

## IDENTIFIKASI MOLEKULER CENDAWAN ENTOMOPATOGEN *Beauveria Bassiana* DAN *Metarhizium Anisopliae* ASAL ISOLAT CIANJUR

Disusun oleh :  
Widya Sari\*\*)   
Chindy Nur Rosmeita\*)

### Abstrak

*Beauveria bassiana* dan *Metarhizium anisopliae* merupakan cendawan entomopatogen yang telah banyak dimanfaatkan sebagai agens biokontrol untuk mengendalikan hama serangga. Metode identifikasi organisme sampai tingkat spesies salah satunya dapat melalui identifikasi molekuler. Keberhasilan analisis molekuler dengan teknik PCR bergantung pada kualitas DNA yang diekstraksi. Tujuan penelitian ini adalah menentukan metode ekstraksi yang tepat untuk menghasilkan kemurnian DNA yang tinggi dan mengidentifikasi secara molekuler isolat *B. bassiana* dan *M. anisopliae* asal tanaman padi Cianjur dengan teknik PCR menggunakan primer universal ITS1/ITS4. Penelitian dilaksanakan di Balai Penelitian Tanaman Hias Segunung dari bulan Maret sampai Juli 2019. Isolat yang diidentifikasi merupakan koleksi BPTPH Bojongpicung dan BALITHI Segunung. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan bufer CTAB dan SDS. Isolat cendawan yang diekstraksi menggunakan CTAB menunjukkan kemurnian yang bagus dengan nilai 1.8-2.0 dan isolat hasil ekstraksi dengan SDS menunjukkan kemurnian kurang dari 1.8. Primer ITS1/ITS4 telah berhasil mengamplifikasi daerah *internal transcribed spacer* dari isolat *B. bassiana* pada ukuran 600 bp dan isolat *M. Anisopliae* pada ukuran kisaran 550-600 bp.

Kata kunci: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, CTAB, SDS, ITS1/ITS4.

### Abstrac

*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* are the entomopathogenic fungi that have been utilized as biocontrol agents in controlling the pests. The method of identifying organisms to a level of species can be through molecular identification. The success of molecular analysis with PCR technique depends on the quality of DNA extraction. The purposes of this research were to determined the right extraction method to produce high purity of DNA and identify molecularly the isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae* from Cianjur rice plant with PCR technique using universal primer ITS1/ITS4. The research has been implemented in Balai Penelitian Tanaman Hias Segunung from March to July 2019. The isolates have identified is a collection of BPTPH Bojongpicung and BALITHI Segunung. The DNA extraction was using CTAB and SDS buffer. The isolates have extracted use CTAB buffer showed good purity of DNA with value 1.8-2.0 and isolates the extraction results with SDS buffer showed no good purity was 1.8. Primers ITS1/ITS4 has successfully amplified the internal transcribed spacer region from *B. bassiana* at the size 600 bp and *M. anisopliae* at the size between 550-600 bp.

Keywords: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, CTAB, SDS, ITS1/ITS4.

\*) Alumni Fakultas Sains Terapan UNSUR

\*\*) Dosen Fakultas Sains Terapan UNSUR

## PENDAHULUAN

Cendawan entomopatogen merupakan cendawan penyebab penyakit pada serangga dan menginfeksi secara spesifik terhadap serangga tertentu dengan efek samping dan risiko yang sangat rendah bagi serangga non target (Septiana, 2015). *Beauveria bassiana* dan *Metarhizium anisopliae* adalah jenis cendawan entomopatogen yang telah banyak dimanfaatkan dalam mengendalikan hama.

*B. bassiana* merupakan cendawan yang dapat menginfeksi hama dari Ordo Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera, dan Diptera (Wartono *et al.*, 2016). Serangga yang terinfeksi *B. bassiana* akan mengeras dan mengeluarkan miselium berwarna putih (Suprayogi, 2015) yang memiliki racun *beauvericin* yang berfungsi untuk merusak jaringan tubuh serangga (Ikawati *et al.*, 2017). Toksin yang diproduksi oleh *B. bassiana* antara lain *beauvericin*, *bassianolidae*, *cyclosporine A*, dan *osporein* (Ladja, 2009).

