

<https://doi.org/10.17576/serangga-2024-2903-10>

**KEPATOGENAN KULAT ENTOMOPATOGEN ASLI, *Beauveria bassiana*
(BALS.-CRIV.) VUILL. KE ATAS KUMBANG MERAH PALMA,
Rhynchophorus ferrugineus OLIVIER DEWASA**

*[PATHOGENICITY OF NATIVE ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS, Beauveria bassiana
(BALS.-CRIV.) VUILL. ON THE RED PALM WEEVIL,
Rhynchophorus ferrugineus OLIVIER ADULTS]*

**Najihah Abdul Halim¹, Raja Hasya Ilyana Raja Ahmad¹, Azlina Zakaria²,
Meor Badli Shah Ahmad Rafie², Muhammad Nurul Yaqin Syarif³, Nur Ain Farhah Ros
Saidon Khudri³, Nurul Wahida Othman⁴ & Wahizatul Afzan Azmi^{1,4,*}**

¹Fakulti Sains dan Sekitaran Marin,
Universiti Malaysia Terengganu,
21030 Kuala Nerus,
Terengganu, Malaysia.

²Sime Darby Plantation Research Sdn. Bhd.,
KM10, Jalan Banting-Kelanang,
P.O. Box 207,
Banting 42700 Selangor, Malaysia.

³Lembaga Minyak Sawit Malaysia (MPOB),
6, Persiaran Institusi, Bandar Baru Bangi,
43000 Kajang, Selangor, Malaysia.

⁴Pusat Sistemik Serangga (CIS),
Fakulti Sains dan Teknologi,
Universiti Kebangsaan Malaysia,
43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia.

*Pengarang Berutusan: wahizatul@umt.edu.my

Hantar: 4 April 2024; Terima: 22 Julai 2024

ABSTRAK

Beauveria bassiana (Hypocreales: Cordycipitaceae) ialah kulat entomopatogen yang boleh menjangkiti dan menyebabkan penyakit terhadap pelbagai serangga perosak. Ia boleh dieksploitasi dan dibangunkan sebagai agen kawalan biologi untuk memerangi Kumbang Merah Palma (RPW), *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Dryophthoridae), perosak invasif tanaman kelapa di Malaysia. Oleh itu, satu pencilan *B. bassiana* asli telah diuji kepatogennya terhadap RPW dewasa dan dirawat di dalam makmal dengan kepekatan larutan ampaian konidia yang berbeza. Pencilan *B. bassiana* asli menunjukkan sifat kepatogenan dengan 100% kematian dalam masa 21 hari selepas jangkitan diberikan. Peratusan kematian meningkat dengan ketara melalui peningkatan kepekatan konidium, di mana kepekatan tertinggi 1×10^9 konidia per mL mampu menyebabkan kadar kematian tertinggi bagi

RPW dewasa berbanding kepekatan yang lebih rendah. Pengecaman morfologi dan jujukan DNA yang diperolehi daripada bangkai RPW yang dijangkiti menunjukkan konidia yang dipencilkan sepadan dengan spesies *B. bassiana*. Hasil kajian yang diperolehi ini diharapkan dapat memberi pemahaman yang lebih baik berkaitan potensi penggunaan kulat entomopatogen asli yang akan menjadi langkah permulaan kepada pembangunan agen kawalan biologi baharu perosak invasif kelapa di Malaysia.

Kata kunci: Kulat entomopatogen, *Rhynchophorus ferrugineus*, *Beauveria bassiana*, tanaman palma, kawalan biologi

ABSTRACT

Beauveria bassiana (Bals.-Criv.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) is an entomopathogenic fungus that can infect and cause disease in various insect pests. It can be exploited and developed as a biological control agent to combat the Red Palm Weevil (RPW) *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Dryophthoridae), an invasive pest of coconut crops in Malaysia. Therefore, a native *Beauveria bassiana* isolate was tested for its pathogenicity against adult RPW and treated in the laboratory with different concentrations of conidia suspension solutions. Native *B. bassiana* isolates showed pathogenicity with 100% mortality within 21 days after infection was given. The percentage of mortality increased significantly with increasing conidial suspension concentration, where the highest concentration of 1×10^9 conidia per mL killed the highest number of RPW adults compared to lower concentrations. Morphological identification and DNA sequences obtained from infected RPW carcasses showed that the isolated conidia matched to *B. bassiana* species. The results obtained from this study are expected to provide a better understanding regarding the potential use of native entomopathogenic fungi which will be the first step in the development of new biological control agents for invasive coconut pests in Malaysia.

Keywords: Entomopathogenic fungus, *Rhynchophorus ferrugineus*, *Beauveria bassiana*, palm trees, biological control

PENGENALAN

Kumbang Merah Palma (RPW), *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Dryophthoridae: Coleoptera) adalah serangga perosak invasif tanaman kelapa yang serius di Malaysia (Wahizatul et al. 2017). Ia pertama kali dilaporkan pada tahun 2007 di Rhu Tapai, Setiu Terengganu, Malaysia (Wahizatul et al. 2012), di mana serangga perosak tersebut kini telah giat merebak ke negeri-negeri lain di Semenanjung Malaysia (DOA 2023). Pada peringkat global, RPW telah berjaya menyerang lebih dari 17 jenis spesies tumbuhan palma termasuk kelapa, kurma, sagu dan kelapa sawit di banyak kawasan seperti di Asia, Afrika, Oceania, dan Eropah (EPPO 2007). RPW turut dilaporkan menyerang tanaman palma di California dan Australia (Rugman-Jones et al. 2013). RPW betina bertelur secara bersendirian di dalam rongga yang dibuat dengan rostrum di pangkal daun pelepah kelapa (Yong et al. 2015). Selepas telur menetas, larva akan masuk ke tengah pokok di bahagian umbut kelapa dan memakan tisu lembut di umbut hingga jauh ke dalam batang dengan agresifnya. Seterusnya, larva matang akan membuat kepompong daripada serat atau fiber yang dikunyah, dan bertukar menjadi pupa di pangkal daun kelapa. Kemudian RPW dewasa akan muncul dari kepompong, terbang untuk mengawan dan mencari tumbuhan perumah lain, dan seterusnya membiak sehingga menyebabkan kematian pokok perumah berkenaan (Giblin-Davis et al. 1996).

