

PROPOSAL
CALL FOR PROPOSAL OPEN INNOVATION BGA

Proteksi sistemik tanaman kelapa sawit (*Alaeis guineensis*) menggunakan jamur endophyte (*Dark Septate Endophyte*) dari seranga ulat api (*Sethosea asigna*)



IKHSAN GUSWENRIVO, Ph.D.

**PUSAT RISET ZOOLOGI TERAPAN
ORGANISASI RISET HAYATI DAN LINGKUNGN
BADAN RISET DAN INOVASI NASIONAL (BRIN)**

**OPEN INOVATION 2025
PT. BUMITAMA GUJAYA AGRO (BGA)
TAHUN 2025**

LEMBAR PENGESAHAN
CALL FOR PROPOSAL OPEN INNOVATION BGA
TAHUN 2025

Judul : Proteksi sistemik tanaman kelapa sawit (*Alaeis guineensis*) menggunakan jamur endophyte (*Dark Septate Endophyte*) dari seranga ulat api (*Sethosea asigna*)

A Data Pengusul/ Ketua Tim

1 Nama Lengkap : Ikhsan Guswenrivo, Ph.D.
 2 NIP : 198108142005021002
 3 Jabatan Fungsional : Peneliti Ahli Utama
 4 Nama Pusat Riset : Pusat Riset Zoologi Terapan
 5 Nama Organisasi Riset : Organisasi Riset Hayati dan Lingkungan
 6 Alamat Kantor : Jalan Raya Jakarta-Bogor Km. 46, Cibinong
 7 No. Telepon : 081310019763
 8 Alamat Surel : ikhsan.guswen@brin.go.id

C Data Kegiatan

1 Identitas Anggota :

No	Nama Anggota	Pusat Riset/ Unit Kerja	Organisasi Riset/ Satuan Kerja
1	Dr. Titik Kartika, M.Agr.	Zoologi Terapan	Hayati dan Lingkungan
2	Dr. Sri Utami, S.P. M.Si.	Zoologi Terapan	Hayati dan Lingkungan
3	Dr. Dodin Koswanudin,	Zoologi Terapan	Hayati dan Lingkungan
4	Wawan, M.Si.	Zoologi Terapan	Hayati dan Lingkungan
5	Hery Widyanto, S.P., M.Si.	Zoologi Terapan	Hayati dan Lingkungan
6	Dita Meisyara, S.Si., M.Sc.	Zoologi Terapan	Hayati dan Lingkungan
7	Dr. Andri Fadillah Martin M.Si.	Rekayasa Genetika	Hayati dan Lingkungan
8	Tirta Kumala Dewi M.Sc.	Mikrobiologi Terapan	Hayati dan Lingkungan
9	Dr. Syahriel bin Abdullah	Universiti Malaysia Sabah	Universiti Malaysia Sabah

D Periode Kegiatan

1 Periode Kegiatan : 3 Tahun
 2 Usulan Riset : Tahun ke 1

E Biaya Kegiatan

- | | | | |
|---|---------------------------|---|-----------------|
| 1 | Biaya Kegiatan Tahun ke-1 | : | Rp. 192.740.000 |
| 2 | Biaya Kegiatan Tahun ke-2 | : | Rp. 125.620.000 |
| 3 | Biaya Kegiatan Tahun ke-3 | : | Rp. 136.320.000 |

Total Ajuan Kegiatan : **Rp. 454.680.000**

**Mengetahui,
Kepala Organisasi Riset
Hayati dan Lingkungan**



TT ELEKTRONIK

**Dr. Andes Hamuraby Rozak M.Sc.
NIP. 198212062006041003**

**Cibinong, 26-02-2025
Ketua Tim Periset**



TT ELEKTRONIK

**Ikhsan Guswenrivo, Ph.D.
NIP. 198108142005021002**

DAFTAR ISI

Halaman Depan	1
Halaman Pengesahan	2
Daftar Isi	4
I. Justifikasi dan Tujuan Penelitian	5
II. Metodologi.....	7
III. Rincian Anggaran Biaya	15
IV. GranChart Kegiatan Penelitian	21
V. Analisa Cost dan Benefit	22
Daftar Pustaka	64

I. Justifikasi dan Tujuan Penelitian

1.1. Latar Belakang

Mikroorganisme yang menguntungkan pada akar tanaman dapat meningkatkan kesehatan tanaman dengan memberikan *priming* pada seluruh tanaman untuk meningkatkan pertahanan terhadap berbagai patogen dan serangga herbivora melalui mekanisme *induces systemic resistance* (ISR) (Pieterse *et al.*, 2014). Jalur hormon dan molekul yang berpartisipasi dalam perekrutan kelompok mikroorganisme tertentu setelah serangan herbivora daun dan stimulasi pertahanan telah dilaporkan (de Roman *et al.*, 2011; Doornbos *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011; Yi *et al.*, 2011; Lakshmanan *et al.*, 2012). Oleh karena itu, interaksi tanaman-mikroba dan tanaman-serangga terhubung melalui jalur molekuler. Induksi jalur sinyal hormon tergantung pada perilaku makan serangga (Pineda *et al.*, 2010). Proses pembentukan senyawa biokimia pada tanaman melalui interaksi antara mikroba seperti jamur endophyte khususnya dark septate endophyte (DSE) hampir terbentuk pada semua tanaman termasuk salah satunya pada tanaman sawit. Kolonisasi jamur endophyt dapat dilihat dari hasil pengamatan secara mikroskopis dan hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya mikoskeloria pada system jaringan akar (Guswenrivo *et al.*, unpublished data). Keberadaan jamur DSE pada system perakaran tanaman dapat membantu pertumbuhan tanaman secara signifikan dan dalam beberapa laporan menunjukkan adanya system kekebalan terhadap serangan penyakit tanaman (Wiwiek *et al.* 2020; Surono and Narisawa 2017).