*M. anisopliae* mempunyai kapasitas reproduksi yang tinggi, siklus hidup yang pendek, dapat membentuk spora yang tahan lama di alam meskipun dalam kondisi yang tidak menguntungkan, aman, selektif, mudah diproduksi, dan kecil kemungkinan terjadi resistensi hama (Rustama *et al.*, 2008). *M. anisopliae* mampu menginfeksi hama dari Ordo Coleoptera, Isoptera, Homoptera, Hemiptera, dan Lepidoptera (Strack, 2003 dalam Trizelia *et al.*, 2010) dan memiliki miselium berwarna hijau zaitun yang terlihat dari serangga yang terinfeksi (Aisyah, 2015). Toksin *destruxin* yang dihasilkan oleh *M. anisopliae* berperan sebagai pematah pertahanan serangga inang (Salim dan Hosang, 2013).

Kemampuan cendawan entomopatogen dalam mematikan serangga dipengaruhi oleh karakter fisiologi dan genetik cendawan (Trizelia, 2005). Keragaman genetic dapat dilihat sebagai salah satu yang menguntungkan di dalam pengendalian hayati serangga dan

dapat diteliti menggunakan analisis molekuler. Keberhasilan analisis molekuler dengan teknik PCR bergantung pada kualitas DNA yang diekstraksi dengan berbagai bufer ekstraksi misalnya SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) dan CTAB (*Cetyltrimethylammonium bromide*). Proses identifikasi molekuler diawali dengan ekstraksi DNA, dimana DNA yang digunakan merupakan DNA total yang terbebas dari komponen-komponen penyusun sel. Kemurnian DNA yang dihasilkan mempengaruhi pita DNA yang terbentuk pada proses elektroforesis. Selanjutnya adalah teknik PCR. Aplikasi PCR sudah umum diterapkan dalam bidang penyakit tanaman termasuk untuk cendawan (Nurhasanah, 2012). Maka dari itu perlu dilakukan analisis secara molekuler menggunakan teknik PCR pada cendawan entomopatogen *B. bassiana* dan *M. anisopliae* asal tanaman padi Cianjur. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perbedaan larutan bufer ekstraksi terhadap kemurnian DNA dan mengetahui perbedaan hasil amplifikasi PCR pada isolat cendawan entomopatogen *B. bassiana* dan *M. anisopliae* asal tanaman padi Cianjur.

## METODE PENELITIAN

### Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium milik Balai Penelitian Tanaman Hias Segunung (BALITHI), pada bulan Maret sampai dengan Juli 2019.

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *petridish*, panci, sendok, timbangan ohaus, kaca preparat, sprayer, mortar, pastle, *ice block*, *cool box*, *micropipette*, *micropipettetip*, rak *micropipette*, *microtube* eppendorf 1.5 mL, *microtube* Eppendorf 0.5 mL, rak *microtube*, *waterbath*, *sentrifuge* (Thermo Scientific™), *baker glass*, gelas ukur, labu erlenmeyer, spatula,

parafilm, vortex, timbangan analitik, pH meter, *hotplate*, autoklaf, freezer -20<sup>o</sup> C, *microwave*, PCR *machine* (Sensquest Lab Cycler), NanoPhotometer (Implen), mesin elektroforesis, *geldoc digital imaging system*.