Kaedah kawalan serangga perosak ini agak sukar kerana peringkat hidup RPW kebanyakannya di dalam batang dan kehadirannya sukar dikesan. Kaedah pengurusan serangan RPW yang sedia ada sebahagian besarnya bergantung kepada strategi Pengurusan Perosak Bersepadu (PPB) termasuk sanitasi ladang, penggunaan racun serangga konvensional, perangkap feromon dan agen kawalan biologi. Kaedah kawalan kimia merupakan kaedah yang paling kerap digunakan bagi mengawal serangan RPW, termasuklah pengasapan berulang, semburan dan siraman racun perosak serta suntikan racun serangga sintetik ke dalam batang pokok yang diserang (Faleiro 2006; Ishak et al. 2020). Namun pendekatan kawalan kimia ini masih belum mampu mengawal populasi RPW kerana penggunaan racun kimia secara kerap boleh menyebabkan perkembangan kerintangan dalam serangga perosak dan seterusnya memberi kesan negatif terhadap alam sekitar dan manusia (Abbas 2010). Oleh itu, perubahan kepada cara kawalan alternatif yang lebih selamat, spesifik dan berkesan perlu diterokai seperti dengan menggunakan musuh semulajadi atau agen kawalan biologi seperti nematod, virus, bakteria dan kulat.

Penggunaan kulat entomopatogen sering dipilih sebagai kaedah kawalan alternatif ke atas serangga perosak kerana mod serangannya lebih unik dan spesifik terhadap serangga perosak. Kulat entomopatogen adalah kulat yang secara khusus menjangkiti serangga dan membunuhnya dengan memasuki perumah serangga perosak melalui kutikel luarnya, berbanding tindakan bakteria atau virus yang menyerang melalui sistem penghadaman serangga (Islam et al. 2021). Malah setelah jangkitan dan kematian serangga perosak ini berlaku, sporanya akan tersebar dan meneruskan kitar hidupnya di dalam perumah baharu di dalam populasi yang sama. Lebih daripada 700 spesies kulat entomopatogen terdiri daripada 90 genus adalah patogenik ke atas serangga perosak seperti *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* dan *Paecilomyces* sp. Potensi kulat entomopatogen sebagai agen kawalan biologi terhadap beberapa serangga perosak dari order Coleoptera, Isoptera, Lepidoptera dan Hemiptera telah pun diuji oleh pelbagai penyelidik di pelbagai negara termasuk Malaysia (Fong et al. 2018; Malarvannan et al. 2010; Ramle et al. 1999).

Setakat ini, tahap keberkesanan kulat entomopatogen sebagai agen kawalan biologi yang efektif membunuh RPW masih belum cukup konklusif dan kebanyakan laporan lebih tertumpu kepada kajian daripada penyelidik di luar negara (Cito et al. 2014; Dembilio & Jacas 2011; Gindin et al. 2006). Beberapa rekod dari Malaysia lebih memfokuskan kepada spesies *M. anisopliae* berbanding spesies kulat entomopatogen yang lain (Cheong et al. 2022; Fong et al. 2018; Grace et al. 2017; Ishak et al. 2020). Oleh itu, lebih banyak kajian diperlukan untuk menerokai potensi spesies-spesies kulat entomopatogen asli yang boleh didapati di Malaysia sebagai agen kawalan biologi RPW. Kajian ini telah dijalankan bagi mengkaji keberkesanan pencilan kulat entomopatogen asli, *B. bassiana* terhadap RPW dewasa bagi menentukan potensi kulat ini untuk dijadikan sebagai agen kawalan biologi baharu terhadap RPW.

BAHAN DAN KAEDAH

Pengkulturan Pencilan Tulen *Beauveria bassiana*

Satu pencilan tulen *B. bassiana* telah diperolehi dan dibekalkan daripada pihak Lembaga Minyak Sawit Malaysia (MPOB), Malaysia. Satu gelung inokulum yang telah disterilkan digunakan untuk mengikis konidia daripada kultur koloni tulen pencilan dan dicoretkan ke atas plat agar-agar dekstrosa kentang (PDA) yang disediakan. Kemudian, plat kultur yang diinokulasi telah dieram pada suhu 28°C. Selepas lima hari, plat kultur diperhatikan untuk sebarang tanda pertumbuhan atau kontaminasi.

Penyediaan Larutan Ampaian Konidium Dan Penentuan Kebolehhidupan (viabiliti) Konidia *B. bassiana*

Subkultur pencilan *B. bassiana* dikekalkan pada plat PDA selama dua minggu. Selepas itu, larutan ampaian konidium disediakan dengan mengikis konidia daripada plat PDA subkultur dengan menambahkan air suling steril yang mengandungi 0.02% Tween 80 ke dalam plat kultur. Larutan ampaian kemudiannya diemparkan pada 5000 rpm selama 15 minit untuk mengasingkan konidia daripada miselium dan bahan buangan lain bagi mendapatkan campuran yang homogen. Kepekatan stok larutan konidium ditentukan dengan menggunakan haemositometer Neubauer dengan bantuan mikroskop cahaya (Leica Microsystems). Selepas bilangan konidia di dalam stok larutan konidium ditentukan, bilangan konidia yang dikehendaki untuk ujian kepatogenan disediakan melalui pencairan bersiri (1×10^5 ; 1×10^6 ; 1×10^7 ; 1×10^8 ; 1×10^9 konidia per ml) daripada pencilan *B. bassiana* yang diuji.

Kebolehhidupan konidia dinilai sebelum ujian kepatogenan dijalankan ke atas RPW dewasa. Ujian kebolehhidupan dilakukan dengan menyebarkan 100 μ l larutan 1×10^7 konidia per ml ampaian konidium pada permukaan plat PDA dengan menggunakan rod kaca bengkok yang disterilkan (*hockey stick*). Plat PDA tersebut dieram pada suhu 28°C selama 18 jam dan kebolehhidupan konidia dianggarkan daripada tiga plat di bawah mikroskop majmuk (Leica Microsystems) (Ezzati-Tabrizi et al. 2009). Seratus konidia diambil secara rawak daripada setiap plat (Sun et al. 2003). Kebolehhidupan konidia yang bercambah diperhatikan dan ditentukan pada sela masa 0, 4, 8, dan 12 jam, melalui kemunculan pembentukan tiub germa iaitu sekurang-kurangnya separuh daripada panjang konidial yang ditanda.