Salah satu faktor yang mempengaruhi penurunan produksi, produktivitas dan mutu kelapa sawit akibat adanya serangan organisme penggaggu tanaman adalah hama ulat api dari ordo Lepidoptera dan famili Limacodiade. Ulat api adalah salah satu musuh yang sangat ditakuti dalam perkebunan kelapa sawit, karena serangan ulat api akan menurunkan produktivitas tanaman kelapa sawit. Pada tahap pembibitan, serangan ulat api akan berdampak jangka Panjang dan akan mempengaruhi kualitas dan kuantitas produksi dimasa yang akan datang. Berdasarkan hasil pengamatan, serangan ulat api dapat menurunkan produksi sebanyak 25% pada tahun pertama, dan menurunkan produksi sebanyak 50% - 75% pada tahun kedua dan ketiga. Pengendalian yang sekarang diaplikasikan dalam mengendalikan serangan ulat api

adalah memadukan antara pengendalian secara mekanis, biologi dan kimia. Penggunaan pestisida kimia untuk mengendalikan serangan ulat api harus dilakukan secara bijak karena akan mempengaruhi dan berakibat negative terhadap lingkungan. Penelitian ini diusulkan untuk menghasilkan tanaman kelapa sawit yang memiliki system perlindungan diri secara sistemik dengan melakukan interaksi antara tanaman kelapa sawit dengan jamur endophyte (DSE). Keberadaan jamur DSE pada system perakaran tanaman diharapkan mampu memproduksi senyawa metabolit sekunder yang akan menghambat serangan ulat api.

1.2. Perumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah

1. Apakah terjadi interaksi positive antara jamur endophyte dengan tanaman kelapa sawit.
2. Bagaimana pengaruh keberadaan jamur endophyte pada sistematik pertumbuhan tanaman.
3. Apakah interaksi antara jamur endophyte (DSE) dengan tanaman kelapa sawit memproduksi senyawa metabolit sekunder yang mampu mempengaruhi perilaku makan serangga herbivora seperti ulat api.
4. Apakah pemanfaatan jamur endophyte (DSE) mampu memperkuat system kekebalan tanaman sawit dari serangan serangga hama dan mampu meningkatkan hasil produksi buah sawit.

1.3. Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah:

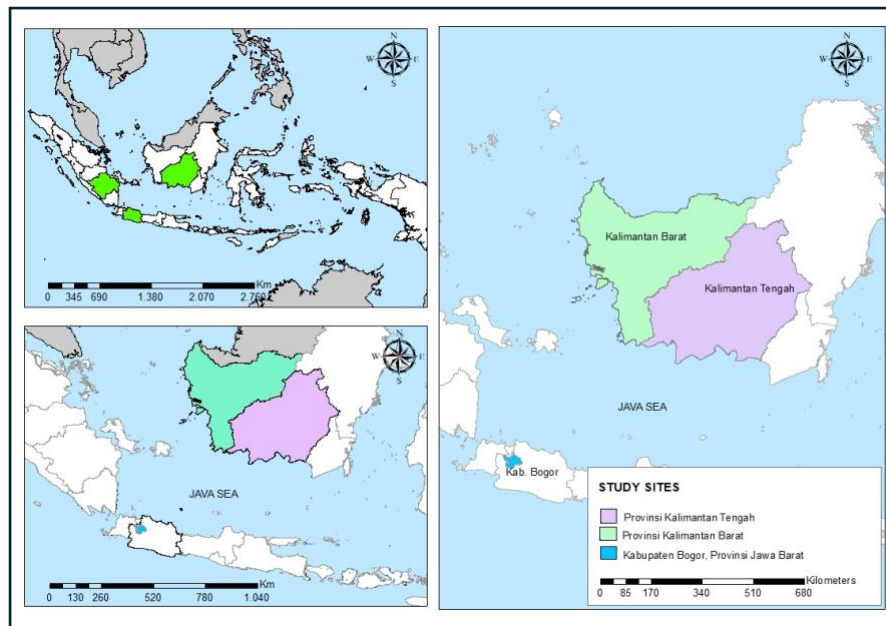
1. Memperoleh jamur endophyte (DSE) yang berasosiasi positive dengan tanaman kelapa sawit.
2. Menghasilkan tanaman sawit yang memiliki system kekebalan sistemik terhadap serangan serangga hama herbivora ulat api.
3. Memperoleh tanaman sawit yang memiliki interaksi positive dengan jamur DSE dan mampu menghasilkan senyawa metoblit penghambat dan/atau mengurangi serangan serangga hama ulat api.

4. Mengurangi penggunaan insektisida kimia dalam mengendalikan erangan ulat api pada lahan perkebunan kelapa sawit.

II. Metodologi

Lokasi penelitian

Kegiatan rearing dan perbanyak ulat api akan dilakukan di laboratotium serangga yang terletak di Kawasan Sains Teknologi (KST) Soekarno, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong, Bogor, Jawa Barat. Deteksi marka genetik sifat pertumbuhan akan dilakukan di Laboratorium Genomik serangga dan Laboratorium Serangga yang terletak di KST Soekarno. Pengambilan sampel dan uji lapangan akan dilakukan pada area pertanaman kelapa sawit milik PT. Bumitama Gunajaya Agro yang terletak di Kalimantan Tengah dan Kalimantan Barat.



Gambar 1. Peta lokasi penelitian

Rearing Ulat Api

Ulat api (*Sethosea asigna*) dikumpulkan dari perkebunan kelapa sawit dan dibawa ke laboratorium untuk di pelihara. Pemeliharaan dilakukan didalam kandang ulat

dengan ruangan terkontrol (suhu +25 °C dengan kelembaban 70%). Daun kelapa atau daun sawit diberikan sebagai umpan makanan ulat.

Isolasi dan Identifikasi Jamur DSE

Pertama, dipilih akar tanaman sawit yang sehat. Dibersihkan menggunakan sabun pada air mengalir sampai bersih dari tanah dan lemak, kemudian dikeringkan menggunakan tisu steril. Setelah itu, dilakukan perendaman menggunakan larutan alkohol 70% selama 5 menit dilanjutkan dengan perendaman dengan larutan kloroks 5% selama 5 menit. Selanjutnya dicuci akar tersebut menggunakan air steril sebanyak 3 kali pengulangan. Akar yang sudah steril dikeringkan dengan dibalut menggunakan tisu steril dan dibiarkan kering selama 5 jam sampai semalaman pada suhu ruang. Untuk pembuatan kontrol negatif, air bekas cucian akar pada pengulangan yang ketiga diambil sebanyak 200 µl menggunakan mikropipet, dan disebar pada medium PDA dan Water Agar kemudian di inkubasi pada suhu ruang. Semua perlakuan tersebut dilakukan didalam Laminar Bench supaya suasana steril.

