et al., 2015; Kivett et al., Greenfield et al., 2016; Abdel-Raheem et al., 2017). Jamur entomopatogen pada umumnya hidup di dalam tanah. Dikarenakan kehidupannya di dalam tanah, informasi mengenai keberadaan dan kelimpahan jamur di dalam tanah sangat terbatas terutama pada masa ledakan populasi serangga hama, sehingga sulit untuk mengamati epizootiologi jamur ini di dalam tanah.

Salah satu metode yang telah dilakukan untuk mengamati laju infeksi jamur adalah dengan metode semi-kultur (Saragih et al., 2021). Namun demikian, metode ini memerlukan waktu yang lama dan dibutuhkan serangga dalam jumlah yang besar agar dapat diterima secara statistik saat melakukan analisis. Melihat kelemahan metode semi-kultur, metode *Quantitatif real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR)* telah dicoba untuk mendeteksi dan menghitung jumlah jamur dari sampel tanah menggunakan primer yang spesifik pada beberapa jamur entomopatogen, seperti *Cordyceps militaris* (Saragih et al., 2015) dan *Isaria fumosorosea* (Saragih et al., 2023). Metode qPCR dianggap sebagai metode yang cepat, sensitif, akurat, dan tidak bergantung pada kultur, yang banyak digunakan untuk mendeteksi dan menghitung mikroorganisme diberbagai sampel lingkungan (Chemidlin Prévost-Bouré et al., 2011; Saragih et al., 2015). Saragih et al. (2015) mendesain dua macam kurva standar, yaitu kurva standar untuk DNA genom dan kurva standar untuk DNA dari sampel tanah menggunakan qPCR dan primer yang spesifik untuk mendeteksi jamur *C. militaris* dari sampel tanah. Namun demikian, qPCR tidak mampu mendeteksi *C. militaris* dari sampel tanah yang diuji. Nilai Ct lebih besar daripada kisaran nilai Ct yang dapat dideteksi pada kurva standar. Begitu juga dengan Saragih et al. (2023) berusaha mendeteksi jamur *I. fumosorosea* dari sampel tanah, namun qPCR juga tidak berhasil mendeteksi jamur dikarenakan nilai Ct yang juga diluar kisaran deteksi dari Ct pada kurva standar. Ada kemungkinan kegagalan deteksi ini disebabkan oleh sedikitnya kelimpahan jamur pada sampel tanah yang diuji.

Oleh karena itu, untuk mengatasi masalah ini, ada dua solusi yang mungkin dapat dilakukan: (1) menambah volume tanah pada saat ekstraksi DNA untuk meningkatkan kemungkinan keberadaan jamur pada sampel tanah, (2) meningkatkan massa jamur target di dalam tanah pada tingkat tertentu melalui kultur. Di antara dua solusi di atas, pada penelitian ini penulis mencoba cara yang kedua.

Kepadatan jamur entomopatogen di dalam tanah cenderung lebih rendah dibandingkan dengan jamur dan bakteri lain sehingga diperlukan peningkatan kelimpahan target jamur entomopatogen secara selektif. Banyak media selektif untuk kultur jamur entomopatogen yang telah dikembangkan. Shimazu dan Sato (1996) telah mengembangkan media selektif untuk *B. bassiana* dengan memodifikasi agar dekstrosa Sabouraud (SDA) (Bhadauria et al., 2012).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk meningkatkan sensitivitas qPCR dengan meningkatkan massa jamur menggunakan metode semi-kultur sebelum dilakukannya ekstraksi DNA. Pertama, kami mencoba mengembangkan media selektif yang cocok untuk kultur keempat target jamur entomopatogen (*C. militaris*, *B. bassiana*, *I. fumosorosea*, dan *M. anisopliae*) dengan memodifikasi media Sabouraud Dextrose Agar (SDA) yang dikembangkan oleh Shimazu dan Sato (Saito et al., 2012). Kedua, dengan menggunakan media yang dikembangkan, hubungan antara unit pembentuk koloni (CFU) dan DNA tanah standar ditentukan untuk *C. militaris*, *B. bassiana*, dan *I. fumosorosea*. Ketiga, qPCR dilakukan terhadap

ekstrak DNA yang diperoleh dari koloni jamur tiap level (hubungan nilai Ct dengan densitas suspensi jamur yang digunakan untuk kultur jamur).

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Experimental Station, The University of Tokyo Tanashi Forest, The University of Tokyo, Japan. Penelitian ini dilakukan pada pada bulan April – September 2014.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan berupa agar media (dekstrosa, pepton, dan agar), natrium karbonat (Na_2CO_3), streptomisin, isolat jamur (*C. militaris*, *B. bassiana*, *I. fumosorosea*, dan *M. anisopliae*), twin 80, air bebas DNase, plastik cellophane, kit isolasi DNA Mikroba UltraClean (Laboratorium MO BIO), TaKaRa Ex Taq, gel agarosa, buffer TAE, SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), dan primer. Alat yang digunakan meliputi autoklaf, cawan petri, vortexer, mesin cuci ultrasonik, batang kaca, homogenizer tipe pengocok manik ($\mu\text{T-12}$, TAITEC CORPORATION), inkubator, kamera digital, mikrotube, mesin PCR, mesin elektroforesis, dan mesin PikoReal Real-Time (Thermo Scientific).

Metode Penelitian

Menentukan media terbaik untuk budidaya jamur

Untuk menentukan media yang cocok pada kultur empat jamur entomopatogen, SDA dimodifikasi mengikuti Shimazu dan Sato (Saito et al., 2012). Sepuluh jenis media yang mengandung komposisi dekstrosa, pepton, dan agar yang berbeda diuji (Tabel 1). Natrium karbonat (Na_2CO_3) ditambahkan ke media untuk mengatur pH. Media diautoklaf selama 20 menit pada suhu 120 °C. Sebelum dituangkan ke dalam cawan petri berukuran 9 cm, ditambahkan 0,03 g/L streptomisin (antibiotik) untuk mencegah pertumbuhan bakteri. Tiga jenis suspensi jamur disiapkan (Tabel 2): suspensi jamur murni, suspensi jamur murni ditambah suspensi tanah, dan suspensi jamur murni ditambah suspensi tanah dengan natrium karbonat untuk mengatur pH menjadi 10.