Persampelan Serangga

RPW dewasa telah dibekalkan oleh pihak Jabatan Pertanian Negeri Terengganu (DOA) dari beberapa daerah di Terengganu iaitu dari Kuala Terengganu, Kuala Nerus, Setiu dan Rantau Abang dengan menggunakan teknik perangkap feromon (Wahizatul et al. 2014). Secara keseluruhannya, 105 ekor RPW dewasa telah dipilih untuk ujian kepatogenan. RPW dewasa yang dipilih diperiksa dahulu sebelum digunakan dengan memastikan setiap RPW terpilih mempunyai bahagian badan yang lengkap, saiz yang sama (3cm - 4 cm), dan boleh mengawan. Berdasarkan pemerhatian morfologi dan perilaku, individu RPW yang boleh mengawan dapat dikenal pasti dengan lebih tepat. RPW dewasa disterilkan dengan mencelupkannya ke dalam larutan etanol 70% selama 20-30 saat, dan dibilas dengan air suling yang telah disterilkan. Kemudian, RPW dewasa diaklimatisasikan di dalam bekas plastik dengan penutup berlubang dan diberi makan tebu sebelum menjalani ujian kepatogenan.

Ujian Kepatogenan

Ujian kepatogenan telah dijalankan dengan lima ekor RPW dewasa untuk setiap replikasi dan tiga ulangan untuk setiap rawatan (30 individu RPW sebagai kawalan negatif dan positif, 60 sebagai individu RPW yang dirawat). Ujian kepatogenan dijalankan di dalam keadaan makmal terkawal pada suhu $25 \pm 2^\circ\text{C}$; kelembapan $75 \pm 5\%$ RH dan foto kala 12H (cahaya)+12H (gelap). RPW dewasa dicelupkan ke dalam larutan ampaian konidium yang disediakan selama kira-kira 20-30 saat, dengan lima kepekatan berbeza (1×10^5 ; 1×10^6 ; 1×10^7 ; 1×10^8 ; 1×10^9 konidia per ml) dan kemudian dimasukkan ke dalam bekas berbeza untuk setiap individu (Dembilio et al. 2010).

Sementara itu, RPW dewasa untuk rawatan kawalan negatif dicelupkan selama kira-kira 20-30 saat di dalam air suling yang telah disteril yang mengandungi 0.02% Tween 80. Manakala racun perosak komersial (Cypermethrin) digunakan sebagai kawalan positif. Aplikasi racun perosak komersial telah disediakan mengikut protokol pengilang dengan

kepekatan Cypermethrin 110 ppm. Kesemua RPW individu yang dirawat telah dibiarkan pada suhu bilik, dan kematian RPW dewasa diperhatikan dan direkodkan pada setiap hari selama 21 hari. Bangkai RPW dewasa diletakkan ke dalam piring petri yang mengandungi kertas turas yang dilembapkan untuk mengesahkan mikosis.

Pengecaman Morfologi dan Analisis Molekul *B. bassiana*

Tisu otot toraks atau sephalik yang diperolehi daripada bangkai RPW yang terjangkiti (dirawat dengan larutan ampai konidium) telah ditanam ke dalam kultur media PDA. Kultur pencilan tulen *B. bassiana* yang berumur seminggu telah digunakan untuk panduan pengecaman morfologi. Kaedah untuk pengecaman morfologi *B. bassiana* adalah berdasarkan Kirk et al. (2008) dan Humber (2012). Slaid kaca dan slip penutup disterilkan dengan menyembur etanol 70% dan dibiarkan kering. Bongkah segi empat sama (diameter 5×5 mm) dipotong daripada media PDA dengan menggunakan bilah pisau bedah yang disteril. Kepingan agar-agar itu kemudiannya diletakkan di atas slaid kaca dan ditutup dengan penutup slaid kaca. Ciri-ciri morfologi koloni *B. bassiana* dikaji secara makroskopik dengan memerhatikan warna, bentuk, permukaan, dan hifanya. Pemerhatian mikroskopik dibuat pada hifa, konidiofor, dan konidia dengan menggunakan mikroskop majmuk pada pembesaran 100x (Humber 2012; Samson et al. 1988).

Kultur kulat *B. bassiana* yang dipencilkan dari bangkai RPW kemudiannya dihantar ke 1st BASE Laboratories Pte. Ltd. (Shah Alam, Malaysia) bagi tujuan pengesahan spesies menggunakan teknik molekul. 1st BASE Laboratories telah melakukan perkhidmatan molekul penuh pengkodan DNA termasuk pengestrakan DNA, tindakbalas berantai polimerase, elektroforesis gel dan analisis jujukan. Jujukan sampel *B. bassiana* yang diperolehi daripada analisis jujukan dibandingkan dengan pangkalan data jujukan *B. bassiana* melalui *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) di GenBank. Persamaan nukleotida antara jujukan mestilah lebih daripada 99% untuk membuktikan sampel adalah sama spesies dengan *B. bassiana*.