Bahan yang digunakan adalah isolat murni *Beauveria bassiana* asal tanaman padi dan *Metarhizium anisopliae* asal tanaman padi sebagai sampel utama sedangkan *B. bassiana* asal tanaman Pisang dan *M. anisopliae* asal tanaman Jagung sebagai kontrol positif, kentang, *dextrose agar*, antibiotic (Streptomycin), aquades steril, tisu kering, 500 µL bufer ekstraksi CTAB (10% Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB) 10 mL; 0.5 M Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) pH 8.0 2 mL; 1 M Tris-HCl pH 8.0 5 mL; 5 M NaCl 12.6 mL; aquades steril 100 mL; 2-Mercapto Ethanol 1 mL), *Chloroform* : *Isoamyl alcohol* (C : I, 24 : 1, v/v), Isopropanol, etanol 70%, bufer TE (1 M Tris-HCl pH 8.0 1 mL; 0.5 M EDTA 0.2 mL; aquades steril 100 mL), bufer ekstraksi SDS (200 mM Tris-HCl pH 8.5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0.5% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS); aquades steril 100 mL), *Phenol* : *Chloroform* : *Isoamyl alcohol* (P : C : I, 25 : 24 : 1, v/v), amonium asetat, DreamTaq PCR (Thermo Scientific), ddH<sub>2</sub>O (*Nuclease free water*) (Thermo Scientific), marker ukuran 1 kb (Thermo Scientific), ITS1 dan ITS4

(Thermo Scientific), Agarose, TBE 0.5x, *Loading dye* (Thermo Scientific), Nucleic Acid Gel Stain (SMOBIO).

### Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental di Laboratorium BALITHI menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RALF) pada empat cendawan yaitu *B. bassiana* asal Padi, *B. bassiana* asal Pisang, *M. anisopliae* asal Padi dan *M. anisopliae* asal Jagung serta dua jenis bufer ekstraksi yaitu CTAB dan SDS dengan 3 kali ulangan, sehingga terdapat 24 unit percobaan untuk data kuantitatif. Sedangkan data kualitatif menggunakan metode analisis deskriptif.

### Penyiapan Isolat Murni Cendawan Entomopatogen

Isolat cendawan yang digunakan merupakan koleksi Laboratorium Balai Perlindungan Tanaman Pangan dan Hortikultura (BPTPH) Wilayah I Cianjur dan Laboratorium Mikologi Balai Penelitian Tanaman Hias (BALITHI) KP Segunung yang terlihat pada Tabel 1. Isolat hasil koleksi diinokulasikan pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*) kemudian dibiarkan tumbuh selama 2-7 hsi pada suhu 25<sup>o</sup> C sampai tumbuh miselia (Nirmalasari, 2015).

Tabel 1. Isolat cendawan yang digunakan sebagai sampel.

Kode Isolat	Spesies	Asal	Vegetasi	Sumber
BbP	<i>Beauveria bassiana</i>	BPTPH	Padi	Serangga
BbPs	<i>Beauveria bassiana</i>	BALITHI	Pisang	Serangga
MaP	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	BPTPH	Padi	Serangga
MaJg	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	BALITHI	Jagung	Serangga

### Ekstraksi DNA Cendawan

Ekstraksi DNA miselium cendawan yang berumur 4 hsi dilakukan dengan metode Abd-Elsalam et al. (2003) dengan modifikasi. Miselium yang dibiakan pada media PDA sebanyak 0.2 g dikerok menggunakan kaca preparat dengan perlahan agar media tidak terbawa. Miselium dimasukkan kedalam mortar beku kemudian ditambahkan bufer ekstraksi sebanyak 500 µL yang

bufer ekstraksi (CTAB) dan digerus. Hasil gerusan dimasukkan kedalam microtube berukuran 1.5 mL. inkubasi suspensi di waterbath pada suhu 65<sup>o</sup>C selama 60 menit. Suspensi dihomogenasi dengan dibolak-balik secara perlahan selama 10 menit kemudian ditambahkan 500 µL C:I (24:1, v/v) dingin kedalam suspensi dan disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 20 menit pada suhu 4<sup>o</sup>C. supernatan dipindahkan ke microtube

baru selanjutnya tambahkan 1x volume isopropanol dingin dan dikocok secara perlahan. Endapkan pelet DNA dengan sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 20 menit. Supernatant dibuang dan pelet dicuci dengan etanol dingin 70% kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 5 menit. Keringanginkan DNA beberapa menit, lalu DNA dilarutkan dalam 75  $\mu$ L bufer TE 1x dan disimpan pada suhu -20oC untuk mempertahankan kualitas DNA (Porebski et al., 1997).