Isolat jamur *C. militaris*, *B. bassiana*, *I. fumosorosea*, dan *M. anisopliae* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Forestry and Forest Product Research Institute (FFPRI) yang berlokasi di Tsukuba, Jepang. Suspensi empat spesies jamur entomopatogen ini dibuat dengan menambahkan 2 g miselia basah ke dalam 10 mL larutan Twin 80 300 ppm, divorteks selama 5 menit dan dimasukkan ke dalam mesin cuci ultrasonik selama 15 menit hingga homogen. Suspensi tanah dibuat dengan menambahkan 1 g tanah ke dalam 200 mL larutan Twin 80 300 ppm (Saito et al., 2012). Suspensi (0,2 mL/pelat) ditempatkan pada sepuluh jenis media dan disebarkan dengan menggunakan batang kaca (Saito et al., 2012). Lima pelat replika dibuat untuk setiap jenis media dan setiap jenis suspensi. Pertumbuhan jamur pada masing-masing jenis media diamati setiap hari hingga 5 hari inkubasi pada suhu 25 °C.

Parameter yang dilihat untuk memilih media yang terbaik adalah koloni jamur dapat tumbuh. Pertumbuhan jamur tidak begitu cepat sehingga jumlah CFU dapat ditentukan dan laju pertumbuhan jamur tidak melambat.

Tabel 1. Sepuluh Jenis Media yang Mengandung Komposisi Dekstrosa, Pepton, dan Agar yang Berbeda yang Digunakan untuk Mengkultur Setiap Spesies Jamur Entomopatogen.

Ingredient	Type									
	1a	2a	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b
Dextrose (g/L)	40	20	10	10	6	6	12	12	12	12
Peptone (g/L)	10	10	10	10	3	3	3	3	6	6
Agar (g/L)	20	20	20	20	15	15	15	15	15	15
pH	6	6	6	10	6	10	6	10	6	10

Tabel 2. Tiga Jenis Suspensi Jamur.

Jenis	Konten	Deskripsi	Formula
1	Kultur jamur murni	Suspensi dibuat menggunakan miselia yang ditambah Twin-80	2 g miselia basah + 10 mL suspensi 300 ppm Twin 80
2	Kultur jamur + suspensi tanah (pH 6)	Suspensi dibuat dengan mencampurkan kultur murni dengan suspensi tanah (pH 6 = pH normal) dengan perbandingan yang sama	5 mL kultur jamur murni + 5 ml suspense tanah
3	Kultur jamur + suspensi tanah (pH 10)	Suspensi dibuat dengan mencampurkan pra kultur dengan suspensi tanah (pH 10, pH diatur menggunakan Na ₂ CO ₃) dengan perbandingan yang sama	5 mL kultur jamur murni + 5 ml suspense tanah

CFU dan qPCR dengan metode semi-kultur

Suspensi masing-masing jamur dibuat dengan menambahkan miselia dan konidia masing-masing jamur ke dalam 0,6 mL air bebas DNase dan dihomogenisasi menggunakan homogenizer tipe pengocok manik (μ T-12, TAITEC CORPORATION) pada 3200 rpm selama 5 menit dan divorteks (Tabel 3). Dari suspensi asli, dibuat tiga belas tingkat pengenceran suspensi 10 kali lipat dengan tingkat 10 sebagai tingkat tertinggi, yang kira-kira bertepatan dengan tingkat suspensi yang digunakan untuk memperoleh kurva standar tanah. Di antara tiga belas tingkat, hanya sepuluh tingkat dari terendah (Level (-2) - 7) digunakan untuk budidaya jamur karena kepadatan jamur entomopatogen dalam tanah rendah sehingga tidak perlu menggunakan suspensi dengan kadar tinggi (Level 8-10). Media SDA yang digunakan dalam percobaan ini adalah Tipe 3b yang dipilih sebagai media terbaik. Selambar plastik cellophane berukuran 5 cm x 5 cm ditempelkan pada permukaan media. Dari masing-masing taraf, suspensi sebanyak 0,2 mL dituangkan ke dalam cawan petri yang diberi media SDA dan diratakan menggunakan batang kaca. Jumlah koloni pada lembaran plastik cellophane berukuran 5 cm x 5 cm ditentukan setelah inkubasi 5 hari pada suhu 25 °C. Enam ulangan pelat dibuat untuk setiap tingkat suspensi.

Jumlah CFU ditentukan dengan memotret lempengan tersebut setiap hari. qPCR dilakukan pada koloni *C. militaris*. Koloni jamur yang tumbuh pada lembaran plastik berukuran 5 cm x 5 cm dikumpulkan, dimasukkan ke dalam mikrotube 2 mL dan ditambahkan 300 μ l air bebas DNase, dan dihomogenisasi menggunakan bead beater-type homogenizer (μ T-12, TAITEC CORPORATION) pada suhu yang sama. 3200 rpm selama 5 menit. Setelah homogenisasi, 200 μ L air bebas DNase ditambahkan ke dalam mikrotube dan divorteks untuk membuat suspensi. DNA genom diekstraksi dari suspensi menggunakan Kit Isolasi DNA Mikroba UltraClean (Laboratorium MO BIO) sesuai dengan protokol pabrikan dan kemudian dilakukan PCR. Kemudian, qPCR dilakukan untuk setiap sampel. Hubungan antara kepadatan suspensi jamur asli dan nilai *Ct* ditentukan.

Tabel 3. Berat miselia digunakan untuk pembuatan suspensi level 10 sebanyak 0,6 mL.

Spesies	Berat kering (mg)
<i>Cordyceps militaris</i>	2,4
<i>Beauveria bassiana</i>	3,2
<i>Isaria fumosorosea</i>	2,3

PCR

PCR dilakukan menggunakan genomic DNA dengan primer spesifik dalam 20 µl campuran reaksi yang mengandung 2 µL DNA template, 2 µL TaKaRa Ex Taq (Buffer bebas Mg²⁺) (TaKaRa), 1,6 µL campuran dNTP (TaKaRa), 0,4 µL masing-masing 25 nM primer, 0,1 µL TaKaRa Ex Taq Polymerase (TaKaRa) dan air bebas DNase untuk melengkapi total volume 20 µL dengan kondisi PCR: denaturasi awal pada 95 °C selama 3 menit, diikuti oleh 30 putaran denaturasi pada 95 °C selama 15 detik, annealing pada 60 °C selama 30 detik, ekstensi pada 68 °C selama 30 detik, dan ekstensi akhir pada 68 °C selama 5 m (Saragih *et al.*, 2015, Saragih *et al.*, 2023). Produk PCR (20 µL) kemudian dimasukkan ke dalam gel agarosa 1% (b/v) dan dijalankan selama 40 menit pada 100 V dalam buffer TAE dan dikonfirmasi dengan elektroforesis di bawah sinar UV.

