

**Isolasi dan Identifikasi Jamur Entomopatogen Isolat Tomohon dari Larva  
Ulat Grayak *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)**

*(Isolation and Identification of Entomopathogenic Fungus Isolates Tomohon from the  
Larvae of the caterpillar Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae))*

**Parluhutan Siahaan\* dan Indry Mullo**

Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences,  
Universitas Sam Ratulangi. Jl. Kampus UNSRAT Manado, 95115, Indonesia.

\*Corresponding author: [luhut.siahaan68@unsrat.ac.id](mailto:luhut.siahaan68@unsrat.ac.id)

**Abstrak**

Ulat grayak frugiperda (*Spodoptera frugiperda*) merupakan salah satu hama invasif berbahaya yang menyerang perkebunan jagung di Kota Tomohon. Pada kenyataan di lapangan terdapat jamur entomopatogen yang menginfeksi ulat grayak frugiperda, namun sampai saat ini belum ada data jamur entomopatogen yang diisolasi dari lokasi ini. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi jamur entomopatogen isolat Tomohon dari larva *S. frugiperda*. Larva yang terinfeksi diisolasi dan diidentifikasi morfologi di Laboratorium Agens Hayati BPPMTPH Kalasey, dan identifikasi molekuler di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Unsrat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jamur entomopatogen yang menyerang larva *S. frugiperda* merupakan spesies *Metarhizium rileyi* memiliki ciri-ciri morfologi makroskopis dengan bentuk permukaan koloni yang membulat, dan warna koloni pada fase diawal pertumbuhan vegetatifnya berwarna putih dan saat akan memasuki fase generatif hingga isolat berubah warna menjadi hijau tua, bentuk konidia bulat telur, konidiofor lurus dan berseptat, cabang tumbuh didekat septat, berdinding halus dan hialin.

**Kata kunci:** *Metarhizium rileyi*; entomopatogen; *Spodoptera frugiperda*

**Abstract**

The armyworm frugiperda (*Spodoptera frugiperda*) is a dangerous invasive pest that attacks corn plantations in Tomohon City. In fact in the field there are entomopathogenic fungi that infect the armyworm frugiperda, but so far there is no data on entomopathogenic fungi isolated from this location. This study aimed to isolate and identify the entomopathogenic fungus Tomohon from the Larvae of *S. frugiperda*. Infected larvae were isolated and morphologically identified at the Laboratory of Biological Agents BPPMTPH Kalasey, and molecular identification at the Microbiology Laboratory, FMIPA Unsrat. The results showed that the entomopathogenic fungus that attacks the larvae of *S. frugiperda* is a species of *Metarhizium rileyi* which has macroscopic morphological characteristics with a rounded colony surface shape, and the color of the colony in the early phase of vegetative growth is white and when it enters the generative phase until the isolate changes color to dark green, conidia ovate, conidiophores straight and septate, branches grow near the septa, smooth walls and hyaline.

**Keywords:** *Metarhizium rileyi*; entomopathogen; *Spodoptera frugiperda*

**PENDAHULUAN**

Ulat grayak frugiperda (*Spodoptera frugiperda*) merupakan salah satu hama invasif yang berbahaya karena memiliki siklus hidup yang pendek, dan populasinya yang besar dapat mengancam tanaman budidaya (Subiono, 2020). Penyebaran *S. frugiperda* ini terjadi akibat beberapa faktor yang dapat membantu serangga ini bisa berada di wilayah tertentu yaitu seperti kemampuan dari serangga ini yang dapat terbang jauh, dan memiliki kemampuan adaptasi yang baik (Bagariang et al., 2020). Menurut Maharani et al. (2019) yang menyatakan bahwa ketinggian tempat kemungkinan merupakan salah satu faktor keberadaan dan populasi dari *S. frugiperda*, karena berdasarkan penelitian yang telah dilakukan hanya pada lokasi

survei yang ketinggiannya sekitar 700-850 mdpl yang ditemukan hama serangga *S. frugiperda* ini, dan pada lokasi survei dengan ketinggian di atas 850 m dpl tidak ditemukan hama serangga *S. frugiperda*.