Ekstraksi DNA dari miselium cendawan yang berumur 4 hsi menggunakan metode Trizelia (2005) dengan modifikasi. Miselium dikerok menggunakan kaca preparat secara perlahan. Miselium sebanyak 50  $\mu$ g dimasukkan kedalam mortar beku kemudian ditambahkan bufer ekstraksi (SDS) sebanyak 500  $\mu$ L. hasil gerusan dimasukkan kedalam microtube 1.5 mL dan dihomogenasi dengan vortex selama 1-2 menit. Suspensi diinkubasi pada suhu 37oC selama 30-40 menit. Kemudian suspensi ditambahkan 1 volume P:C:I (25:24:1) dingin dan divortex. Suspensi disentrifugasi pada kecepatan 11.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4oC. supernatan dipindahkan ke microtube baru dan ditambahkan 1 volume isopropanol dingin kemudian dihomogenasi perlahan. Larutan disentrifugasi pada kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit. Supernatant dibuang dan pelet yang didapatkan dicuci dengan etanol dingin 70%. Etanol dibuang dan pelet dikeringanginkan beberapa menit. Pelet DNA dilarutkan dalam 100  $\mu$ L bufer TE 1x dan disimpan pada suhu - 20oC untuk mempertahankan kualitas DNA (Porebski et al., 1997).

#### **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

DNA hasil ekstraksi diamplifikasi dengan teknik PCR berdasarkan metode White et al., 1990. Proses amplifikasi dilakukan pada mesin PCR (Sensquest Lab Cycler). Amplifikasi

menggunakan primer universal yaitu ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG-3') dan primer ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). Sebanyak 2  $\mu$ L DNA template dimasukan kedalam 25  $\mu$ L larutan campuran PCR yang terdiri atas 12.5  $\mu$ L DreamTaq PCR, 8.5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 1  $\mu$ L primer ITS1, dan 1  $\mu$ L primer ITS4. Proses PCR melalui beberapa tahapan, yaitu predenaturasi pada suhu 95oC selama 5 menit dan sebanyak 30 siklus amplifikasi dengan suhu denaturasi 94oC selama 30 detik, penempelan primer atau annealing  $\mu$ L Nucleic Acid Gel Stain (SMOBIO), agarose dituangkan pada cetakan dengan hole dan didiamkan  $\pm$  30 menit. DNA template sebanyak 7  $\mu$ L dicampurkan dengan 1  $\mu$ L Loading dye. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 75 volt selama 90 menit.

#### **Teknik Pengumpulan Data**

Data kuantitatif yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu hasil perhitungan kemurnian DNA terhadap kontaminan dihitung menggunakan rumus rata-rata, yaitu:

$$R = \frac{J \text{ kemurnian DNA } (U1 + U2 + U \dots)}{J \text{ total jumlah } 2a}$$

Keterangan:

R = Rata-rata

J = Jumlah

U = Ulangan

Data kualitatif dalam penelitian ini menggunakan metode deskriptif dengan mengamati hasil pita DNA yang terbentuk dari proses elektroforesis gel agarose.

#### **Analisis Data dan Pengujian Hipotesis**

Data yang diperoleh diolah menggunakan komputer dengan bantuan software SPSS dan Microsoft Excell. Kemudian data dianalisa dengan ANOVA (*Analysis of Variance*) menggunakan uji lanjut DMRT (Duncan's Multiple Range Test) pada taraf  $\alpha = 5\%$ .

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Kualitas DNA Hasil Ekstraksi**