Analisis Data

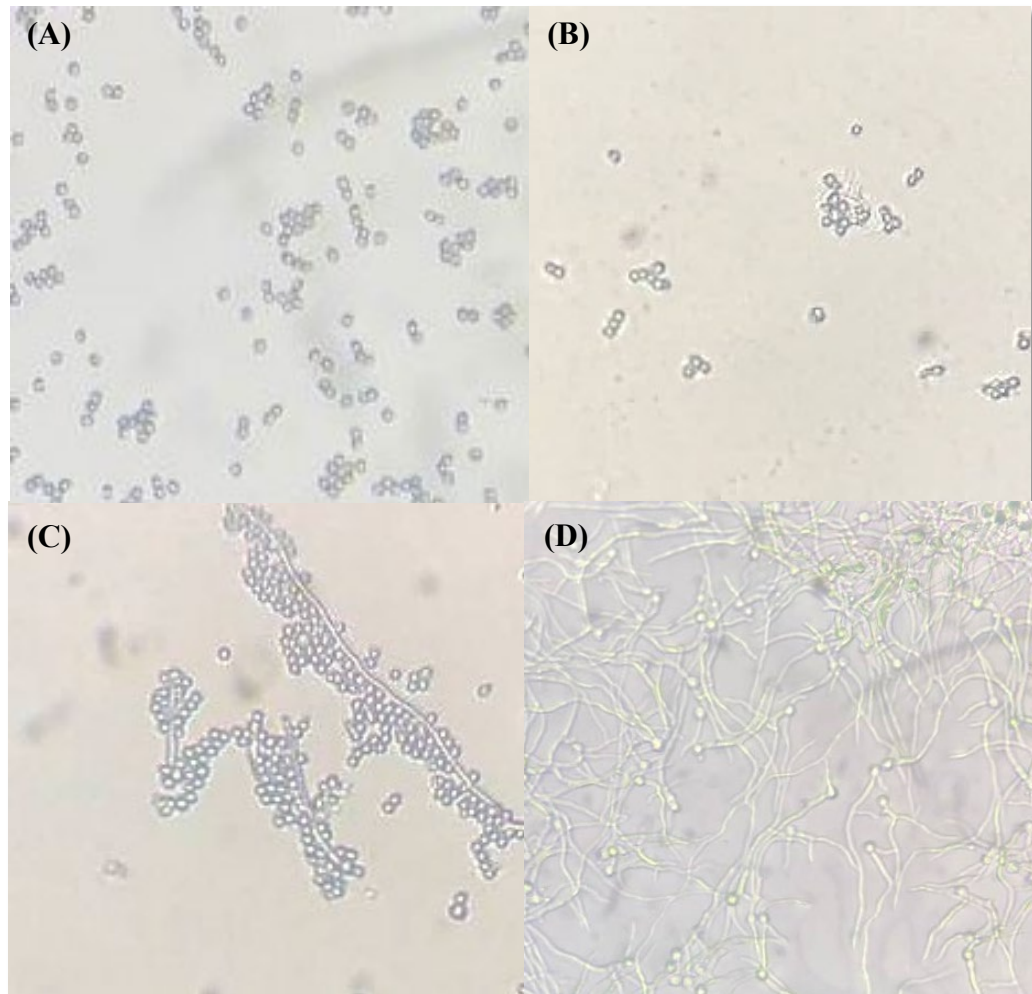
Tempoh kematian median (LT₅₀) dan kepekatan kematian median (LC₅₀) ditentukan menggunakan kaedah analisis Probit dengan menggunakan perisian Microsoft Excel. ANOVA 1 hala telah dijalankan untuk menentukan sama ada terdapat perbezaan yang signifikan dalam jumlah kematian RPW antara rawatan berbeza yang digunakan dengan menggunakan perisian statistik SPSS 22.0.

HASIL DAN PERBINCANGAN

Pertumbuhan dan Viabiliti *B. bassiana*

Pertumbuhan konidia *B. bassiana* pada plat PDA direkodkan pada selang masa 4 jam (0, 4, 8, 12 jam) selama 12 jam. Saiz konidia adalah antara 6 hingga 8 μ m. Viabiliti konidia yang bercambah ditunjukkan oleh pembentukan tiub germa, seperti yang ditunjukkan di dalam Rajah 1. Percambahan konidia meningkat dengan masa pengeraman dan ini disokong dengan perkembangan tiub germa. Kira-kira antara 0 hingga 4 jam selepas pengeraman, kebanyakan konidia masih mengekalkan bentuk asalnya (Rajah 1A). Selepas 4 jam pengeraman, beberapa konidia telah mulai bertumbuh dan memasuki fasa pemanjangan tiub germa (Rajah 1B). Pertumbuhan tiub germa beransur-ansur meningkat antara 8 dan 12 jam pengeraman (1C). Konidia tumbuh lebih panjang dan bercambah dengan banyaknya dalam 12 jam selepas pengeraman, dengan beberapa tiub germa dihasilkan oleh hampir setiap konidia (Rajah 1D). Kadar percambahan pencilan *B. bassiana* adalah sekitar 95%. Menurut Kisaakye et al. (2021),

kadar percambahan 92%-98% dianggap cukup tinggi untuk sesuatu pencilan kulat entomopatogen.



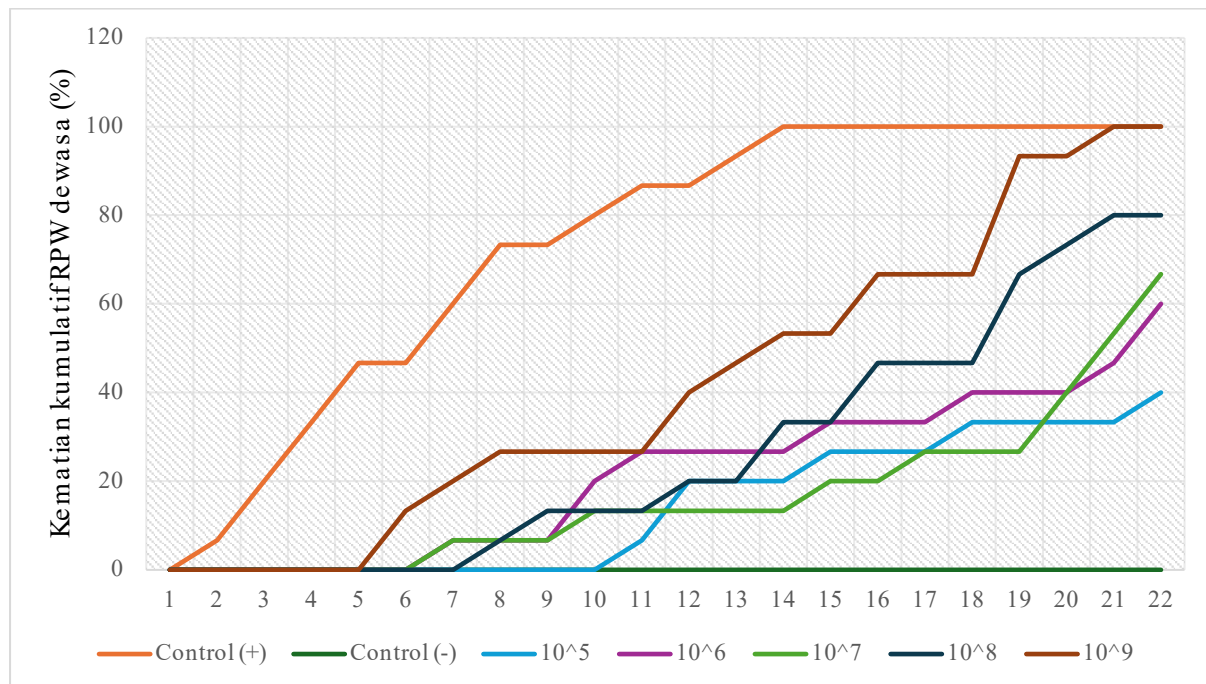
Rajah 1. Percambahan konidia dan pemanjangan hifa *B. bassiana* pada masa berbeza: (A) 0 h, (B) 4 h, (C) 8 h, dan (D) 12 h di bawah mikroskop cahaya (Pembesaran 400x)