Ulat grayak frugiperda (*S. frugiperda*) ini dapat menyerang lebih dari 80 spesies tanaman, salah satunya yaitu tanaman jagung. Serangan *S. frugiperda* dapat dilihat dari gejala-gejala yang tampak pada organ-organ tanaman jagung. Ketika larva ini menyerang organ daun dapat dilihat daun tersebut berlubang-lubang akibat dimakan oleh larva *S. frugiperda*, tepi daun terlihat compang-camping dan gejala yang lebih parah yaitu larva bisa memakan sampai hanya tersisa pelepah daun (Nadrawati et al., 2019). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Maharani et al. (2019) bahwa hama *S. frugiperda* menyerang tanaman jagung jenis hibrida manis dan hibrida biasa pada bagian pucuk tanaman, pada saat kuncup daun belum membuka penuh maka dapat dilihat banyak kotoran larva dan dapat dilihat kuncup berlubang-lubang dan pada saat kuncup sudah membuka penuh tampak bagian-bagian daun banyak yang mengalami kerusakan.

Di Provinsi Sulawesi Utara terdapat 13 jenis hama serangga yang menyerang tanaman jagung, antara lain yaitu ulat grayak frugiperda. Salah satu wilayah perkebunan jagung di Sulawesi Utara yang diserang oleh hama ini yaitu di Kota Tomohon, biasanya para petani membasmi hama ini dengan menggunakan pestisida. Namun, secara alami pada lokasi ini terdapat musuh alami yang menyerang hama ulat grayak frugiperda (*S. frugiperda*) yaitu jamur yang bersifat entomopatogen. Sampai saat ini belum ada penelitian yang mengidentifikasi spesies jamur entomopatogen tersebut, sehingga penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi jamur entomopatogen isolat Tomohon dari larva *S. frugiperda*.

## **METODE**

### **Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2020 sampai dengan April 2021. Eksplorasi serangga dilakukan di Perkebunan jagung puncak Wawo di Kelurahan Walian, Kecamatan Tomohon Selatan, Kota Tomohon. Isolasi dan identifikasi morfologi jamur dilakukan di Laboratorium Agens Hayati di Balai Perlindungan dan Pengujian Mutu Tanaman Pangan dan Hortikultura (BPPMTPH) Kalasey Provinsi Sulawesi Utara, identifikasi molekuler jamur entomopatogen di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Unsrat.

### **Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan yaitu cawan petri, kawat ose, lampu bunsen, *autoclave*, *hot plate*, laminar, timbangan analitik, botol plastik, *aluminium foil*, kantong plastik kemasan, labu erlenmeyer, baker glass, kulkas, mikroskop, kaca objek, pinset, mikropipet, tabung ependorf, alat PCR, elektroforesis, UV Transminator . Bahan yang digunakan adalah PDA, *chloramphenicol*, aquades steril, alkohol 70%, beras, kapas, tissue, *elution buffer*, *primer forward ITS1*, *primer reverse ITS4*, PCR kit, gel agarose 0,8%, buffer TBA, *ethidium bromide*.

### **Eksplorasi Jamur Entomopatogen**

Pengambilan sampel dilakukan pada tanaman jagung dengan mengumpulkan uret atau larva yang terserang jamur entomopatogen. Larva yang terserang kemudian dimasukkan ke dalam botol plastik sebagai wadah, yang selanjutnya akan dibawa ke Laboratorium Agens Hayati BPPMTPH untuk di isolasi (Arsi et al., 2020).

### **Pembuatan Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)**

PDA di timbang sebanyak 39 gram, lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer steril dan ditambahkan 1000 ml aquades lalu diukur pH  $5,6 \pm 2$ . Media PDA kemudian dipanaskan di atas *hot plate* hingga larut sempurna. Setelah media PDA larut, lalu ditutup dengan menggunakan kapas dan aluminium foil, dan direkatkan dengan karet. Kemudian media PDA dimasukan ke dalam *autoclave* untuk disterilkan pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama kurang lebih 90 menit. Setelah disterilisasi, media PDA disimpan dalam lemari pendingin hingga media berada pada suhu  $45\text{-}50^{\circ}\text{C}$ , setelah itu media PDA dituang ke dalam cawan petri steril sebanyak 15-20 mL dan dibiarkan memadat (Basarang dan Rianto, 2018).