Kualitas DNA hasil ekstraksi diuji menggunakan NanoPhotometer (Implen) untuk melihat tingkat kemurnian dan konsentrasi DNA. Kontaminasi DNA terhadap RNA dan protein terlihat pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 260 nm dan 280 nm yang terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2 memperlihatkan angka diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata, hal ini menyatakan bahwa jenis cendawan tidak berpengaruh terhadap hasil kemurnian DNA, sedangkan angka diikuti huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata, hal

ini menyatakan bahwa penggunaan larutan bufer ekstraksi yang berbeda yaitu CTAB dan SDS berpengaruh terhadap kemurnian DNA setiap isolat cendawan. Tingkat kemurnian DNA berhubungan dengan kualitas DNA (Hendra dan Pohan, 2009). Kemurnian DNA dinilai berdasarkan hasil perbandingan  $\lambda$ 260/280 (Morin et al., 2010). DNA yang murni memiliki hasil perbandingan  $\lambda$ 260/280 berkisar pada 1.8-2.0 (Sambrook et al., 1989), sedangkan DNA yang terkontaminasi RNA memiliki nilai lebih dari 2.0 dan DNA yang terkontaminasi protein memiliki nilai kurang dari 1.8 (Neil et al., 2011).

Tabel 2. Kemurnian DNA hasil ekstraksi dengan spektrofotometer.

Perlakuan	$\lambda$ 260/280
Jenis Cendawan	
1. BbP	1.92a
2. BbPs	1.88a
3. MaP	1.92a
4. MaJg	1.87a
Metode Ekstraksi	
1. CTAB	2.06a
2. SDS	1.73b
Interkasi	Tidak signifikan

**Keterangan:**

Angka diikuti huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata dan angka diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf  $\alpha = 0.05$  (5%).

DNA isolat CTAB\_Bb, CTAB\_BbPs, dan CTAB\_MaJg dinyatakan memiliki kemurnian baik, karena masuk kedalam rentang nilai 1.8-2.0 (Sambrook et al., 1989). DNA isolat CTAB\_MaP memiliki nilai lebih dari 2.0 yaitu 2.1, yang menunjukkan bahwa DNA terkontaminasi oleh RNA, hal ini disebabkan oleh tidak diberikan penambahan RNase dalam proses ekstraksi DNA. RNase merupakan enzim pendegradasi RNA yang dapat menghilangkan RNA pada larutan DNA (Sambrook et al., 1989).

DNA isolat SDS\_BbP, SDS\_BbPs, SDS\_MaP, dan SDS\_MaJg memiliki nilai kurang dari 1.8, yang menunjukkan bahwa DNA terkontaminasi protein. Hal ini

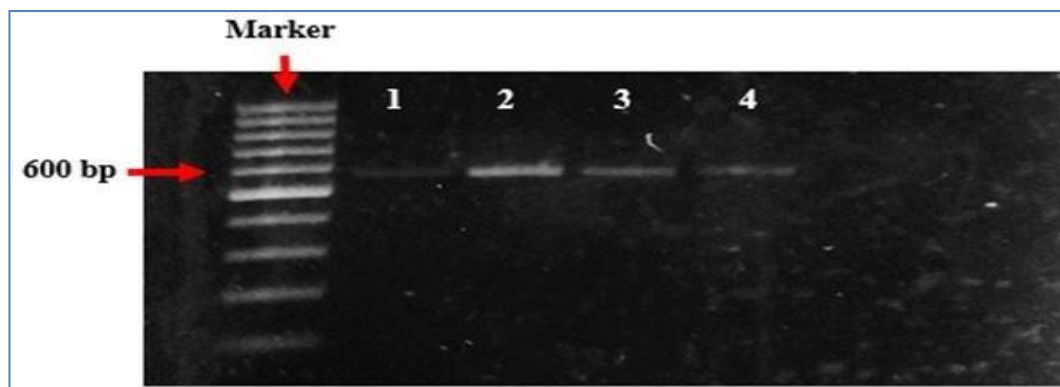
disebabkan oleh tidak diberikan penambahan Proteinase-K yang berfungsi untuk menghilangkan protein dalam larutan (Murtiyaningsih, 2017). Metode SDS Trizelia (2005) menggunakan amonium asetat yang memiliki fungsi yang sama (Aidar, 2007) yaitu berfungsi untuk menghilangkan protein dan kontaminan lain dengan cara dipresipitaskan (Murtiyaningsih, 2017). Namun dalam metode SDS yang digunakan, penambahan amonium asetat tidak cukup efektif menggantikan fungsi Proteinase-K karena tidak dapat mengoptimalkan proses pelisisan sel sehingga menyebabkan kontaminasi protein.