Hubungan antara kekutuban tiub germa dan kevirulenan mungkin disebabkan oleh aktiviti metabolik di dalam tiub germa yang memudahkan penembusan atau penetrasi ke dalam badan serangga (Butt et al. 2016; Wang et al. 2012). Oleh itu, kebolehhidupan konidia yang rendah dan pemanjangan tiub germa yang kurang boleh menjejaskan kevirulenan kulat entomopatogen dalam membunuh serangga sasaran. Spora dianggap berdaya maju jika panjang tiub germa adalah dua kali ganda saiz diameter spora (Wraight et al. 2007).

Berdasarkan keputusan kajian ini, banyak konidia dari pencilan *B. bassiana* menunjukkan daya hidup dan kebolehhidupan yang tinggi, yang secara langsungnya telah mempengaruhi ujian kepatogenan ke atas RPW dewasa. Ini juga dapat menjelaskan bahawa keberkesanan pencilan *B. bassiana* untuk membunuh RPW sangat bergantung kepada kebolehhidupan konidia dan kepekatan konidia per ml di mana ianya sangat mempengaruhi kevirulenan kulat entomopatogen untuk berkembang pada serangga perumah (Olivera & Neves 2004).

Kepatogenan *B. bassiana* Ke Atas *R. ferrugineus* (RPW) Dewasa

Kajian ini menunjukkan pencilan *B. bassiana* asli didapati berjangkit dan patogenik ke atas RPW dewasa dalam tempoh 21 hari selepas rawatan (DAT). Larutan ampaian konidia pencilan MPOB yang berkepekatan tinggi (1×10^9 konidia per ml) menjangkiti 100% populasi dalam tempoh 21 hari, dengan lima ekor bangkai RPW dewasa mati dan dijangkiti pada hari ke-5 selepas rawatan (DAT) (Rajah 2).



Rajah 2. Ujian kepatogenan pencilan *B. bassiana* MPOB ke atas RPW dewasa untuk tempoh rawatan selama 21 hari

Ujian kepatogenan ke atas RPW dewasa yang dijalankan menggunakan kepekatan larutan ampaian konidia berbeza menunjukkan setiap rawatan mempunyai perbezaan yang ketara terhadap kematian RPW dewasa (ANOVA; $P < 0.05$). Rawatan larutan ampaian konidia yang berkepekatan paling tinggi (1×10^9 konidia per ml) membunuh lebih banyak RPW dewasa (kematian 100%) berbanding rawatan berkepekatan rendah yang lain. Rawatan kepekatan larutan ampaian konidia yang lain mengambil masa lebih 7 hari ke atas untuk mulai membunuh RPW dewasa dan tidak mampu mencapai 100% kematian kumulatif dalam tempoh rawatan diberi (21 hari), berbanding larutan ampaian konidia berkepekatan 1×10^9 konidia per ml yang mengambil masa 13.06 hari untuk mencapai tempoh kematian median, LT_{50} (Jadual 1) dan kepekatan kematian median, LC_{50} sebanyak 4.16×10^5 konidia per ml. Keputusan kajian menunjukkan bahawa kepekatan spora yang tinggi menyebabkan kadar kematian yang lebih tinggi kerana bilangan spora yang banyak meningkatkan kebarangkalian jangkitan yang lebih besar.

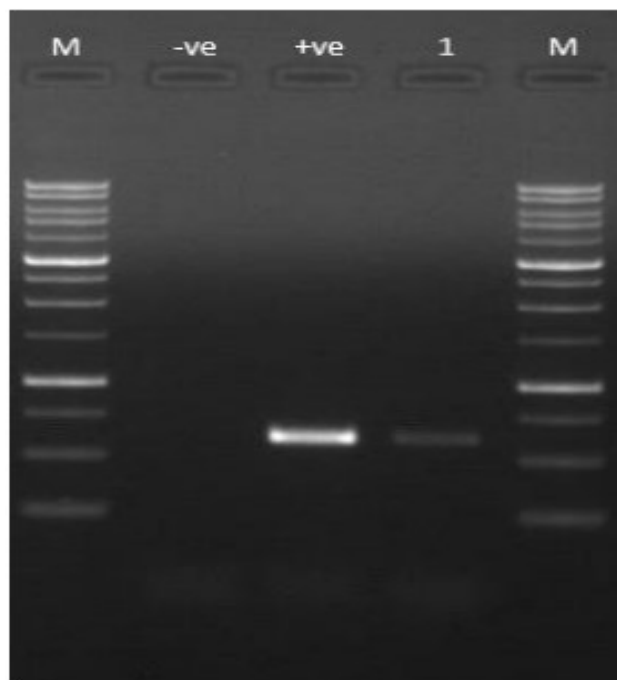
Pengecaman morfologi hifa dan konidia yang dipencilkan dari bangkai RPW yang dirawat melalui pemerhatian mikroskopik telah mengesahkan ianya adalah spesies *B. bassiana* (Humber 2012; Samson et al. 1988). Rajah 3 menunjukkan jalur produk PCR untuk sampel konidia daripada RPW dewasa yang dijangkiti. Jalur produk amplifikasi PCR muncul pada 1.2% gel agarose dan diperhatikan antara 500 hingga 750 bp. Penjujukan DNA yang diperolehi

dibandingkan menggunakan BLAST dan sampel konidia dipadankan dengan *B. bassiana* menunjukkan 99% persamaan dengan nombor aksesori bagi keseluruhan jujukan genom. Berdasarkan pokok filogenetik, sampel konidia yang dipencilkan ialah *Beauveria bassiana* dengan 574 bp.