### **Isolasi Uret/larva**

Diambil konidia jamur setebal ujung jarum ose pada permukaan tubuh larva yang telah terinfeksi jamur *M. rileyi*, kemudian diinokulasikan pada media PDA. Selanjutnya diinkubasi pada suhu  $23\text{-}25^{\circ}\text{C}$  hingga jamur tumbuh (Hidayah dan Indrayani, 2011). Media PDA yang telah ditumbuhi kecambah jamur *M. rileyi* dan membentuk koloni siap dimurnikan. Jarum ose dipanaskan di atas lampu bunsen sampai kawat ose terlihat berpijar dan dibiarkan hingga dingin terlebih dahulu 10 detik. Setelah dingin, diambil koloni jamur sebanyak satu “ose” dari tempat pembiakan jamur, lalu digoreskan kedalam media PDA baru. Kemudian cawan petri yang baru diinokulasi ditutup dan diberi label, lalu diinkubasikan kedalam inkubator selama tujuh hari pada suhu  $27^{\circ}\text{C}$ . Koloni jamur yang memiliki ciri-ciri yang berbeda dire-isolasi dan diinokulasikan kembali berulang-ulang hingga diperoleh kultur murni dari jamur *M. rileyi* (Sanjaya et al., 2010).

### **Identifikasi Molekuler Jamur *M. rileyi***

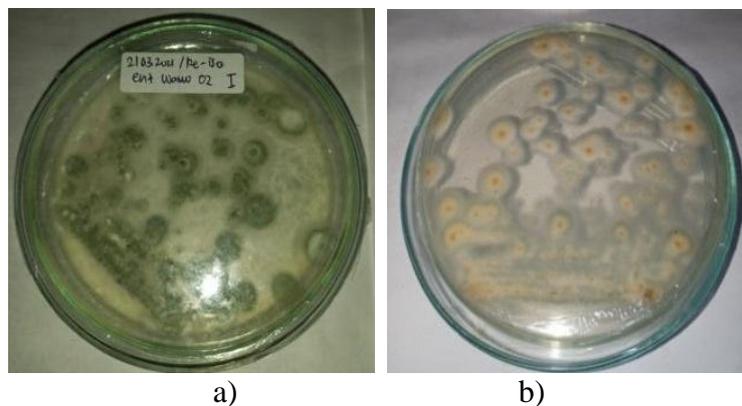
Isolat murni jamur entomopatogen yang didapatkan kemudian dilanjutkan dengan identifikasi molekuler menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Tahap pertama yaitu ekstraksi DNA dengan diekstraksi miselium jamur yang ada ke dalam tabung ependorf, kemudian ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  elution buffer dan di diamkan selama 1 menit. Lalu disentrifugasi 10.000 rpm, dan dihasilkan DNA murni. Tahap yang kedua yaitu amplifikasi DNA menggunakan primer universal dengan diamplifikasi DNA hasil ekstraksi sebanyak 1  $\mu\text{l}$  yang dicampur dengan aquades sebanyak 15  $\mu\text{l}$ , primer forward ITS1 dan primer reverse ITS4 yang masing-masing primer ditambahkan sebanyak 1  $\mu\text{l}$ , dan PCR kit sebanyak 20  $\mu\text{l}$ . Kemudian sampel dimasukkan kedalam alat PCR yang disetting dengan proses denaturasi pada  $95^{\circ}\text{C}$  selama 3 menit; denaturasi  $94^{\circ}\text{C}$  selama 20 detik; annealing pada  $50^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik; ekstensi  $72^{\circ}\text{C}$  selama 20 detik; dan final ekstensi pada  $72^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit. Selanjutnya hasil amplifikasi di elektroforesis dengan gel agarose 0,8% (dalam buffer TBA) yang telah direndam dalam ethidium bromide dengan tegangan 90 V selama 45 menit. Hasil elektroforesis kemudian divisualisasi dengan UV Transminator. Sampel selanjutnya dikirim