CTAB merupakan metode konvensional yang menghasilkan nilai

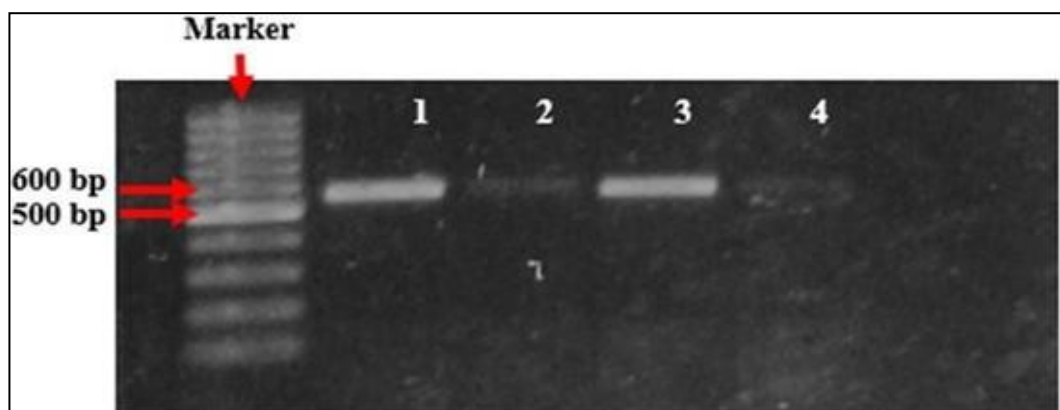
kemurnian bagus dibandingkan dengan SDS, karena CTAB memiliki kekuatan melisis yang kuat (Sambrook et al., 1989). Penambahan larutan 2-mercaptoethanol (2-me) pada bufer CTAB berfungsi sebagai pendegradasi protein (Nugroho et al., 2017), akan tetapi 2-me merupakan larutan yang bersifat korosif terhadap kulit, mudah terbakar, dan mempunyai tingkat toksisitas tinggi bagi penggunaannya (Roth, 2016). Hasil Amplifikasi Cendawan Entomopatogen *Beauveria bassiana* dan *Metarhizium anisopliae*. Pengujian DNA secara kualitatif dilakukan menggunakan elektroforesis gel agarosa dengan konsentrasi agarose sebanyak 1% (30 mL = 0.03 gram). Analisis elektroforesis

bertujuan untuk menentukan keberhasilan ekstraksi DNA. Primer universal yang digunakan, yaitu ITS1 dan ITS4. Primer ITS (Internal Transcribed Spacer) digunakan dalam membedakan kultur-kultur cendawan asal serangga. ITS merupakan daerah yang diusulkan sebagai barcoding cendawan (Schoch et al., 2012).

Gambar 1 dan Gambar 2 menunjukkan bahwa seluruh isolat menghasilkan pita DNA tunggal. Ukuran amplicon primer ITS1/ITS4 berkisar antara 500-600 bp. Primer universal ITS yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA ribosomal dan segala jenis cendawan akan menghasilkan fragmen spesifik dengan ukuran 500-900 bp (Brasileiro et al., 2004).



Gambar 1. Amplifikasi DNA isolat cendawan *Beauveria bassiana*, 1) SDS\_BbP, 2) SDS\_BbPs, 3) CTAB\_BbP, dan 4) CTAB\_BbPs.



Gambar 2. Amplifikasi DNA isolat cendawan *Metarhizium anisopliae*, 1) SDS\_MaP, 2) SDS\_MaJg, 3) CTAB\_MaP, dan 4) CTAB\_MaJg.