Jadual 1. Tempoh kematian median (LT₅₀) RPW dewasa yang dirawat dengan pencilan *B. bassiana* yang terdiri dari pelbagai kepekatan larutan konidia berbeza

Rawatan	Aras Keyakinan 95%			
	LT ₅₀ (hari)	Batas Bawah	Batas Atas	R ²
Larutan ampaian konidia				
1 x 10 ⁵ konidia per ml	27.74 ^{ab}	8.38	22.10	0.89
1 x 10 ⁶ konidia per ml	21.88 ^{bc}	14.26	30.82	0.94
1 x 10 ⁷ konidia per ml	24.98 ^{ab}	9.29	25.63	0.80
1 x 10 ⁸ konidia per ml	17.09 ^{bc}	15.38	41.13	0.90
1 x 10 ⁹ konidia per ml	13.06 ^c	28.26	59.37	0.96
Rawatan positif				
Cypermethrin	6.55 ^d	63.05	89.96	0.83
Rawatan negatif				
0.05% Tween 80	0.00	0.00	0.00	0.00

Nota. Huruf yang sama dalam graf menunjukkan tidak terdapat perbezaan yang signifikan pada $P < 0.05$, analisis Tukey HSD.



Rajah 3. Produk PCR menghasilkan satu jalur untai DNA pada pasangan asas yang sama bagi pencilan konidia daripada bangkai RPW dewasa yang dijangkiti, pada 574 bp yang dilabel oleh M = Penanda 100-bp, -ve = campuran PCR tanpa DNA, +ve = DNA yang diekstrak dari kultur tulen *B. bassiana*, 1 = DNA kulat yang diekstrak dari bangkai RPW yang dirawat.

Gejala dan Simptom Serangan *B. bassiana* ke atas RPW Dewasa

Beberapa ekor RPW yang mati menunjukkan tanda-tanda pertumbuhan hifa dan sporulasi yang membuktikan bahawa *B. bassiana* mampu menyebabkan kematian RPW dan boleh menjadi agen penyebaran spora yang berkesan untuk menjangkiti RPW dewasa sihat yang berdekatan (Rajah 4). *B. bassiana* mempunyai keupayaan unik untuk menjangkiti perumahannya secara langsung melalui lekatan dan penetrasi dengan menembusi kutikel keras rangka luar serangga terutamanya di celah-celah antenna, pronotum, kaki dan hujung pigidium (Rajah 5) melalui perembesan enzim ekstrasel seperti kitinase, protease dan lipase (Sutanto et al. 2021). Konidia kulat entomopatogenik bergantung kepada sentuhan langsung kepada badan perosak (Muhammad Nurul Yaqin et al. 2023). Bahagian celahan-celahan ini lebih mudah untuk konidia tersekat dan memudahkan penembusan tiub germa bagi memulakan jangkitan kepada perumah.

Walau bagaimanapun, tidak semua bangkai RPW dewasa yang diperhatikan menunjukkan simptom pertumbuhan hifa dan sporulasi. Separuh daripada bangkai RPW yang dirawat dengan pencilan *B. bassiana* menunjukkan simptom mengeras, tidak berbau busuk sepanjang tempoh rawatan dan masih mengekalkan warna badan RPW, namun tiada sporulasi telah diperhatikan. Namun begitu, terdapat juga kematian RPW dewasa yang diperhatikan bukanlah disebabkan oleh kulat entomopatogen tetapi disebabkan oleh kulat saprofit. Kulat saprofit adalah sejenis kulat yang hidup dengan memakan bahan organik mati atau yang sedang mereput. Mereka memainkan peranan penting dalam ekosistem sebagai pengurai, membantu dalam proses penguraian bahan organik seperti tumbuhan mati dan bangkai haiwan (Suradkar & Kadu 2021). Simptom kematian RPW yang disebabkan oleh kulat saprofit termasuk badan berwarna gelap, mengeluarkan bau busuk, bangkai menjadi lembik atau berair, menunjukkan tahap pereputan yang tinggi. dan tiada pembentukan spora.



Rajah 4. Bangkai RPW dewasa yang dijangkiti oleh pencilan *B. bassiana* MPOB



Rajah 5. Gambar yang menunjukkan pertumbuhan hifa dan sporulasi *B. bassiana* pada pelbagai anggota badan RPW dewasa (Pembesaran 60X)

Kajian terdahulu menunjukkan bahawa pencilan kulat entomopatogen yang berbeza mungkin mempunyai kadar kepatogenan yang berbeza disebabkan oleh faktor persekitaran yang berbeza seperti kelembapan, sifat tanah dan suhu (Ishak et al. 2020). Selain itu, enzim ekstraselular yang dirembeskan oleh pencilan *B. bassiana* yang berbeza boleh menjadi salah satu sebab yang mempengaruhi virulensi kulat untuk membunuh RPW dewasa. Ortiz-Urquiza et al. (2010) melaporkan bahawa jenis pencilan *B. bassiana* yang berbeza akan merembeskan jenis dan jumlah enzim ekstrasel yang berbeza seterusnya menjejaskan virulensi kulat. Selain itu, virulensi *B. bassiana* dan masa yang digunakan untuk membunuh RPW dewasa boleh dipengaruhi oleh aktiviti enzimatik kerana jumlah dan jenis enzim yang berbeza yang dihasilkan oleh kulat akan mempengaruhi kadar degradasi kutikel serangga perumah (Gupta et al. 1992).