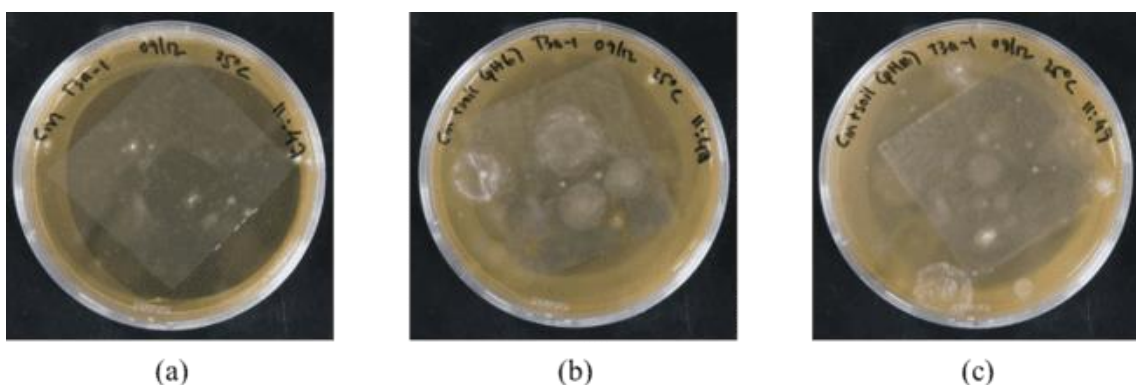
Quantitative real-time PCR (qPCR)

Metode qPCR dilakukan dalam volume campuran 20 µL yang mengandung 10 µL SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 4 µL masing-masing primer 2,5 nM (F dan R), 2 µL DNA template, menggunakan qPCR PikoReal Real-Time (Thermo Scientific) dengan pelat 96. Kondisi proses qPCR: denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 7 menit, dilanjutkan denaturasi pada suhu 95 °C selama 10 detik, ekstensi pada suhu 68 °C selama 20 detik, dan ekstensi akhir pada suhu 60 °C selama 30 detik. Suhu anil dan nomor siklus berbeda-beda pada setiap spesies. Untuk *M. anisopliae*, kondisi qPCR diatur sesuai dengan Schneider (2011) yaitu denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 15 menit, dilanjutkan dengan 45 kali proses denaturasi pada suhu 94 °C selama 40 detik, annealing pada suhu 66 °C selama 40 detik, ekstensi pada suhu 72 °C selama 2 menit, dan ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 10 menit.

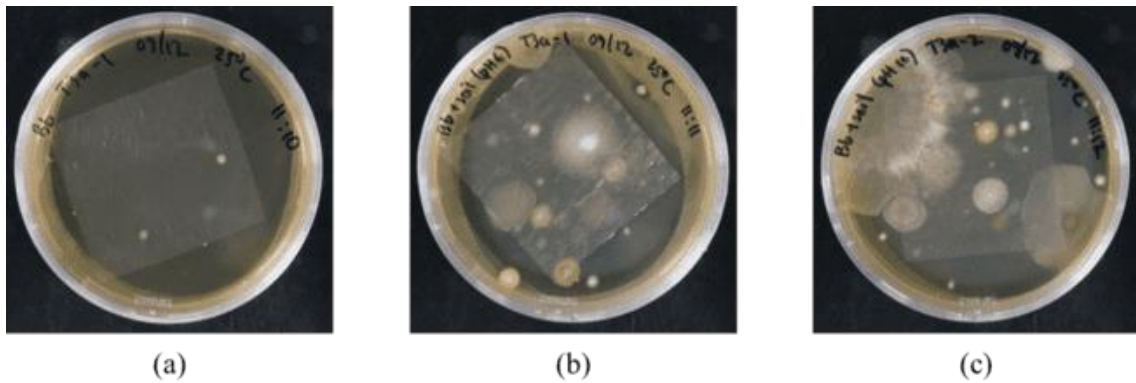
HASIL DAN PEMBAHASAN

Menentukan Media Terbaik untuk Kultur Jamur

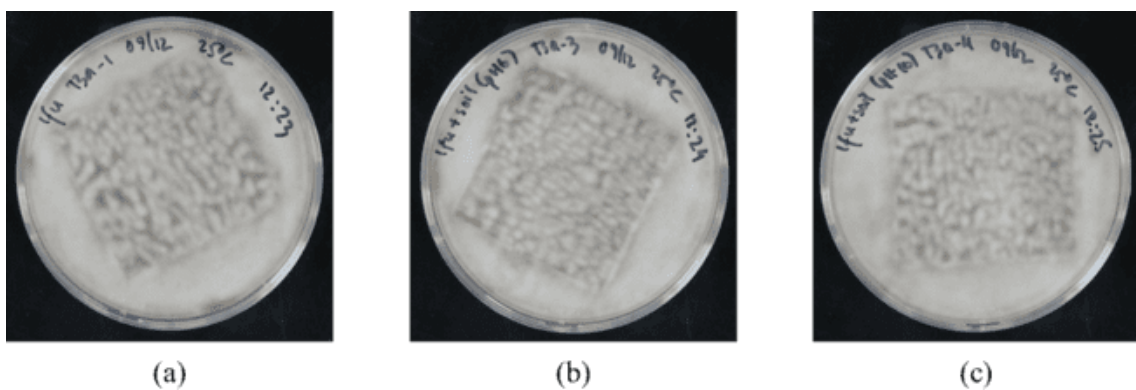
Hasil menunjukkan bahwa media SDA tipe 3b merupakan media terbaik diantara sepuluh media lainnya untuk kultur jamur entomopathogen. Keempat spesies jamur dapat tumbuh dengan baik pada media tipe 3b (Gambar 1, 2, 3, dan 4) dibandingkan dengan media lainnya. Media tipe 3b yang mengandung 10 g dekstrosa, 10 g pepton, dan 20 g agar per 1000 mL air bebas DNase dan ditambah Na₂CO₃ untuk mengatur pH menjadi 10, dan streptomisin (Tabel 1), dinilai sebagai media terbaik untuk membiakkan jamur entomopatogen pada penelitian ini dengan melihat pada pertumbuhan koloni jamur menggunakan tiga jenis suspensi (Gambar 1, 2, 3, dan 4).