ke FirtsBase Malaysia untuk DNA sequencing dan identifikasi molekuler yang dianalisis berdasarkan dengan data dari *GeneBank pada National Center for Biotechnology International* (NCBI) dengan program BLAST (*Basic Local Alignment Tools*). Setelah hasil BLAST diperoleh selanjutnya dilihat sejumlah spesies sebagai acuan persentase similaritas pohon filogenetik yang mendekati 100% dengan menggunakan software MEGA 5.0 (Bintang et al., 2015).

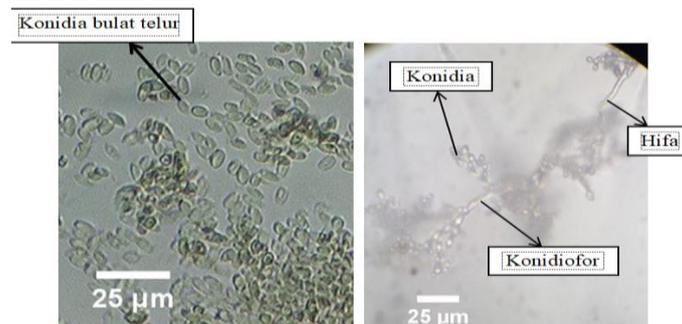
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Identifikasi Morfologi dan Molekuler Jamur *M. rileyi*

Berdasarkan hasil pengamatan ciri-ciri morfologi isolat murni jamur *M. rileyi* yang telah didapatkan, dapat dilihat bentuk morfologi makroskopis dan mikroskopis yang ada pada Gambar 1 dan 2. Ciri-ciri morfologi makroskopis dengan bentuk permukaan koloni yang membulat, dan warna koloni pada fase diawal pertumbuhan vegetatifnya berwarna putih dan saat akan memasuki fase generatif hingga isolat berubah warna menjadi hijau tua. Ciri-ciri ini sesuai dengan ciri khas dari jamur *Metarhizium* yang biasa dikenal sebagai *green muscardine fungus* (Zhang et al., 2016). Pada Gambar 1 juga dapat dilihat bentuk permukaan bawah koloni pada bagian tengah koloni memiliki warna kuning dan pada bagian tepiannya berwarna putih, hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Alvarez et al. (2018) yang menyatakan bahwa pada awal pertumbuhan jamur *M. rileyi* koloni beludru warna putih dengan batas yang tidak beraturan dan berubah dari hijau pucat menjadi hijau perunggu dengan sporulasi dan pada koloni belakang berwarna kuning pucat.



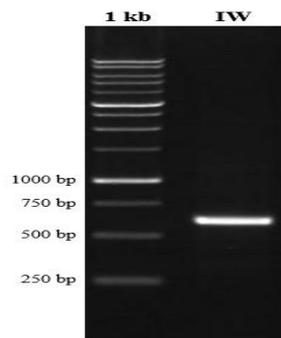
**Gambar 1.** Pengamatan makroskopis a) isolat *M. rileyi* pada permukaan atas cawan, b) isolat *M. rileyi* pada permukaan bawah cawan.



**Gambar 2.** Pengamatan mikroskopis a) konidia dari jamur *M. rileyi*, b) struktur tubuh jamur *M. rileyi* perbesaran 40×