Menurut kajian lepas oleh Fong et al. (2018), rawatan *B. bassiana* yang diuji telah merekodkan kematian yang tinggi dalam membunuh RPW. Namun tiada satu pun daripada RPW yang mati menunjukkan sebarang simptom pertumbuhan hifa, sporulasi, atau sampel menggelap dan berbau busuk. Hifa tidak dihasilkan, dan oleh itu tiada sporulasi berlaku walaupun tempoh pengeraman telah diteruskan selama lebih daripada tiga minggu selepas ujian kepatogenan. Pertumbuhan hifa dan keupayaannya untuk bersporulasi adalah sangat penting untuk agen bio-kawalan menjangkiti lebih banyak serangga sasaran di lapangan.

Semasa pertumbuhan *B. bassiana* di dalam badan perumah, *B. bassiana* akan merembeskan metabolit bioaktif yang toksik kepada perumah seperti bassianolid, beauvericin, dan oospora boleh menyebabkan gangguan mekanikal struktur serangga seterusnya mengurangkan pengambilan makanan (Tefera & Pringle 2003). Mekanisme aplikasi kulat ini adalah melalui RPW yang dijangkiti akan terbang mencari makanan atau pasangan, seterusnya akan memindahkan *B. bassiana* yang dibawa kepada RPW lain di kawasan serangan sebagai kaedah penyebaran. Ciri unik ini boleh dieksploitasi untuk mengawal populasi RPW di

kawasan pertanian yang dapat mengurangkan kebergantungan terhadap racun kimia yang berbahaya kepada hasil tanaman dan pengguna.

KESIMPULAN

Keputusan ujian kepatogenan untuk pencilan kulat entomopatogen *B. bassiana* menunjukkan kadar jangkitan maut yang agak tinggi terhadap RPW dewasa, yang berpotensi untuk dibangunkan sebagai agen kawalan biologi terhadap serangan kumbang palma merah (RPW). Kajian lanjut perlu dijalankan untuk membandingkan keberkesanan *B. bassiana* di dalam keadaan makmal dan di lapangan. Keputusan yang diperolehi boleh mengisi jurang penyelidikan berhubung kemungkinan dan potensi penggunaan kulat entomopatogen asli *B. bassiana* sebagai alternatif kepada racun serangga sintetik terhadap RPW ke arah pengurusan perosak yang lebih mesra alam di Malaysia.

PENGHARGAAN

Kami juga mengucapkan terima kasih kepada pihak Jabatan Pertanian Negeri Terengganu di atas sokongan dan kerjasama yang diberikan selama ini.

PENGISYTIHARAN PENGARANG

Pernyataan Biaya

Kajian ini dibiayai oleh Geran Industri/Swasta (Vot: 53428) yang ditaja oleh pihak industri, Sime Darby Plantation Research Sdn. Bhd.

Percanggahan Kepentingan

Penulis mengakui tiada percanggahan kepentingan dalam kajian yang dijalankan.

Penyataan Etika

Tiada isu etika yang terkait dengan kajian ini.

Pernyataan Kehadiran Data Tambahan

Tiada

Sumbangan Pengarang

Najihah Abdul Halim (NAH) dan Raja Hasya Ilyana Raja Ahmad (RHIRA) melakukan penyelidikan dan mengumpul sampel dari lapangan; Wahizatul Afzan Azmi (WAA), NAH, RHIRA, Muhammad Nurul Yaqin Syarif (MNYS) dan Nur Ain Farhah Ros Saidon Khudri (NAFRSK) mengambil bahagian dalam tafsiran data; WAA, MNYS, NAFRSK, Azlina Zakaria (AZ), Meor Badli Shah Ahmad Rafie (MBSAR) dan Nurul Wahida Othman (NOW) menulis kertas kerja dan mengambil bahagian dalam semakannya. Semua pengarang membaca dan meluluskan manuskrip akhir.

RUJUKAN

- Abbas, M.S.T. 2010. IPM of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. *Journal of Plant Protection Research* 9: 209-230.
- Butt, T.M., Coates, C.J., Dubovskiy, I.M. & Ratcliffe, N.A. 2016. Entomopathogenic fungi: New insights into host-pathogen interactions. In Lovett, B. & St Leger, R.J. (eds.). *Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi*. pp. 307-364. Cham, Switzerland: Springer.
- Cheong, J.L., Najihah, A.H., Norhayu, A., Azlina, Z. & Wahizatul, A.A. 2022. Conidial emulsion formulation and thermal storability of *Metarhizium anisopliae* against red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Oliver (Coleoptera: Dryophthoridae). *Microorganism* 10: 1460.
- Cito, A., Mazza, G., Strangi, A., Benvenuti, C., Barzanti, G.P., Dreassi, E., Turchetti, T., Francardi, V. & Roversi, P. 2014. Characterization and comparison of *Metarhizium* strains isolated from *Rhynchophorus ferrugineus*. *FEMS Microbiology Letters*: 355.
- Dembilio, O., Quesada-Moraga, E., Santiago-Alvarez, C. & Jacas, J.A. 2010. Potential of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as a biological control agent against the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 104: 214-221.
- Dembilio, Ó. & Jacas, J.A. 2011. Basic bio-ecological parameters of the invasive red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae), in *Phoenix canariensis* under Mediterranean climate. *Bulletin of Entomological Research* 101: 153-163.
- DOA (Department of Agriculture). 2023. Report on Current Status of Attack of the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* in Terengganu. Minit Mesyuarat JK Teknikal Kumbang Merah Palma.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2007. *Rhynchophorus ferrugineus* and *Rhynchophorus palmarum*. *European and Mediterranean Plant Protection Organization Bulletin* 37(3): 571-579.
- Ezzati-Tabrizi, R., Talaei-Hassanloui, R. & Hamid-Reza, P. 2009. Effect of formulating of *Beauveria bassiana* conidia on their viability and pathogenicity to the onion thrips, thrips Tabaci Lind. (Thysanoptera: Thripidae). *Journal Of Plant Protection Research* 49(1): 46-51.
- Faleiro, J.R. 2006. A review of the issues and management of the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Rhynchophoridae) in coconut and date palm during the last one hundred years. *International Journal of Tropical Insect Science* 26: 135-154.
- Fong, J.H., Siti Nor Khadijah, A. & Wahizatul, A.A. 2018. Virulence evaluation of entomopathogenic fungi against the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Dryophthoridae). *Malaysian Applied Biology* 47(5): 25-30.