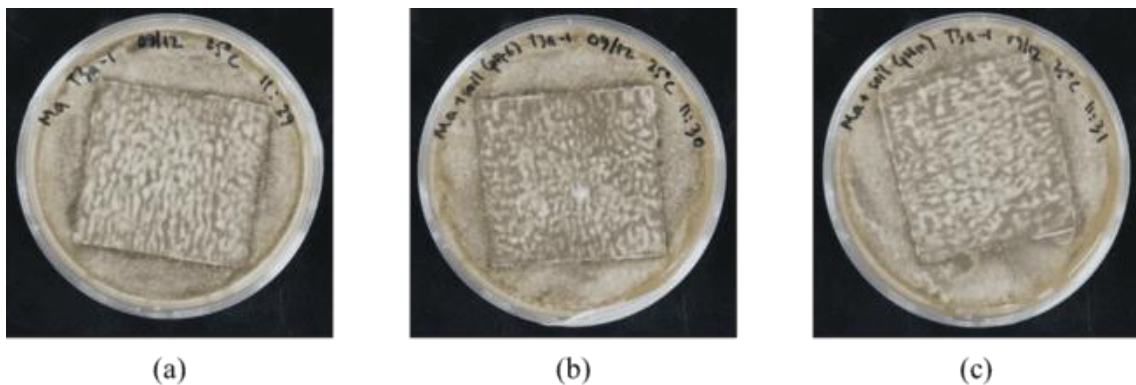
Gambar 1. Perkembangan Koloni *Cordyceps militaris* pada Media Tipe 3b Menggunakan Tiga Jenis Suspensi (Level 6) setelah Inkubasi 5 Hari; (a) Kultur Murni; (b) Kultur Murni Ditambah Suspensi Tanah (pH 6); (c) Kultur Murni Ditambah Suspensi Tanah (pH 10).



Gambar 2. Perkembangan Koloni *Beauveria bassiana* pada Media Tipe 3b Menggunakan Tiga Jenis Suspensi (Level 6) setelah Inkubasi 5 Hari; (a) Kultur Murni; (b) Kultur Murni Ditambah Suspensi Tanah (pH 6); (c) Kultur Murni Ditambah Suspensi Tanah (pH 10).

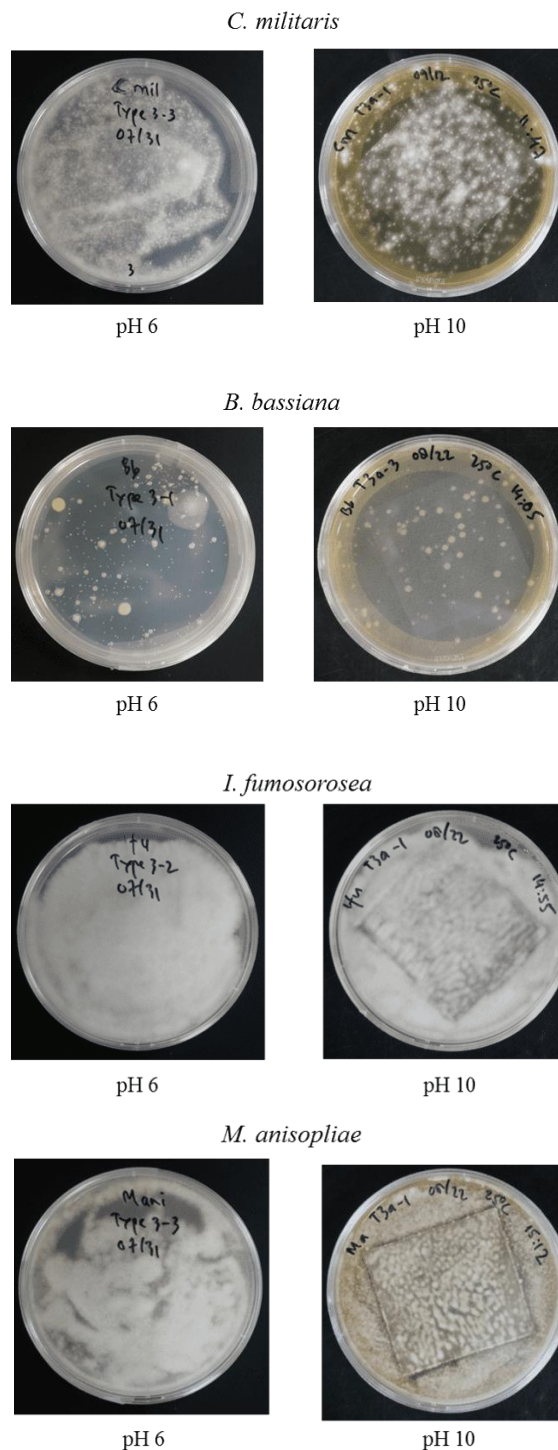


Gambar 3. Perkembangan Koloni *Isaria fumosorosea* pada Media Tipe 3b Menggunakan Tiga Jenis Suspensi (Level 6) setelah Inkubasi 5 Hari; (a) Kultur Murni; (b) Kultur Murni Ditambah Suspensi Tanah (pH 6); (c) Kultur Murni Ditambah Suspensi Tanah (pH 10).



Gambar 4. Perkembangan Koloni *Metarhizium anisopliae* pada Media Tipe 3b Menggunakan Tiga Jenis Suspensi (Level 6) setelah Inkubasi 5 Hari; (a) Kultur Murni; (b) Kultur Murni Ditambah Suspensi Tanah (pH 6); (c) Kultur Murni Ditambah Suspensi Tanah (pH 10).

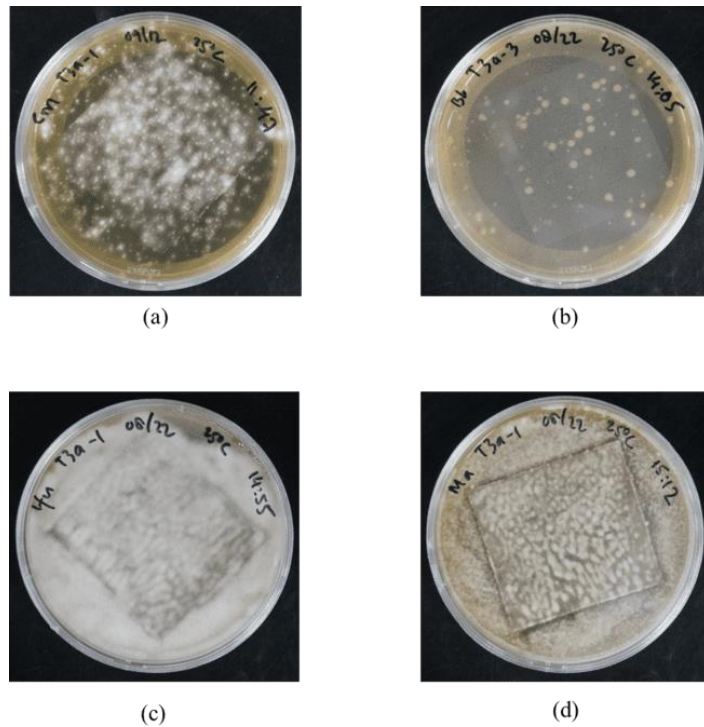
Pertumbuhan jamur antara media pH 6 dan pH 10 tidak berbeda pada *C. militaris*, *M. anisopliae*, dan *I. fumosorosea* dengan melihat pada kepadatan pertumbuhan jamur. Namun pada *B. bassiana*, media dengan pH 10 tampak lebih baik dibandingkan dengan pH 6, dan jumlah CFU-nya juga lebih banyak (Gambar 5), sehingga dapat disimpulkan bahwa pH 10 menjadi pH yang lebih baik untuk pertumbuhan jamur *B. bassiana*. Dari keempat jamur, pertumbuhan jamur yang paling baik adalah pada jamur *I. fumosorosea*, disusul oleh *M. anisopliae* pada tiga jenis suspense, bahkan pada kultur murni.