Disiapkan medium PDA dan WA steril yang sudah dituangkan ke dalam cawan petri dan sudah memadat. Setelah dilakukan sterilisasi permukaan dan sudah didiamkan selama 5 jam sampai sehabis, kemudian akar dipotong sepanjang 5 mm menggunakan gunting steril. Setelah dipotong, ditanam pada medium PDA dan WA dalam cawan petri. Masing-masing cawan petri, terdapat 4 potongan akar dan diberi jarak masing-masing akar. Setelah itu, pinggiran cawan petri direkatkan dengan parafilm atau *plastic wrap* dan diberi label. Kemudian, disimpan di inkubator selama 7-14 hari. Semua perlakuan dilakukan didalam *Laminar Bench* agar suasana steril.

Permurnian kandidat jamur DSE dilakukan terhadap koloni jamur yang tumbuh diantara yang lain dengan ciri morfologi jamur DSE salah satunya warna dan bentuk koloni yang gelap. Masing-masing kandidat jamur DSE tersebut diambil dan dipisahkan dengan cara diinokulasikan menggunakan ose tusuk steril kemudian ditanam ke medium PDA dan OMA, setelah itu diinkubasi pada inkubator jamur. Jika jamur tersebut masih tercampur dengan jamur lain atau terkontaminasi oleh bakteri maka terus dilakukan permurnian (sampai mendapatkan koloni tunggal).

Identifikasi Makroskopis: Kultur murni isolat jamur DSE hasil isolasi, selanjutnya dilakukan identifikasi secara makroskopis melalui pengamatan koloni yang memuat warna dan bentuk koloni. Untuk keterangan lebih jelasnya dapat menggunakan buku identifikasi jamur atau dibandingkan dengan hasil literatur.

Identifikasi Mikroskopis: Pertama, dimasukkan batang segitiga dan kertas saring Whatman No. 42 ke dalam cawan petri. Kemudian, diletakkan *glass object* beserta *cover glass* dan dibungkus dengan plastik tahan panas kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf. Setelah steril, disiapkan medium PDA yang sudah memadat pada cawan petri dan dipotong dengan ukuran 0,5x0,5 – 1x1 cm (ukurannya lebih kecil dari *cover glass*) menggunakan *scalpel*. Potongan blok agar PDA diletakkan di atas *glass object*. Miselium jamur DSE diambil menggunakan ose tusuk steril kemudian diinokulasikan dibagian pinggir blok agar PDA. Setelah itu, ditutup menggunakan *cover glass* dan ditetesi akuades pada kertas saring. Direkatkan cawan petri menggunakan *plastic wrap* serta diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang. Setelah diinkubasi, coverglass berisi miselium jamur DSE diamati menggunakan mikroskop. Semua rangkaian tersebut dilakukan secara aseptis di *Laminar Bench*

Identifikasi Molekuler

Ekstraksi DNA genom jamur DSE dilakukan berdasarkan Widowati *dkk.*, (2016) dengan sedikit modifikasi. Pertama, isolat jamur DSE ditumbuhkan dalam medium cair *Potato Dextrose Broth* (PDB) dan diinkubasi pada suhu kamar selama 72 jam. Miselium yang terbentuk di permukaan media dipanen dan dimasukkan ke dalam mortar yang sudah disterilkan, lalu digerus dengan alu yang sudah disterilkan. Miselium jamur yang telah dihancurkan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 mL dan ditambahkan 300 μ L reagen I dari DNA Extraction Kit Phytopure dan dicampur. RNase diambil dari lemari es dan diinkubasi dalam penangas air dengan suhu 37 °C. Sebanyak 3 μ L RNase ditambahkan ke dalam eppendorf. Homogenkan dengan mengocoknya kemudian diinkubasi ke dalam penangas air dengan suhu 37 °C selama 30 menit. 200 μ L reagen II dari DNA Extraction Kit Phytopure ditambahkan ke dalam eppendorf dan dikocok kembali hingga homogen. Eppendorf

diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit sebelum diinkubasi dalam es selama 20 menit. 200 µL kloroform ditambahkan ke dalam eppendorf dilanjutkan dengan menambahkan 250 µL fenol ke dalam eppendorf dan dihomogenkan selama 10 menit. Eppendorf dimasukkan ke dalam sentrifugal dengan kecepatan 13.500 rpm selama 10 menit dengan suhu 4 °C. Setelah itu, terbentuk tiga lapis supernatan. Supernatan paling atas yang terbentuk diambil dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 µL yang baru. Isopropanol ditambahkan ke dalam tabung eppendorf dengan volume setengah dari volume supernatan yang diambil dan dicampur. Tabung eppendorf dimasukkan ke dalam sentrifugal dengan kecepatan 13.500 rpm selama 10 menit dengan suhu 4 °C dan supernatan dibuang. Ditambahkan 50 µL etanol dan dimasukkan kembali ke dalam sentrifugal. Setelah itu buang supernatannya dan dikeringkan selama kurang lebih 30 menit dan ditambahkan 50 µL *Nuclease Free Water* (NFW). Ekstrak DNA genom akhir dimasukkan ke dalam spektrofotometer Nanodrop untuk diukur konsentrasi DNA.

Amplifikasi PCR dilakukan dengan menggunakan primer ITS 4: 5' -- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -- 3' sebagai reverse primer dan ITS 5: 5' -- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G -- 3' sebagai forward primer. Panjang hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ITS 4 dan ITS 5 berkisar antara 563-602 pasangan basa (bp) (White *et al.*, 1990; O'Donnell, 1993). Komponen yang digunakan untuk amplifikasi rDNA ITS adalah:

Tabel 2. Campuran PCR untuk Amplifikasi rDNA ITS

Komponen	Volume
Bioneer Premix	5 µg
<i>Nuclease Free Water</i> (NFW)	15 µL
ITS 4	2 µL
ITS 5	2 µL
Sampel DNA	1 µL
Total volume	25 µL