Ketebalan masing-masing amplicon bervariasi, hal ini disebabkan konsentrasi DNA yang dihasilkan

berbeda-beda. Ukuran amplicon pada Gambar 1 berada pada kisaran 600 bp untuk *Beauveria bassiana*. Penelitian Kaur

dan Padmaja (2008) menyatakan bahwa pita DNA hasil amplifikasi pada cendawan *B. bassiana* diperoleh pada kisaran 320-2300 bp dan hasil penelitiannya menyatakan bahwa *B. bassiana* teramplifikasi pada 600 bp asal Brazil. Ukuran ampikon Gambar 2 untuk *Metarhizium anisopliae* terbentuk pada kisaran 550-600 bp. Penelitian Destefano et al. (2004) menyatakan bahwa *M. anisopliae* teramplifikasi pada kisaran 540-600 bp. *M. anisopliae* var. *anisopliae* asal Brazil teramplifikasi pada 540 bp dan *M. anisopliae* var. *anisopliae* asal Australia pada 600 bp.

### KESIMPULAN

Hasil ekstraksi DNA menggunakan buffer Cethyltrimethylammonium Bromide (CTAB) efektif untuk isolat CTAB\_BbP, CTAB\_BbPs, dan CTAB\_MaJg karena memiliki kemurnian pada kisaran 1.8-2.0, sedangkan isolat cendawan CTAB\_MaP memiliki nilai kemurnian lebih dari 2.0, yaitu 2.1. semua isolat cendawan yang menggunakan larutan bufer Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) memiliki nilai kemurnian kurang dari 1.8. Interaksi antara jenis cendawan entomopatogen dengan larutan bufer ekstraksi yang berbeda tidak berpengaruh terhadap kemurnian DNA karena hasil kemurnian DNA ditentukan oleh larutan bufer ekstraksi yang digunakan.

Hasil elektroforesis menggunakan primer universal ITS1/ITS4 berhasil membentuk fragmen spesifik pita tinggal DNA. Ampikon isolat cendawan *B. bassiana* teramplifikasi pada kisaran 600 bp, sedangkan *M. anisopliae* berada pada kisaran 550-600 bp.

### DAFTAR PUSTAKA

Abd-Elsalam, K. A, N. A, Ibrahim, M. A, Abdel-Satar, M. S, Khalil dan J. A, Verreet. 2003. PCR Identification of *Fusarium* Genus based on

Nuclear Ribosomal-DNA Sequence Data. *Afr Journal Biotech.* 2(4):82-85.

Aisyah, Bintang S. 2015. Keragaman Genetik *Metarhizium anisopliae* dan Virulensinya pada Larva Kumbang Badak (*Oryctes rhinoceros*). *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia.* 19(1):12-18.

Brasileiro, B. T. R. V, Coimbra, M. R. M., de Morais, Jr. M. A. D., dan Oliveria, N. T. D. 2004. Genetic Variability within *Fusarium sonali* Species as Revealed by PCR-Fingerprinting based on PCR Markers. *Braz J Microbiol.* 35(3):205-210.

Destefano, R. H. R., Destefano, S. A., dan Messias, L. C. 2004. Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within Infected Sugarcane Borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) Using Specific Primers. *Genetics and Molecular Biology.* 27(2):245-252.

Hendra, W. dan Pohan, H. G. 2009. Kajian Teknis Standar Minyak Buah Merah (*Pondanus conoideus* Lam.). *Prosiding PPI Standardisasi.* Jakarta, Indonesia.

Ikawati, B., Marbawati, D., dan Wahyudi, B. F. 2017. Efek *Beauveria bassiana* pada *Anopheles maculatus* Fase Akuatik di Laboratorium. *Buletin Penelitian Kesehatan.* 45(2):137-144.

Ladja, F. T. 2009. Pengaruh Cendawan Entomopatogen *Verticillium lecanii* dan *Beauveria bassiana* terhadap Kemampuan *Nephotettix virescens* (Hemiptera: Cicadellidae) dalam Menularkan Virus Tungro. *Tesis.* Institut Pertanian Bogor. Bogor, Indonesia.