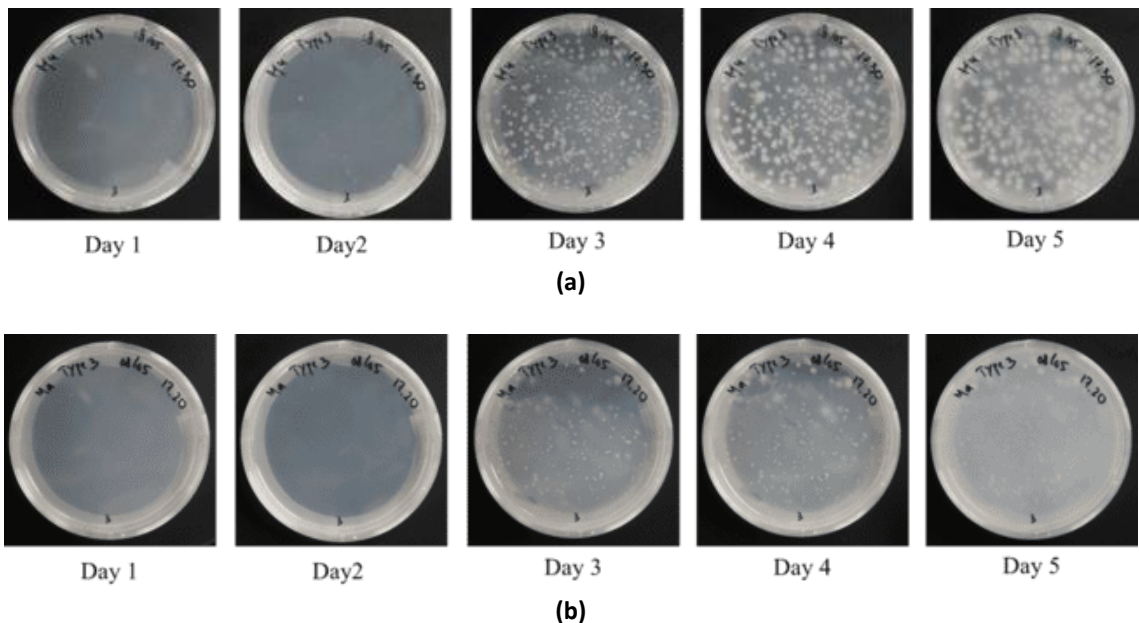
Gambar 5. Perbandingan Perkembangan Koloni Empat Jamur Entomopatogen Antara Media Tipe 3a (pH 6) dan tipe 3b (pH 10).

Lama Inkubasi yang Diperlukan untuk Menentukan Jumlah CFU

Di antara empat spesies, *C. militaris*, *I. fumosorosea*, dan *M. anisopliae* tumbuh lebih cepat dibandingkan *B. bassiana* (Gambar 6). Sedangkan *I. fumosorosea* dan *M. anisopliae*, koloni dapat dihitung hingga inkubasi 3 hari tetapi setelahnya tidak dapat dihitung (Gambar 7). Pertumbuhan seluruh jamur pada media tipe 3b tidak cepat (Gambar 6). Massa jamur akan bertambah bila jamur dikultur lebih lama (Gambar 7). Masa inkubasi 3 hari merupakan masa inkubasi terbaik bagi *I. fumosorosea*, dan *M. anisopliae*, namun pertumbuhan jamur yang cepat sehingga menyulitkan penghitungan koloni sejak hari keempat inkubasi (Gambar 7).



Gambar 6. Perkembangan Koloni Keempat Jamur Entomopatogen pada Media Tipe 3b Setelah Inkubasi 5 Hari: (a) *Cordyceps militaris*; (b) *Beauveria bassiana*; (c) *Isaria fumosorosea*; (d) *Metarhizium anisopliae*.

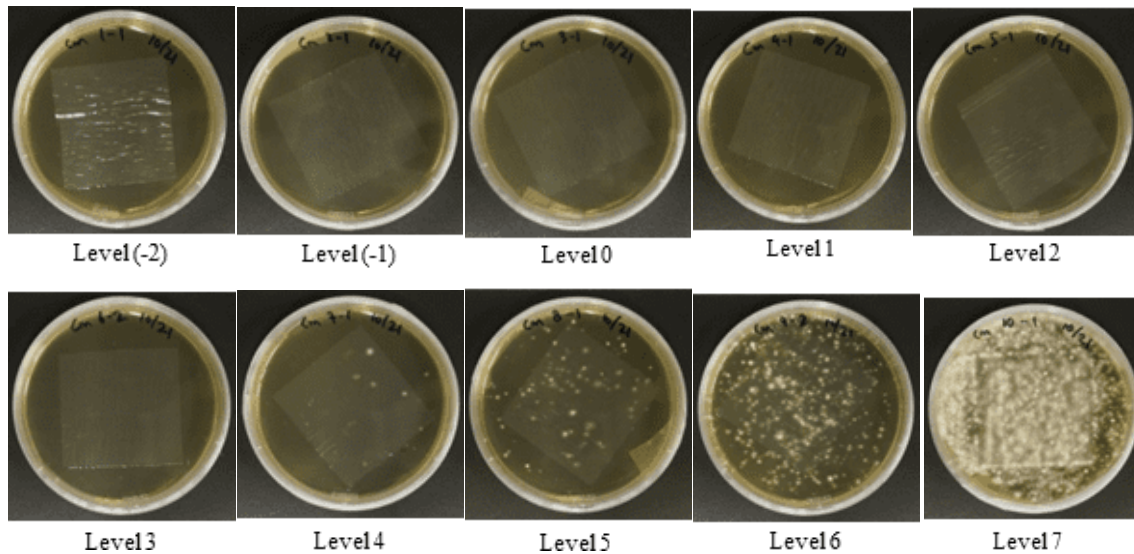


Gambar 7. Perkembangan Koloni Harian pada Media Tipe 3a; (a) *Isaria fumosorosea*; (b) *Metarhizium anisopliae*.