Semua komponen PCR ini dimasukkan ke dalam tabung PCR. Tabung PCR diputar kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR dengan ketentuan sebagai berikut: predenaturasi pada suhu 95 °C selama 15 menit, denaturasi pada suhu 95 °C selama 30 detik - 1 menit, annealing pada suhu 55 °C selama 30 detik, ekstensi pada suhu 72 °C selama 30 detik, dan ekstensi terakhir pada 72 °C selama 10 menit. Amplifikasi diatur selama 35 siklus. Sampel hasil PCR diambil sebanyak 1,5 µL dan dimasukkan ke dalam sumuran gel agarosa 1% (g/v) dengan TAE 1,5% (v/v) dan dilanjutkan dengan proses elektroforesis selama kurang lebih 20 menit pada tegangan 110 Volt. Tangga atau pita DNA akan terbentuk. Gel agarosa direndam dalam etidium bromida untuk mewarnai DNA selama 15 menit. Gel agarosa dibilas dengan TAE dan dilihat di Gel Doc. DNA yang telah diamplifikasi dianalisis urutan basa nukleotida yang dipotong dan dikumpulkan dengan aplikasi BioEdit. Data sekuens yang telah diolah dengan BioEdit dimasukkan ke dalam BLAST dan dibandingkan dengan data genom yang telah didaftarkan sebelumnya di *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) untuk menentukan takson atau spesies jamur DSE yang memiliki kemiripan hubungan tertinggi dan terdekat berdasarkan molekuler. Terakhir, membentuk pohon filogenetik berdasarkan data sekuens menggunakan metode Neighbor-Joining.

Uji Patogenisitas jamur DSE terhadap Tanaman

Uji In Vitro: Jamur DSE dilakukan perbanyakan dengan menginokulasikan miselium jamur DSE menggunakan jarum ose pada medium OMA di cawan petri ukuran 5x5 cm, setelah itu diinkubasi selama 7-14 hari pada suhu ruang. Selanjutnya dilakukan menumbuhkan kecambah benih sawit. Pertama-tama, disiapkan benih sawit dan dilakukan sterilisasi permukaan. Benih dilakukan perendaman menggunakan alkohol 70% selama 5 menit dilanjut dengan perendaman dengan kloroks 5% selama 5 menit. Dicuci benih tersebut menggunakan air steril sebanyak 3x pengulangan. Benih yang sudah steril dikeringkan dengan dibalut menggunakan tisu steril dan dibiarkan kering selama 5 jam sampai semalaman pada suhu ruang. Setelah kering, ditanam pada medium WA menggunakan pinset steril dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang. Setelah jamur DSE dan kecambah tumbuh, maka dipindahkan kecambah sawit

(beserta mediumnya) ke medium OMA yang sudah dikolonisasi jamur DSE. Kemudian dimasukkan kedalam botol dengan posisi terbalik dan diinkubasi selama 3 minggu. Untuk perlakuan kontrol, dipindahkan kecambah pada medium OMA tanpa jamur DSE. Semua perlakuan dilakukan dengan 3 pengulangan.

Analisa Kolonisasi Jamur DSE pada Akar Tanaman

Akar yang diduga sudah terkolonisasi oleh jamur DSE dicuci menggunakan air mengalir dan dipotong kecil-kecil. Direndam potongan akar tersebut dalam larutan KOH 10% 5 menit sampai bersih kemudian direndam dalam pewarna *Triphan Blue* selama 5 menit. Setelah itu, akar disimpan dalam cairan Gliserol dan dilakukan pengamatan menggunakan SEM (*Scanning Electron Microscope*).

Analisi Senyawa Metabolit Sekunder

Pendeteksian senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh jamur DSE dianalisis dengan menggunakan alat Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry (Py-GCMS). Strain DSE yang pilihan ditumbuhkan diatas media Potato Dextrise Broth (PDB). Lima balok kecil agar yang mengandung miselia jamur DSE kemudian di masukkan kedalam 10 mL media PDB. Kultur kemudian di inkubasi selama 14 hari dengan incubator shaker berkecepatan 150 rpm suhu 28 °C. Setelah 14 hari, filtrat kultur dipisahkan dari miselia menggunakan kertas saring Whatman No 1. Filtrat kemudian di sentrifugasi pada 5,000 rpm selama 20 menit kemudian supernatant diekstrak menggunakan methanol. Zat yang di ekstrak kemudian di analisis menggunakan Py-GCMS.

Aplikasi Jamur DSE

Pertama, dilakukan perbanyakan jamur DSE pada medium PDB. Dimasukkan medium PDB steril sebanyak 150 ml ke Erlenmeyer berukuran 300 ml (masing-masing isolat DSE sebanyak 5 erlenmeyer) kemudian diinokulasikan miselium jamur DSE menggunakan jarum ose. Setelah itu, Erlenmeyer tersebut diinkubasi pada orbital shaker dengan suhu ruang dan kecepatan 120 rpm selama 7-14 hari. Setelah miselium tumbuh dengan banyak, maka dibuang medium PDB dan dikumpulkan masing-masing miselium jamur DSE kemudian dihaluskan

menggunakan blender laboratorium. Setelah halus, maka disimpan dalam cawan petri steril.

Kedua, disiapkan tanah dan kompos untuk pembuatan media tanam. Campurkan tanah dan kompos dengan perbandingan 1:1 dan dilakukan sterilisasi sebanyak 2 kali. Tanah disterilisasi menggunakan autoklaf selama 30 menit kemudian didiamkan selama 24 jam dan disterilisasi kembali menggunakan autoklaf selama 30 menit. Setelah itu disiapkan seeding tray dan dimasukkan tanah tersebut sebanyak 20 gr pada masing-masing lubang *seeding tray*. Setelah itu, tanah tersebut dicampurkan dengan 5% miselium jamur DSE yang sudah dihaluskan dan diinkubasi selama 7 hari.

Ketiga, menumbuhkan benih sawit. Pertama-tama, disiapkan benih sawit dan dilakukan sterilisasi permukaan. Benih dilakukan perendaman menggunakan alkohol 70% selama 5 menit dilanjutkan dengan perendaman dengan kloroks 5% selama 5 menit. Dicuci benih tersebut menggunakan air steril sebanyak 3x pengulangan. Benih yang sudah steril dikeringkan dengan dibalut menggunakan tisu steril dan dibiarkan kering selama 5 jam sampai semalaman pada suhu ruang. Setelah kering, ditanam pada medium WA menggunakan pinset steril dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang. Setelah jamur DSE dan kecambah tumbuh, maka ditanam pada media tanah di *seeding tray* dan disiram dengan rutin. Waktu perlakuan uji ini selama 4 minggu. Untuk perlakuan kontrol, dipindahkan kecambah pada tanah tanpa jamur DSE. Semua perlakuan dilakukan dengan 3 pengulangan.