Hasil identifikasi bentuk morfologi mikroskopis jamur *M. rileyi* dapat dilihat pada Gambar 2 yang menunjukkan bahwa ciri-ciri dari jamur *M. rileyi* memiliki bentuk konidia bulat telur, konidiofor lurus dan berseptat, cabang tumbuh di dekat septat, berdinding halus dan hialin. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah di laporkan oleh Alvarez et al. (2018) yaitu struktur vegetatif dan reproduktif yang diamati di bawah mikroskop memiliki ciri-ciri sebagai berikut: hifa hialin sampai sedikit berpigmen, konidiofor dengan dinding licin, lurus dan septate. Cabang yang terbentuk di dekat septa, dengan dua sampai empat phalids, pendek dan bulat, ellipsoidal dan hijau pucat. Untuk kerapatan konidia dari *M. rileyi* berdasarkan hasil perhitungan diperoleh hasil  $1,179 \times 10^9$  konidium/ml. Perbanyak jamur *M. rileyi* pada media beras membutuhkan waktu tiga minggu untuk mendapatkan hasil kerapatan konidia  $10^9$ .

Penentuan spesies jamur hasil eksplorasi dilakukan secara molekuler dengan amplifikasi *polymerase chain reaction* (PCR) yang melewati beberapa tahap dari preparasi sampel, ekstraksi DNA, dan elektroforesis. Hasil dari ekstraksi DNA ini, kemudian diampifikasi dengan PCR menggunakan primer ITS1 (forward) dan ITS4 (reverse). Berdasarkan pengujian DNA menggunakan elektroforesis gel agarosa dengan konsentrasi 0,8% menunjukkan bahwa ekstraksi DNA kromosomal sampel isolat Tomohon berhasil dilakukan dengan baik yaitu dengan adanya fragmen DNA yang terlihat jelas dengan ukuran ampikon antara 500-750 bp (Gambar 3).



**Gambar 3.** Hasil elektroforesis dari PCR isolat *M. rileyi*.

Sekuens:

```

CAACTCCCAAACCCCATGTGAACTTATACCCCTTTTCCTGTIGCCTCGGCGGGTCAT
TTGCCCCGGACCGGGCTCGTCCAGAGCCCGCCCGAAACAGGCGCCCGCCGCGG
GACCGAAACTCTGTATCTCTTAGCCTTGGCACGTCTGAGTGGAATCATAAAAA
ATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC
AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
GAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATT
TCAACCCTCAAGCCCCGCGGTTTGGTGTGGGGGCGGCGATTGTCAGCTGGGC
CGCTCAGGCGGTTCCCTGCGGCGCCGCCCGAAATGAATTGGCGCCCCGTCGC
GGCTCCTCTGCGTAGTAGCAACCTCGCAACAGGAGCGCGGCGCGGCCACTG
CCGTAAAACGCACAACTTCTCAAGAGTTGACCTCGAATCAGGTAG
    
```

**Gambar 4.** Urutan nukleotida hasil sekuens DNA.

Proses amplifikasi akan terjadi perbanyak DNA di daerah tertentu yang akan dibatasi oleh primer. Hasil dari PCR ini yang kemudian akan digunakan pada tahap sekuensing DNA. Produk PCR DNA hasil amplifikasi dengan ITS 1 dan ITS 4 kemudian dikirim ke *First Base Pte. Malaysia* dan data hasil sekuensing divisualisasi dalam perangkat lunak *Geneious*. Hasil dari visualisasi kemudian dipilih segmen DNA yang memiliki kualitas pembacaan yang

terbaik, dapat dilihat pada Gambar 4 urutan nukleotida yang ada selanjutnya dianalisis dengan menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang diakses secara online melalui website NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Hasil dari analisis BLAST menunjukkan bahwa tingkat kesamaan antara urutan nukleotida dari DNA isolat (Gambar 4) dengan urutan nukleotida dari spesies jamur dalam database GeneBank, diperoleh bahwa 100% identitas isolat tersebut termasuk dalam spesies *Metarhizium rileyi* dengan nomor aksesinya yaitu MN907775.