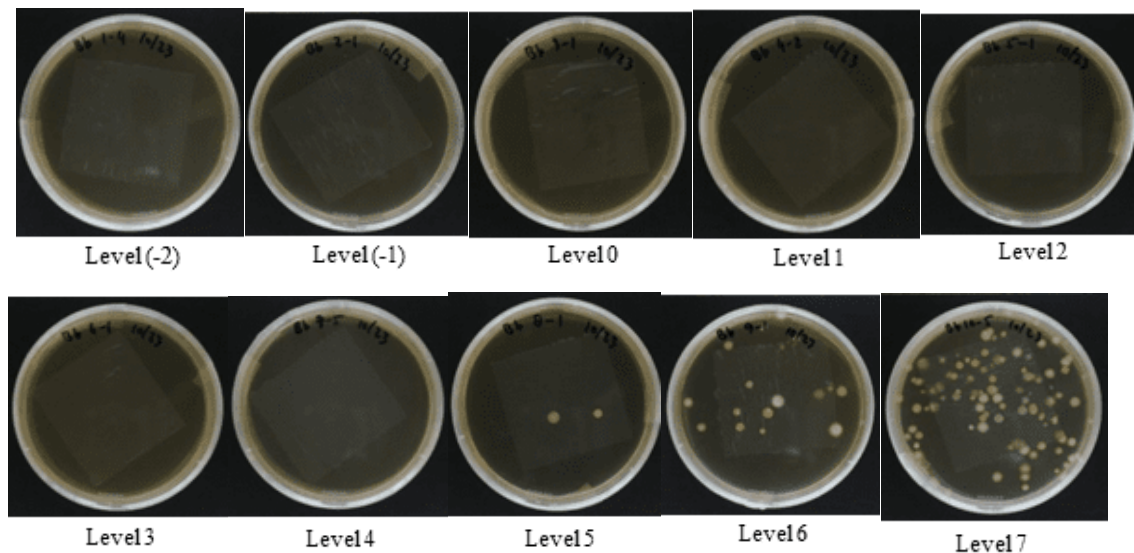
Kultur Jamur pada Media untuk Penghitungan Koloni

Pertumbuhan koloni sangat bervariasi antar spesies (Gambar 8a, 8b, 8c). Jumlah CFU untuk masing-masing spesies pada semua tingkatan ditunjukkan pada Tabel 4. Koloni *C. militaris* ditemukan pada tingkat 4-7. Namun penghitungan CFU tidak dapat diperoleh pada level 7 karena koloni saling bersatu bahkan pada inkubasi 3 hari. Untuk *B. bassiana*, jumlah CFU diperoleh pada level 5-7. Koloni *I. fumosorosea* ditemukan pada level 3-7. Jumlah CFU tidak diperoleh pada level 5-7 dengan alasan yang sama seperti level 7 pada *C. militaris*.

Meskipun secara umum jamur lebih menyukai media yang sedikit asam, jamur entomopatogen diketahui sangat toleran terhadap pH tinggi (Drauzio *et al.*, 2015), sehingga untuk meningkatkan pH, ditambahkan Na₂CO₃ pada penelitian ini (Radi *et al.*, 2012; Attasat *et al.*, 2012; Nayak *et al.*, 2013). Pertumbuhan jamur tidak berbeda antara pH 6 dan pH 10 untuk *C. militaris*, *M. anisopliae*, dan *I. fumosorosea* (Gambar 5). Namun, untuk *B. bassiana*, media dengan pH 10 tampak lebih baik daripada pH 6 karena jumlah CFU lebih banyak (Gambar 5). Hasil ini sejalan dengan hasil Shimazu dan Sato (Saito *et al.*, 2012) yang menunjukkan bahwa *B. bassiana* dapat tumbuh dengan baik pada pH tinggi dan lebih baik dibandingkan jamur lain pada media dengan pH tinggi (pH = 9,5). Pada percobaan ini, streptomisin digunakan sebagai antibiotik untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Namun, pH media yang tinggi juga kemungkinan besar berkontribusi menekan bakteri.



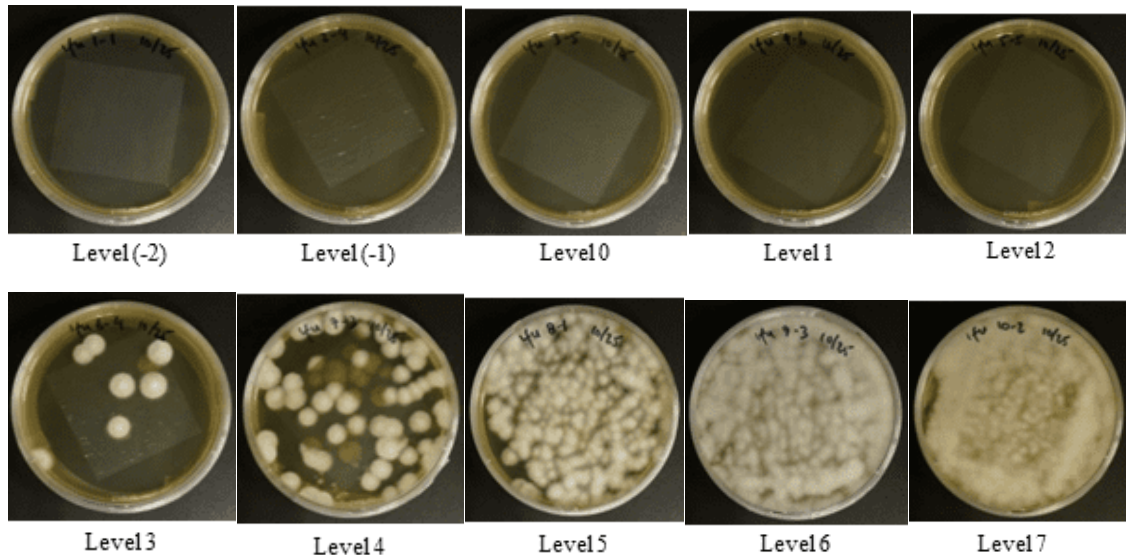
Gambar 8a. Pertumbuhan Koloni *Cordyceps militaris* pada 10 Kadar Suspensi Jamur yang Berbeda Setelah Inkubasi 5 Hari Pada Suhu 25° C.



Gambar 8b. Pertumbuhan Koloni *Beauveria bassiana* pada 10 Kadar Suspensi Jamur yang Berbeda Setelah Inkubasi 5 Hari Pada Suhu 25° C.

CFU dari *C. militaris* terbentuk pada level 4 atau lebih tinggi pada media tipe 3b (Tabel 4). Tidak ada nilai Ct yang terdeteksi lebih rendah dari level 4 pada kurva standar sampel tanah DNA kemungkinan karena tidak adanya CFU *C. militaris* dalam suspensi yang lebih rendah dari level 4. Sedangkan untuk *B.*

bassiana, jumlah CFU diperoleh pada level 5 atau lebih tinggi (Tabel 4). Hasil ini menunjukkan bahwa pembentukan koloni *B. bassiana* kemungkinan tertekan pada media tipe 3b. Sebenarnya pembentukan koloni dan pertumbuhan jamur lebih rendah pada *B. bassiana* dibandingkan spesies lainnya (Gambar 8b). Formasi CFU *I. fumosorosea* diketahui berada pada level 3 dan lebih tinggi (Tabel 4). Nilai *Ct* juga diperoleh pada level 3 dan lebih tinggi pada DNA standar tanah.