Perbanyak Ulat Api secara laboratorium

Kumpulkan ulat api dari lokasi perkebunan kelapa sawit di Kalimantan Barat dan Kalimantan Tengah. Pilih ulat api yang berada pada tahap instar tertentu yang sudah cukup besar untuk berkembang biak dengan baik. Masukkan ulat yang dikumpulkan ke dalam kotak yang telah disiapkan. Berikan daun kelapa sawit atau daun kelapa muda sebagai umpan utama. Gantilah umpan tersebut secara rutin agar ulat tetap mendapat nutrisi yang optimal. Pemantauan kondisi lingkungan, suhu dan kelembapan dilakukan untuk menjaga kestabilan agar ulat dapat berkembang dengan baik. Pisahkan ulat dari kotoran atau pupuk yang ada di dalam kandang agar

kebersihan tetap terjaga dan ulat tidak terinfeksi patogen. Ulat yang siap berkembang biak atau telah mencapai tahap dewasa dapat dipisahkan untuk proses seleksi atau rekayasa genetika. Setelah melalui beberapa siklus perbanyakan, ulat yang telah berkembang biak dapat digunakan untuk penelitian atau perbanyakan lebih lanjut. Simpan ulat dalam kondisi yang sesuai, pastikan ruang penyimpanan tetap terkontrol dalam hal suhu dan kelembapan.

Uji Bioasay terhadap Ulat Api

Pisahkan ulat api berdasarkan tahap perkembangan (larva, instar pertama atau kedua). Pastikan ulat dalam kondisi sehat dan aktif, serta memiliki ukuran yang seragam agar hasil pengujian lebih konsisten. Potong daun kelapa sawit menjadi potongan kecil yang cukup untuk diberikan kepada ulat api. Daun ditimbang sebanyak 10 gram untuk setiap kelompok pengujian, dengan menggunakan 10 ekor ulat api untuk setiap kelompok ulangan. Tempatkan potongan daun kelapa sawit dalam wadah yang sesuai dan berikan kepada kelompok ulat api sesuai perlakuan yang telah disusun. Simpan wadah berisi ulat api di tempat yang terkontrol. Pengamatan dilakukan setiap hari untuk mencatat jumlah daun yang dimakan oleh ulat, serta perkembangan ulat, tingkat kematian. Pengamatan dilakukan selama 14 hari.

Uji Semi Lapangan dan Lapangan

Jamur DSE yang sudah teruji secara laboratorium, di campurkan dengan media tanah, kemudian dilakukan pengujian penanaman sawit dengan menggunakan media tanah yang sudah terkolonisasi dengan jamur DSE secara rumah kaca dan pada lapangan. Pengujian ketahanan terhadap ulat api dilakukan pada setiap tanaman sawit yang ditanam didalam rumah kaca, dengan melepaskan ulat sawit disetiap tanaman sawit yang di tumbuhkan pada media tanah yang mengandung jamur DSE. Tanaman yang diinfeksi dengan ulat api, disungkup untuk menghindari ulat api yang hilang, terlepas dan mengurangi bias pengamatan.

III. Rincian Anggaran dan Biaya

Tabel berikut akan merinci penggunaan pendanaan yang diusulkan.

Tahun I

Komponen Biaya	Volume		Harga Satuan (Rp)	Jumlah (Volume x Satuan) (Rp)
>>Gaji/Upah				
Tenaga lapangan (1 orang x 100 hari)	100	hari	80.000	8.000.000
	Subtotal			8.000.000
Komponen Biaya	Volume		Harga Satuan (Rp)	Jumlah (Volume x Satuan) (Rp)
>>Bahan aus laboratorium				
180947 alginic acid sodium salt (Sigma Aldrich, 500 g)	1	Botol	4.970.000	4.970.000
Potato Dextrose Broth (Difco, 500 g)	2	Botol	3.000.000	6.000.000
filter paper whatman no. 1 diameter 9 cm	5	pak	300.000	1.500.000
filter paper whatman no. 1 diam 16 cm	5	pak	300.000	1.500.000
Humic Acid Sigma Aldrich	1	10 g	2.630.000	2.630.000
Haemocytometer	2	buah	1.000.000	2.000.000
Yeast extract (Difco, 500 g)	2	Botol	2.700.000	5.400.000
Potato Dextrose Agar (Merck, 500g)	4	Botol	2.500.000	10.000.000
Oatmeal agar	2	250 g	4.390.000	8.780.000
Corn Meal Agar (Himedia, 500 g)	2	500 g	1.800.000	3.600.000
Antibiotik chloramfenikol 250 mg	5	strip	10.000	50.000
NaOH, Merck	1	500 g	450.000	450.000
HCl Pro Analysis 37%, Merck	1	250 mL	300.000	300.000
Thermo Scientific Nalgene™ Sterile PES Syringe Filters with Blue Ring; 25mm Diameter	1	pack	3.930.000	3.930.000
Alkohol teknis 70% (20 liter)	1	Jerigen	400.000	400.000
Spirtus (20 L)	2	Jerigen	350.000	700.000
Bunsen kaca	5	buah	50.000	250.000
Kontainer plastik ukuran 80 L	6	buah	250.000	1.500.000

Parafilm	4	buah	650.000	2.600.000
Aluminium foil	5	buah	30.000	150.000
Plastik tahan panas (2 kg)	25	pak	25.000	625.000
Petri dish disposable	4	box	1.500.000	6.000.000
Plastik tahan panas (1 kg)	25	pak	15.000	375.000
Masker	6	Pak	60.000	360.000
Sarung tangan nitril ukuran L	6	Pak	65.000	390.000
Sarung tangan nitril ukuran S	6	Pak	65.000	390.000
Tissu	10	buah	300.000	3.000.000
Kertas Sinar Dunia A4 80 gram	2	rim	35.000	70.000
Centrifuge tube 1,5 ml	4	500 g	250.000	1.000.000
PCR Tubes 0,2 mL thin wall flat cap	4	pack	450.000	1.800.000
Plastik ziplock 15x30 cm	5	200 g	10.000	50.000
Methanol GR 2.5 L (AR) MERCK	2	2.5 L	395.000	790.000
Primer	30	tube	270.000	8.100.000
Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit (50 preps) Brand Zymo	2	unit	5.000.000	10.000.000
10 mM dNTP mix	1	unit	1.700.000	1.700.000
100 bp DNA Ladder	1	unit	1.600.000	1.600.000
1 kb DNA Ladder	1	unit	1.100.000	1.100.000
PCR Work Up rack, PP, 4 pcs/pckg	1	unit	800.000	800.000
White tips (0.5 - 10 µL)	2	bks	600.000	1.200.000
Yellow tips 200 ul	2	bks	400.000	800.000
Blue tips 1000 ul,	2	bks	370.000	740.000
Microtube rack, hold 80 x 1.5/2.0 ml 1	2	unit	370.000	740.000
BugDorm-5002 Insect Rearing Box with Nylon Screen Port	30	unit	200.000	6.000.000
BugDorm-5003 Insect Rearing Box with Wire Screen Port	30	unit	250.000	7.500.000
	Subtotal			111.840.000
>>Pengujian dan Sewa				
Biaya analisis sekuensing	50	paket	250.000	12.500.000
	Subtotal			12.500.000
Komponen Biaya	Volume		Harga Satuan (Rp)	Jumlah (Volume x Satuan) (Rp)
>>Perjalanan dalam rangka survey dan pengambilan bahan				
Kalimantan Tengah				