Morin, N., Vallaey, T., Hendrickx, L., Natalie, L., dan Wilmotte, A. 2010. An Efficient DNA Isolation Protocol for Filamentous Cyanobacteria of the Genus

- Arthrospira. *Journal Microbial Methods*. 80(2):148- 154.
- Murtiyaningsih, Hidayah. 2017. Isolasi DNA Genom dan Identifikasi Kekerbatan Genetika Nanas Menggunakan RAPD (Random Amplified Polimeric DNA). *Agritrop*. 15(1):83-93.
- Neil, M. O., McPartlin, J., Arthure, K., Riedel, S., dan McMillan, N. D. 2011. Comparison of the TLDA with the Nanodrop and the Reference Qubit System. *Journal Physics Conference Series*. 307(1):1-6.
- Nirmalasari, Cyntia. 2015. Identifikasi *Beauveria* sp. Asal Situ Gede dengan Analisis Sekuen Internal Transcribed Spacer dan Virulensinya terhadap *Nilaparvata lugens* Stal. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Nugroho, K., Terryana, R., dan Lestari, P. 2017. Metode Ekstraksi DNA Cabai (*Capsicum annum* L.) Menggunakan Modifikasi Bufer CTAB (Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide) Tanpa Nitrogen Cair. *Scripta Biologica*. 4(2):91-94.
- Nurhasanah, Y., S. 2012. Karakterisasi Cendawan Botryodiplodia thebrome dan Rhizoctonia solani dari Berbagai Tanaman Pisang Berdasarkan Morfologi dan Pola RAPD-PCR. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Porebski, S., L. G. Baily, dan B. R. Baum. 1997. Modification of CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components. *Plant Molecular Biology*. 15:8-15.
- Roth. 2016. Lembar Data Keselamatan. 2-Mercaptoethanol. Departement of Health, Safety and Environment. Karlsruhe, Germany.
- Rustama, M. M., Melanie, dan Irawan, B. 2008. Patogenisitas Jamur Entomopatogen *Metarhizium anisopliae* terhadap *Crocidolomia pavonana* fab. dalam Kegiatan Studi Pengendalian Hama Terpadu Tanaman Kubis dengan Menggunakan Agensia Hayati. *Laporan Akhir Peneliti Muda UNPAD Sumber Dana DIP A UNPAD*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Padjajaran. Jatinangor, Indonesia.
- Salim dan Hosang, M. L. A. 2013. Serangan *Oryctes rhinoceros* pada Kelapa Kopyor di Beberapa Sentra Produksi dan Potensi *Metarhizium anisopliae* sebagai Musuh Alami. *Balit Palma*. 14(1):47-53.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., dan Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., dan Huhndorf, A. 2012. Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region as a Universal DNA Barcode Marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. pp 6241-6246.
- Septiana, Eris. 2015. Jamur Entomopatogen: Potensi dan tantangan sebagai insektisida alami terhadap serangga perusak tanaman dan vektor penyakit manusia. *BioTrends*. 1(1):28-32.
- Suprayogi, Marheni. 2015. Uji Efektifitas Jamur Entomopatogen *Beauveria bassiana* dan *Metarhizium anisopliae* terhadap Kepik Hijau (*Nezara vidirula* L.) (Hemiptera ; Pentatomidae) pada Tanaman Kedelai (*Glycine max* L.) di Rumah Kaca. *Jurnal Online Agroteknologi*. 3(1):320-327.
- Trizelia, Syam, U., dan Herawaty, Y. 2010. Virulensi Isolat *Metarhizium* sp yang Berasal dari Beberapa Rizosfer Tanaman Terhadap



- Crocidolomia pavonana Fabricus  
(Lepidoptera: Pyralidae).  
*Manggara*. 10(2):51-56.
- Trizelia. 2005. Cendawan Entomopatogen  
Beauveria bassiana: Keragaman  
Genetik, Karakterisasi Fisiologi  
dan Virulensinya terhadap  
Crocidolomia pavonana.  
*Disertasi*. Institut Pertanian Bogor.  
Bogor, Indonesia.
- Wartono, Nirmala C., dan Suryadi, Y.  
2016. Seleksi Jamur  
Entomopatogen Serangga  
Beauveria spp. Serta Uji  
Potegenisitasnya pada Serangga  
Inang Walang (*Leptocorisa acuta*).  
*Berita Biologi*. 15(2):175-184.