Gambar 8c. Pertumbuhan koloni *Isaria fumosorosea* pada 10 Kadar Suspensi Jamur yang Berbeda Setelah Inkubasi 5 Hari Pada Suhu 25° C.

Tabel 4. Jumlah Colony Forming Unit (CFU's) Tiap Spesies Jamur Entomopatogen Pada Berbagai Dosis Suspensi (Level (-2) - 7).

Spesies	Level suspense									
	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7
<i>Cordyceps militaris</i>	0	0	0	0	0	0	3.5 (Min=0, Max=7)	29.83 (Min=10, Max=66)	264.5 (Min=219, Max=305)	UC ^a
<i>Beauveria bassiana</i>	0	0	0	0	0	0	0	0.5 (Min=0, Max=2)	5.67 (Min=3, Max=9)	60.67 (Min=53, Max=69)
<i>Isaria fumosorosea</i>	0	0	0	0	0	3.67 (Min=1, Max=5)	46.67 (Min=36, Max=54)	UC ^a	UC ^a	UC ^a

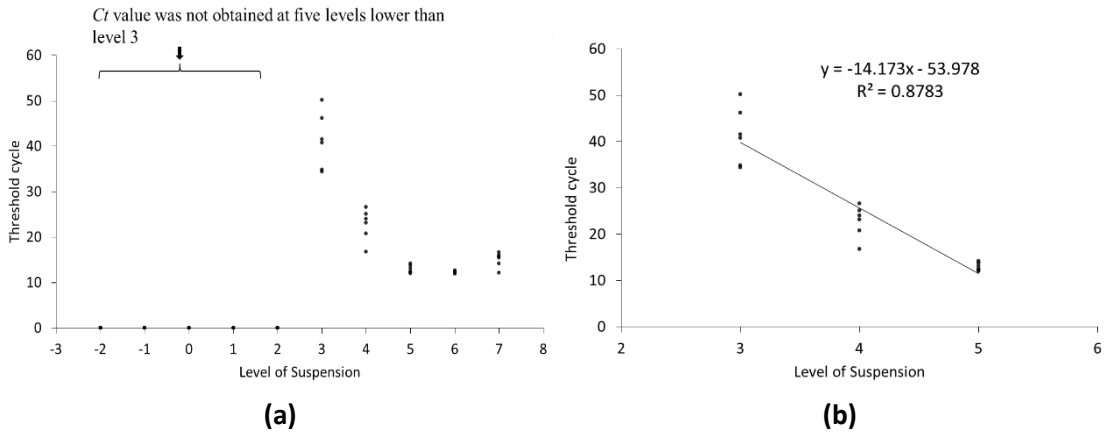
- ^aKoloni yang tidak dapat dihitung karena saling bersatu

- Enam ulangan untuk setiap level

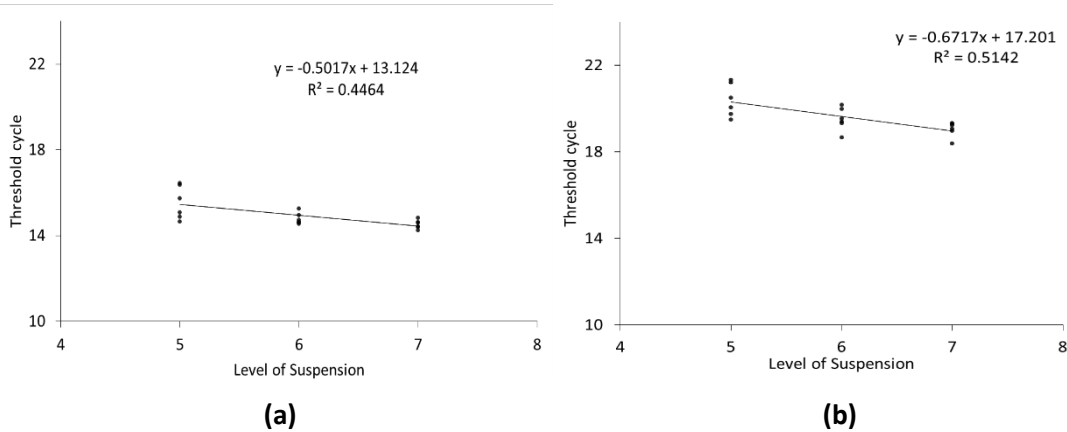
qPCR untuk Memeriksa Hubungan Antara Kepadatan Suspensi dan Nilai *Ct*

Hubungan antara konsentrasi suspensi jamur *C. militaris* dan nilai *Ct* yang diperoleh dari DNA genom dari koloni yang dikultur ditunjukkan pada Gambar 9. Nilai *Ct* tidak terdeteksi pada level yang lebih rendah dari level 3. Sebaliknya, nilai *Ct* konstan pada level 5-7. Variasi yang besar dalam nilai *Ct* ditemukan di semua replikasi di setiap level kecuali pada level 5 dan 6. Hubungan linier diperoleh hanya pada tiga level (Level 3-5) meskipun kecocokannya tidak baik ($R^2 = 0,8783$).

Nilai *Ct* dalam pengenceran 10 kali lipat untuk tiga level (Level 5-7) cenderung meningkat pada level yang lebih rendah meskipun peningkatannya kecil (kemiringan = -0,5017, $R^2=0,4464$, $r = -0,9639$) (Gambar 9). Hubungannya lebih kuat pada pengenceran 100 kali lipat (kemiringan = -0,6717, $R^2=0,5142$, $r=-0,9868$) (Gambar 10).



Gambar 9. Hubungan Antara Suspensi Tiap Level Dengan Nilai Ct pada *Cordyceps militaris* Menggunakan Media Tipe 3b; (a) Hasil Dari Level (-2) Sampai Level 7; (b) Sebuah Regresi Linear Menggunakan Nilai Ct Pada Level 3-5.



Gambar 10. qPCR Menggunakan Pengenceran Ekstrak DNA Pada Level 5, 6, dan 7. (a) Pengenceran 10 Kali; (b) Pengenceran 100 Kali.