Transport PP Cibinong-Soetta	4	OK	400.000	1.600.000
Tiket PP Jakarta-Palangkaraya	4	OK	3.000.000	12.000.000
Uang Harian (4 Org x 5 hari)	20	OH	360.000	7.200.000
Penginapan (4 Org x 4 Hari)	16	OH	650.000	10.400.000
Subtotal				31.200.000
Kalimantan Barat				
Transport PP Cibinong-Soetta	4	OK	400.000	1.600.000
Tiket PP Jakarta-Pontianak	4	OK	3.000.000	12.000.000
Uang Harian (4 Org x 5 hari)	20	OH	380.000	7.600.000
Penginapan (4 Org x 4 Hari)	16	OH	500.000	8.000.000
Subtotal				29.200.000
Total				192.740.000

Tahun II

Komponen Biaya	Volume		Harga Satuan (Rp)	Jumlah (Volume x Satuan) (Rp)
>>Gaji/Upah				
Tenaga lapangan (1 orang x 200 hari)	200	hari	80.000	16.000.000
	Subtotal			16.000.000
Komponen Biaya	Volume		Harga Satuan (Rp)	Jumlah (Volume x Satuan) (Rp)
>>Bahan aus laboratorium				
Benih sawit	5	paket	250.000	1.250.000
Polybag 60x60 cm	5	pack	30.000	150.000
Polybag 20x20 cm	5	pack	15.000	75.000
Sekop taman 3 pcs gardentools bestguard	5	unit	40.000	200.000
Pupuk organik	10	pak	10.200	102.000
Sarung tangan kain bintik	2	lusin	30.000	60.000
Tray benih 10 lubang	10	pcs	9.500	95.000
Media tanam	50	karung	20.000	1.000.000
180947 alginic acid sodium salt (Sigma Aldrich, 500 g)	1	Botol	4.970.000	4.970.000

Potato Dextrose Broth (Difco, 500 g)	2	Botol	3.000.000	6.000.000
filter paper whatman no. 1 diameter 9 cm	5	pak	300.000	1.500.000
filter paper whatman no. 1 diam 16 cm	5	pak	300.000	1.500.000
Humic Acid Sigma Aldrich	1	10 g	2.630.000	2.630.000
Haemocytometer	2	buah	1.000.000	2.000.000
Yeast extract (Difco, 500 g)	2	Botol	2.700.000	5.400.000
Potato Dextrose Agar (Merck, 500g)	4	Botol	2.500.000	10.000.000
Oatmeal agar	2	250 g	4.390.000	8.780.000
Corn Meal Agar (Himedia, 500 g)	2	500 g	1.800.000	3.600.000
Antibiotik chloramfenikol 250 mg	5	strip	10.000	50.000
NaOH, Merck	1	500 g	450.000	450.000
HCl Pro Analysis 37%, Merck	1	250 mL	300.000	300.000
Thermo Scientific Nalgene™ Sterile PES Syringe Filters with Blue Ring; 25mm Diameter	1	pack	3.930.000	3.930.000
Alkohol teknis 70% (20 liter)	1	Jerigen	400.000	400.000
Spirtus (20 L)	2	Jerigen	350.000	700.000
Bunsen kaca	5	buah	50.000	250.000
Kontainer plastik ukuran 80 L	6	buah	250.000	1.500.000
Parafilm	4	buah	650.000	2.600.000
Aluminium foil	5	buah	30.000	150.000
Plastik tahan panas (2 kg)	25	pak	25.000	625.000
Petri dish disposable	4	box	1.500.000	6.000.000
Plastik tahan panas (1 kg)	25	pak	15.000	375.000
Masker	6	Pak	60.000	360.000
Sarung tangan nitril ukuran L	6	Pak	65.000	390.000
Sarung tangan nitril ukuran S	6	Pak	65.000	390.000
Tissu	10	buah	300.000	3.000.000
Kertas Sinar Dunia A4 80 gram	2	rim	35.000	70.000
Subtotal				67.920.000
>>Pengujian dan Sewa				
Biaya analisis sekuensing	50	paket	250.000	12.500.000
Subtotal				12.500.000

Komponen Biaya	Volume		Harga Satuan (Rp)	Jumlah (Volume x Satuan) (Rp)
>>Perjalanan dalam rangka survey dan pengambilan bahan				
Kalimantan Barat				
Transport PP Cibinong-Soetta	4	OK	400.000	1.600.000
Tiket PP Jakarta-Pontianak	4	OK	3.000.000	12.000.000
Uang Harian (4 Org x 5 hari)	20	OH	380.000	7.600.000
Penginapan (4 Org x 4 Hari)	16	OH	500.000	8.000.000
	Subtotal			29.200.000
Total				125.620.000

Tahun III

Komponen Biaya	Volume		Harga Satuan (Rp)	Jumlah (Volume x Satuan) (Rp)
>>Gaji/Upah				
Tenaga lapangan (1 orang x 100 hari)	100	hari	80.000	8.000.000
	Subtotal			8.000.000
Komponen Biaya	Volume		Harga Satuan (Rp)	Jumlah (Volume x Satuan) (Rp)
>>Bahan aus laboratorium				
180947 alginic acid sodium salt (Sigma Aldrich, 500 g)	1	Botol	4.970.000	4.970.000
Potato Dextrose Broth (Difco, 500 g)	2	Botol	3.000.000	6.000.000
filter paper whatman no. 1 diameter 9 cm	5	pak	300.000	1.500.000
filter paper whatman no. 1 diam 16 cm	5	pak	300.000	1.500.000
Humic Acid Sigma Aldrich	1	10 g	2.630.000	2.630.000
Haemocytometer	2	buah	1.000.000	2.000.000
Yeast extract (Difco, 500 g)	2	Botol	2.700.000	5.400.000
Potato Dextrose Agar (Merck, 500g)	4	Botol	2.500.000	10.000.000