## KESIMPULAN

Jamur entomopatogen yang menyerang larva *S. frugiperda* merupakan spesies *Metarhizium rileyi* memiliki ciri-ciri morfologi makroskopis dengan bentuk permukaan koloni yang membulat, dan warna koloni pada fase diawal pertumbuhan vegetatifnya berwarna putih dan saat akan memasuki fase generatif hingga isolat berubah warna menjadi hijau tua, bentuk konidia bulat telur, konidiofor lurus dan berseptat, cabang tumbuh didekat septat, berdinding halus dan hialin.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alvarez, S.P., Guerrero, A. M., Duarte, B.N.D., Tapia, M.A.M., Medina, C.A.C., and Rodriguez, Y.D. (2018). First Report of a New Isolate of *Metarhizium rileyi* from Maize Fields of Quivican, Cuba. *Indian J Microbiol.* 58(2), 222–226. <https://doi.org/10.1007/s12088-018-0721-5>
- Arsi., Pujiastuti, Y., Kusuma, S.S.H., dan Gunawan, B. (2020). Eksplorasi, Isolasi dan Identifikasi Jamur Entomopatogen yang Menginfeksi Serangga Hama. *Jurnal Proteksi Tanaman Tropis.* 1(2), 70-76. <https://dx.doi.org/10.19184/jptt.v1i2.18554>
- Bagariang, W., Tauruslina, E., Kulsum, U., Murniningtyas PL T., Suyanto, H., Surono., Cahyana, N.A., dan Mahmuda, D. (2020). Efektifitas Insektisida Berbahan Aktif Klorantraniliprol terhadap Larva *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). *Jurnal Proteksi Tanaman.* 4(1), 29-37. <https://dx.doi.org/10.25077/jpt.4.1.29-37.2020>
- Basarang, M., dan Rianto M.R. (2018). Pertumbuhan *Candida* sp. dan *Aspergillus* sp. dari Bilasan Bronkus Penderita Tuberkulosis Paru pada Media Bekatul. *Jurnal Ilmu Alam dan Lingkungan.* 9(18), 74 – 82.
- Bintang, A.S., Wibowo, A., dan Harjaka, T. (2015). Keragaman Genetik *Metarhizium anisopliae* dan Virulensinya Pada Larva Kumbang Badak (*Oryctes rhinoceros*). *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia.* 9(1), 12- 18. <https://doi.org/10.22146/jpti.16015>
- Hidayah, N., dan Indrayani, I.G.A.A. (2011). Pengaruh Komposisi Media Terhadap Pertumbuhan Jamur *Nomuraea Rileyi* (Farlow) Samson dan Patogenisitasnya Pada *Helicoverpa Armigera* Hubner dan *Spodoptera Litura* F. *Jurnal Littri.* 17(3), 102-108. <http://dx.doi.org/10.21082/jlittri.v17n3.2011.102-108>
- Maharani, Y., Dewi, V.K., Puspasari, L.T., Rizkie, L., Hidayat, Y., dan Dono, D. (2019). Kasus Serangan Ulat Grayak Jagung *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) pada Tanaman Jagung di Kabupaten Bandung, Garut dan Sumedang, Jawa Barat. *Jurnal Cropsaver.* 2(1), 38-46.

- Nadrawati, N., Sempurna, B.G., dan Agustin, Z. (2019). Identifikasi Hama Baru dan Musuh Alaminya Pada Tanaman Jagung, Di Kelurahan Sidomulyo, Kecamatan Seluma, Bengkulu. *UNIB Scholar Repository*. 22(2), 184-206.
- Sanjaya, Y., Nurhaeni, H., dan Halima, M. (2010). Isolasi, Identifikasi, Dan Karakterisasi Jamur Entomopatogen Dari Larva Spodoptera Litura (Fabricius). *Bionatura-Jurnal Ilmu-ilmu Hayati dan Fisik*. 12(3), 136-141.
- Subiono, T. (2020). Preferensi *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) pada Beberapa Sumber Pakan. *Jurnal Agroekoteknologi Tropika Lembab*. 2(2),130-134. <https://dx.doi.org/10.35941/jatl.2.2.2020.2813.130-134>
- Zhang, X., Chen, X., Luan, F., He, L., Pu, S., and Li, Z. (2016). Genetic diversity and population structure of the Chinese Fungus *Metarhizium rileyi* causing green muscardine in silkworm. *Journal of Invertebrate Pathology*. 140: 16–24. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2016.08.005>