Dalam metode semi-kultur untuk *C. militaris*, hubungan linier dapat dilihat melalui nilai *Ct* hanya pada tiga level (level 3-5) (Gambar 9). Ditambah lagi, kurva menunjukkan hubungan yang lemah ($R^2 = 0.8783$). Nilai *Ct* yang sangat bervariasi pada setiap level menunjukkan bahwa pertumbuhan jamur pada setiap level sangat bervariasi. Jumlah CFU juga sangat bervariasi antar ulangan dalam setiap level (Tabel 4). Tidak ada perbedaan nilai *Ct* yang terdeteksi antara level 5, 6, dan 7 karena tingginya konsentrasi ekstrak DNA original (Gambar 9). Nilai *Ct* dan variansnya meningkat pada level 7 pada metode semi kultur (Gambar 9). Ketika ekstrak DNA original dari ketiga level diencerkan 10 atau 100 kali, ditemukan perbedaan (Gambar 10) yang menunjukkan bahwa jumlah tubuh jamur berbeda di antara ketiga level. Namun, bahkan pada pengenceran 100 kali, kemiringannya cukup curam yang menunjukkan bahwa perbedaan kuantitas koloni jamur antara dua tingkat berturut-turut menjadi lebih kecil karena inkubasi, yang mungkin bergantung pada saturasi pertumbuhan jamur (Gambar 8 (a)). Hasil tersebut menunjukkan sulitnya memperoleh hubungan linier dengan korelasi kuat dengan menggunakan metode semi-kultur.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa metodologi semi-kultur tidak berhasil meningkatkan sensitivitas deteksi jamur entomopatogen dari sampel tanah menggunakan metode *Quantitative real time Polymerase Chain Reaction* (qPCR). Metode semi-kultur dilakukan dengan tujuan untuk meningkatkan massa jamur sehingga dapat meningkatkan deteksi jamur menggunakan qPCR. Namun, hubungan linier antara dosis jamur dan nilai *Ct* tidak diperoleh dari semi-kultur. Di sisi lain, kultur jamur membuktikan bahwa qPCR mendeteksi *C. militaris* dengan kepadatan rendah seperti halnya CFU. Dengan

demikian, metode semi-kultur belum dapat digunakan sebagai solusi untuk menghitung kelimpahan jamur menggunakan metode qPCR sehingga jika metode qPCR digunakan untuk deteksi jamur secara langsung dari sampel tanah, modifikasi ekstraksi DNA untuk meningkatkan kepadatan DNA jamur dalam ekstrak tanah diperlukan untuk keberhasilan deteksi dan kuantifikasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Raheem, M.A., & Al-Keridis, L.A. (2017). Virulence of three entomopathogenic fungi against whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) in tomato crop. *Journal of Entomology*, 14(4), 155-159.
- Attasat, S., Wanichpongpan, P., & Ruenglerpanyakul, W. (2012). Cultivation of microalgae (*Oscillatoria okeni* and *Chlorella vulgaris*) using tilapia-pond effluent and a comparison of their biomass removal efficiency. *Water Science and Technology*, 67, 271-277.
- Behie, S.W., & Bidochka, M.J. (2014). Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 1553–1560.
- Bhadauria, B.P., Puri, S., & Singh, P. K. (2012). Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products. *The Bioscan*, 7 (2), 229-232.
- Chemidlin Prévost-Bouré, N., Christen, R., Dequiedt, S., Mougél, C., Lelièvre, M., Jolivet, C., Shahbazkia, H.R., Guillou, L., Arrouays, D., & Ranjard, L. (2011). Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. *PLoS One*, 6(9), e24166.
- Drauzio, E.N.R., Gilberto, U.L.B., Éverton, K.K.F., Chad, A.K., John, E.H., & Donald, W.R. (2015). Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during conidial formation. *Current Genetics*, 61, 383-404.
- Greenfield, M., Gómez-Jiménez, M.I., Ortiz, V., Vega, F.E., Kramer, M., Parsa, S. (2016). *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Biological Control* 95, 40-48.
- Hasan, S. (2014). Entomopathogenic Fungi as Potent Agents of Biological Control. *International Journal of Engineering and Technical Research*, 2(3), 221-229.
- Jaber, L.R., & Enkerli, J. (2017). Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth?. *Biocontrol Science and Technology*, 27(1), 28-41.
- Kivett, J.M., Cloyd, R.A., & Bello, N.M. (2016). Evaluation of entomopathogenic fungi against the western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) under laboratory conditions. *Journal of Entomological Science*, 51(4), 274-291.
- Mantzoukas, S., Chondrogiannis, C., & Grammatikopoulos, G. (2015). Effects of three endophytic entomopathogens on sweet sorghum and on the larvae of the stalk borer *Sesamia nonagrioides*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 154, 78-87.
- Nayak, M., Rath, S.S., Thirunavoukkarasu, M., Panda, P.K., Mishra, B.K., & Mohanty, R.C. (2013). Maximizing biomass productivity and CO₂ biofixation of microalga, *Scenedesmus* sp. by using sodium hydroxide. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 1260-1268.
- Ondráčková, E. (2015). The use of entomopathogenic fungi in biological control of pests. *Acta Fytotechn Zootech*, 18, 102-105.
- Radi, A.A., Abdel-Wahab, D.A., & Hamada, A.M. (2012). Evaluation of some bean lines tolerance to alkaline soil. *Journal of Biology and Earth Sciences*, 2, 18-27.

- Saito, T., Takatsuka, J., & Shimazu, M. (2012). Characterization of *Paecilomyces cinnamomeus* from the camellia whitefly, *Aleurocanthus camelliae* (Hemiptera: Aleyrodidae), infesting tea in Japan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110, 14-23.
- Saragih, S. A., Kusumoto, D., Takemoto, S., Torii, M., & Kamata, N. (2021). Virulence of fungi isolated from ambrosia beetles to *Acer amoenum* branches. *Plant Disease*, 105, 3087-3091.
- Saragih, S.A., Takemoto, S., Hisamoto, Y., Fujii, M., Sato, H., & Kamata, N. (2015). Quantitative real-time PCR (qPCR) - Based tool for detection and quantification of *Cordyceps militaris* in soil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 124, 70-72.
- Saragih, S.A., Takemoto, S., Sato, H., & Kamata, N. (2023). Specific primer designing for quantitative PCR (qPCR) of entomopathogenic fungi *Isaria fumosorosea* from soil samples. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 27 (1), 51-57.
- Sevim, A., Sevim, E., & Demirbağ, Z. (2015). General biology of entomopathogenic fungi and their potential to control pest species in Turkey (Entomopatojenik fungusların genel biyolojileri ve Türkiye'de zararlı böceklerin mücadelesinde kullanılma potansiyelleri). *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(1), 115-147.
- Sultana, R., Kumar, S., & Yanar, D. (2017). Application of entomopathogenic fungi for insect pests control. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5, 7-13.
- Wang, S., O'Brien, T.R., Pava-Ripoll, M., & St Leger, R.J. (2011b). Local adaptation of an introduced transgenic insect fungal pathogen due to new beneficial mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 20449-20454.