Oatmeal agar	2	250 g	4.390.000	8.780.000
Corn Meal Agar (Himedia, 500 g)	2	500 g	1.800.000	3.600.000
Antibiotik chloramfenikol 250 mg	5	strip	10.000	50.000
NaOH, Merck	1	500 g	450.000	450.000
HCl Pro Analysis 37%, Merck	1	250 mL	300.000	300.000
Thermo Scientific Nalgene™ Sterile PES Syringe Filters with Blue Ring; 25mm Diameter	1	pack	3.930.000	3.930.000
Alkohol teknis 70% (20 liter)	1	Jerigen	400.000	400.000
Spirtus (20 L)	2	Jerigen	350.000	700.000
Bunsen kaca	5	buah	50.000	250.000
Kontainer plastik ukuran 80 L	6	buah	250.000	1.500.000
Parafilm	4	buah	650.000	2.600.000
Aluminium foil	5	buah	30.000	150.000
Plastik tahan panas (2 kg)	25	pak	25.000	625.000
Petri dish disposable	4	box	1.500.000	6.000.000
Plastik tahan panas (1 kg)	25	pak	15.000	375.000
Masker	6	Pak	60.000	360.000
Sarung tangan nitril ukuran L	6	Pak	65.000	390.000
Sarung tangan nitril ukuran S	6	Pak	65.000	390.000
Tissu	10	buah	300.000	3.000.000
Kertas Sinar Dunia A4 80 gram	2	rim	35.000	70.000
Subtotal			67.920.000	
Komponen Biaya	Volume		Harga Satuan (Rp)	Jumlah (Volume x Satuan) (Rp)
>>Perjalanan dalam rangka survey dan pengambilan bahan				
Kalimantan Tengah				
Transport PP Cibinong-Soetta	4	OK	400.000	1.600.000
Tiket PP Jakarta-Palangkaraya	4	OK	3.000.000	12.000.000
Uang Harian (4 Org x 5 hari)	20	OH	360.000	7.200.000
Penginapan (4 Org x 4 Hari)	16	OH	650.000	10.400.000
Subtotal			31.200.000	
Kalimantan Barat				
Transport PP Cibinong-Soetta	4	OK	400.000	1.600.000
Tiket PP Jakarta-Pontianak	4	OK	3.000.000	12.000.000
Uang Harian (4 Org x 5 hari)	20	OH	380.000	7.600.000

Penginapan (4 Org x 4 Hari)	16	OH	500.000	8.000.000
Subtotal				29.200.000
Total				136.320.000

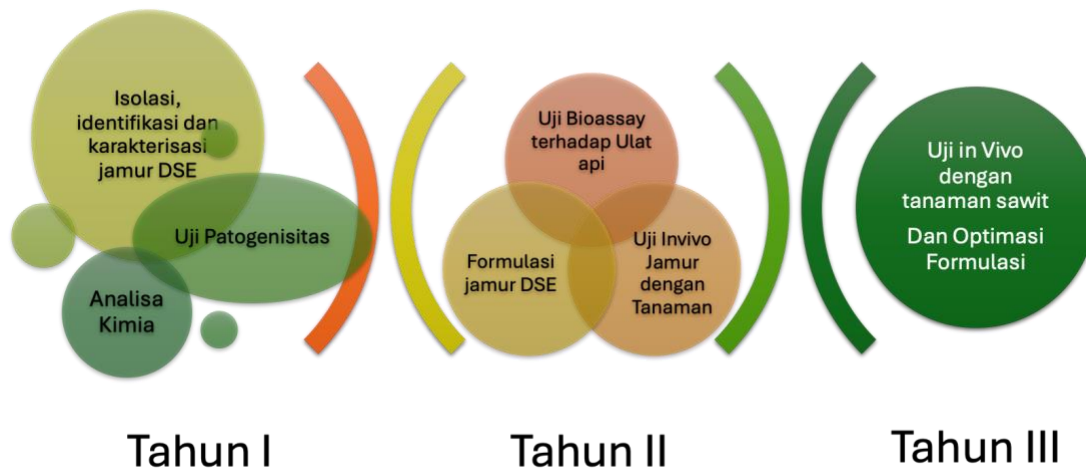
IV. Granchart Kegiatan Penelitian

Rencana Kegiatan Penelitian

Usulan kegiatan ini merupakan usulan kegiatan multiyear yang direncanakan akan selesai selama 3 tahun pengamatan, dengan tahapan kegiatan yang tertera pada table berikut:

Tabel 5. Rencana usulan kegiatan penelitian

No	Kegiatan		Tahun I				Tahun II				Tahun II			
			I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
1	Persiapan penelitian													
2	Survey serangan ulat api													
3	Sampling													
	3a	Akar tanaman sawit												
	3b	Ulat api												
4	Rearing ulat api													
5	Isolasi jamur endophyte DSE													
	5a	Isolasi												
	5b	Inokulasi dan karakterisasi												
	5c	Identifikasi Makroskopis dan Mikroskopis												
	5d	Identifikasi molekuler												
6	Uji Patogenisitas jamur endophyte DSE													
	6a	Uji invitro secara laboratorium												
	6b	Uji invivo semi lapangan (GH)												
7	Uji Bioassay terhadap ulat api													
8	Analisa kimia													
	8a	Analisa PyGCMS												
	8b	Analisa HPLC												
	8c	Analisa kandungan metabolit												
9	Uji in vivo jamur DSE dengan tanaman													
	9a	Semi lapangan												
	9b	Lapangan												
10	Laporan dan monitoring													
11	Drafting manuscript, publikasi dan paten													