- Giblin-Davis, R.M., Oehlschlager, A.C., Perez, A., Gries, G., Gries, R., Weissling, T.J., Chinchilla, C.M., Peña, J.E., Hallett, R.H. & Pierce, H.D., Jr. 1996. Chemical and behavioural ecology of palm weevils (Coleoptera: Curculionidae). *Florida Entomologist* 79: 153-166.
- Gindin, G., Levski, S. Glazer, I. & Soroker, V. 2006. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*. *Phytoparasitica* 34: 370-379.
- Grace, L.E.L., Jamilah, M.S., Mohd Farid, A. & Wahizatul A.A. 2017. Entomopathogenic fungi isolated from the soil of Terengganu, Malaysia as potential bio-pesticides against the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. *Journal of Sustainability Science and Management* 12(2): 71-79.
- Gupta, S.C., Leathers, T.D., El-Sayed, G.N. & Ignoffo, C.M. 1992. Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. *Experimental Mycology* 16(2): 132–137.
- Humber, R. 2012. Identification of entomopathogenic fungi. In Lacey, L. (ed.). *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. 2nd Edition, pp. 151-187. London UK: Academic Press.
- Ishak, I., Ng, L.C., Haris-Hussain, M., Jalinas, J., Idris, A.B., Azlina, Z., Samsudin, A. & Wahizatul, A.A. 2020. Pathogenicity of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) (MET-GRA4 Strain) as a potential biological control agent against the red palm weevil (Coleoptera: Dryophthoridae). *Journal of Economic Entomology* 113(1): 43-49.
- Islam, W., Muhammad, A., Asad, S., Hassan, N., Yakubu, S.A., Muhammad, Q. & Muhammad, T. 2021. Insect-fungal-interactions: A detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests. *Microbial Pathogenesis* 159: 105-122.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W. & Stalpers, J.A. 2008. *Dictionary of the Fungi*. 10th Edition. Wallingford, UK: CAB International.
- Kisaakye, J., Fourie, H., Coyne, D., Cortada, L., Masinde, S., Subramanian, S. & Haukeland, S. 2021. Evaluation of the entomopathogenic potential of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Isaria fumosorosea* for management of *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). *Agriculture* 11(12): 1290.
- Malarvannan, S., Murali, P.D., Shanthakumar, S.P., Prabavathy, V.R. & Sudha Nair. 2010. Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* against the tobacco caterpillar, *Spodoptera litura* Fabricius (Noctuidae: Lepidoptera). *Journal of Biopesticides* 3(1): 126-133.
- Muhammad Nurul Yaqin S., Norhayu A., Siti Nurulhidayah A., Shamshilawani A.B., Mazmira M.M.M. & Dzolkhifli O. 2023. Identification of *Cordyceps javanica* and its effectiveness in controlling bagworm, *Pteroma pendula* Joannis (Lepidoptera: Psychidae). *Serangga* 28(2): 14-27.

- Olivera, R.C. & Neves, P.M.O.J. 2004. Biological control compatibility of *Beauveria bassiana* with acaricides. *Neotropical Entomology* 33: 353-358.
- Ortiz-Urquiza, A. Riveiro-Miranda, L., Santiago-Álvarez, C. & Quesada-Moraga, E. 2010. Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 105(3): 270-278.
- Ramle, M., Wahid, M.B., Kamarudin, N., Mukesh, S. & Ali, S.R.A. 1999. Impact of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) applied by wet and dry inoculum on oil palm rhinoceros beetles, *Oryctes rhinoceros* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Oil Palm Research* 11: 25-40.
- Rugman-Jones, P.F., Hoddle, C.D., Hoddle, M.S. & Stouthamer, R. 2013. The lesser of two weevils: Molecular-genetics of pest palm weevil populations confirm *Rhynchophorus vulneratus* (Panzer 1798) as a valid species distinct from *R. ferrugineus* (Olivier 1790), and reveal the global extent of both. *Plos One* 8(10): e78379.
- Samson, R.A., Evans, H.C. & Latgé, J.P. 1988. *Atlas of Entomopathogenic Fungi*. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin.
- Sun, J., Fuxa, J.R. & Henderson, G. 2003. Effects of virulence, sporulation, and temperature on *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* laboratory transmission in *Coptotermes formosanus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 84: 38-46.
- Suradkar, K.P. & Kadu, S.R. 2021. Studies of some saprophytic fungi from Melghat Forest. *International Journal of Scientific Research in Science and Technology* 9(1): 254-257.
- Sutanto, K.D., Husain, M., Rasool, K.J., Al- Qahtani, W.H. & Aidawood, A.S. 2021. Pathogenicity of local and exotic entomopathogenic fungi isolates against different life stages of red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*). *Plos One* 16(7): 1-16.
- Tefera, T. & Pringle, K. 2003. Germination, radial growth, and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates and their virulence to *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) at different temperatures. *Biocontrol Science and Technology* 13: 699-704.
- Wahizatul, A.A., Chong, J.L., Hazlina, A.Z., Norhayati, Y., Wan Bayani, W.O., Yong, K.W., Ainatun, N.Z. & Mohd. Haris, H. 2017. The Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*: Current issues and challenges in Malaysia. *Oil Palm Bulletin* 74: 17-24.
- Wahizatul, A.A., Abdul Rahman, A.R., Chong, J.L. & Wong, A.S.Y. 2012. Scanning electron microscopy of the Red Palm Weevil (RPW), *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Curculionidae): A new invasive pest of coconut palms in Terengganu. *Malaysian Journal of Microscopy* 8(1): 148-152.
- Wang, B., Kang, Q., Lu, Y., Bai, L. & Wang, C. 2012. Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 109(4): 1287-1292.

- Wraight, S.P., Inglis, D.G. & Goettel, M.S. 2007. Fungi. In Lacey, L.A. & Kay, A.H.K. (eds.). *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and other Invertebrate Pests*. 2nd Edition,. pp. 223-248. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Yong, W.K., Aisyah, A.B. & Wahizatul, A.A. 2015. Fecundity, fertility and survival of red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*) larvae reared on sago palm. *Sains Malaysiana* 44: 1371-1375.