Gambar 2. GranChart Kegiatan Riset Proteksi Sistemik Tanaman Kelapa Sawit

V. Analisis Cost dan Benefit

Analisa Cost

Kegiatan penelitian yang diusulkan merupakan kegiatan multiyear (3 tahun) dengan usulan besaran anggaran yang tertera pada table diatas. Kegiatan pada tahun pertama difokuskan untuk mengumpulkan sample jamur endophyte dari perakaran tanaman sawit di perkebunan sawit di wilayah Kalimantan Barat dan Kalimantan Tengah. Pengumpulan serangga ulat api untuk pemeliharaan secara laboratorium akan dilakukan sepanjang tahun (setiap 3 bulan) selama kegiatan ini berlangsung untuk menjaga ketersediaan serangga uji Ketika akan dipergunakan. Pendanaan kegiatan pada tahun pertama lebih besar dibandingkan dengan usulan pada tahun kedua dan ketiga, karena difokuskan untuk pembelian bahan kimia untuk Analisa molekuler, ekstraksi senyawa metabolit, dan kembang pemeliharaan serangga uji. Tahun kedua dan ketiga kegiatan penggunaan pendanaan untuk pembelian bahan kimia lebih rendah karena pada tahun kedua dan ketiga fokus kegiatan lebih kepada uji bioassay, pemeliharaan tanaman dan Analisa kimia menggunakan PyGCMS dan HPLC.

Analisa Benefit

Manfaat yang dapat diperoleh dari kegiatan riset ini terbagi dalam dua kategori utama: manfaat langsung (tangible) dan manfaat tidak langsung (intangible).

1. Manfaat Langsung

- Pengembangan Teknologi Proteksi Tanaman: Penemuan atau pengembangan teknologi proteksi sistemik menggunakan jamur endophyte (Dark Septate Endophyte, DSE) dapat memberikan alternatif yang ramah lingkungan untuk meningkatkan ketahanan tanaman kelapa sawit terhadap hama dan penyakit, terutama terhadap serangan ulat api.
- Pemanfaatan Jamur Endophyte untuk Pertanian Berkelanjutan: Penggunaan jamur endophyte dapat meningkatkan ketahanan tanaman terhadap stres biotik dan abiotik, mengurangi penggunaan pestisida kimia yang berbahaya, dan mendorong pertanian berkelanjutan.
- Peningkatan Produktivitas Kelapa Sawit: Dengan mengurangi kerusakan yang disebabkan oleh ulat api, diharapkan produktivitas kelapa sawit dapat meningkat, memberikan keuntungan lebih besar bagi petani dan perusahaan kelapa sawit.
- Potensi Komersialisasi: Pengembangan jamur endophyte sebagai produk komersial untuk proteksi tanaman sawit dapat membuka peluang pasar baru di industri pertanian.

2. Manfaat Tidak Langsung

- Keberlanjutan Lingkungan: Penggunaan jamur endophyte sebagai agen biopestisida mendukung pertanian ramah lingkungan, mengurangi dampak negatif dari penggunaan pestisida kimia terhadap ekosistem, tanah, dan air.
- Pemeliharaan Keanekaragaman Hayati: Dengan menggantikan pestisida kimiawi dengan solusi bioteknologi berbasis mikroorganisme alami, riset ini juga mendukung keberagaman hayati yang lebih baik di kebun kelapa sawit.
- Peningkatan Reputasi dan Kerja Sama Industri: Hasil riset dapat meningkatkan reputasi lembaga riset dan universitas yang terlibat, serta

membuka peluang kerja sama dengan industri pertanian dan perusahaan besar seperti produsen kelapa sawit.

3. Manfaat Ekonomi

- Penghematan Biaya Pemeliharaan Tanaman: Penggunaan jamur endophyte untuk proteksi tanaman sawit dapat mengurangi biaya pengelolaan hama dan penyakit yang biasanya menggunakan pestisida kimia, serta meningkatkan ketahanan tanaman secara jangka panjang.
- Peningkatan Nilai Tambah Produk Kelapa Sawit: Tanaman kelapa sawit yang lebih sehat dan produktif dapat menghasilkan minyak sawit dengan kualitas lebih tinggi, yang pada gilirannya akan meningkatkan keuntungan perusahaan.

DAFTAR PUSTAKA

- de Roman, M., Fernandez, I., Wyatt, T., Sahrawy, M., Heil, M., and Pozo, M. J. (2011). Elicitation of foliar resistance mechanisms transiently impairs root association with arbuscular mycorrhizal fungi. *J. Ecol.* 99, 36–45. doi: 10.1111/j. 1365- 2745.2010.01752.x
- Doornbos, R. F., Geraats, B. P., Kuramae, E. E., Van Loon, L. C., and Bakker, P. A. (2011). Effects of jasmonic acid, ethylene, and salicylic acid signaling on the rhizosphere bacterial community of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24, 395–407. doi: 10.1094/MPMI-05-10-0115
- Lakshmanan, V., Kitto, S. L., Caplan, J. L., Hsueh, Y. H., Kearns, D. B., Wu, Y. S., et al. (2012). Microbe-associated molecular patterns-triggered root responses mediate beneficial rhizobacterial recruitment in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 160, 1642–1661. doi: 10.1104/pp.112.200386
- Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., and Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 347–375. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102340
- Pineda, A., Zheng, S. J., VanLoon, J. J. A., Pieterse, C. M. J., and Dicke, M. (2010). Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. *Trends Plant Sci.* 15, 507–514. doi: 10.1016/j.tplants.2010.05.007
- Surono and Kazuhiko Narisawa. 2017. The Dark septate endophyte fungus *Phialocephala fortinii* is a potential decomposer of soil organic compounds and a promoter of *Asparagus officinalis* growth. *Fungal Ecology* 28(2017) 1 -10.
- Wiwiek Harsonowati, Malek Marian, Surono, and Karuhiko Narisawa. 2020. The effectiveness of dark septate endophytic fungus *Cladophialophora chaetospora* SK51 to mitigate strawberry *Fusarium* wilt disease and with growth promotion activities. *Frontiers in Microbiology* 11, 585.
- Yang, J. W., Yi, H. S., Kim, H., Lee, B., Lee, S., Ghim, S. Y., et al. (2011). Whitefly infestation of pepper plants elicits defence responses against bacterial pathogens in leaves and roots and changes the below-ground microflora. *J. Ecol.* 99, 46–56. doi: 10.1111/j.1365-2745.2010.01756.x
- Yi, H. S., Yang, J. W., Ghim, S. Y., and Ryu, C. M. (2011). A cry for help from leaf to root: Above ground insect feeding leads to the recruitment of rhizosphere microbes for plant self-protection against subsequent diverse attacks. *Plant Signal. Behav.* 6, 1192–1194. doi: 10.4161/psb.6.8.15780