

UPAYA MENINGKATKAN PATOGENISITAS *Lecanicillium lecanii* TERHADAP HAMA PENGISAP POLONG KEDELAI *Riptortus linearis* melalui REGULASI KITINASE DAN UJI KOMPATIBILITAS PESTISIDA

*(Efforts to Increase The Pathogenicity of *Lecanicillium lecanii* Against Soybean Sucking Pest *Riptortus Linearis* Through Chitinase Regulation and Pesticide Compatibility Tests)*

Mulyati, Y.

Prodi Pendidikan IPA, FMIPA, Universitas Negeri Malang

Email: yayuk.mulyati.fmipa@um.ac.id

Diterima : 12/07/2021

Disetujui : 18/08/2021

ABSTRACT

The aim of this study was to increase the killing power of *Lecanicillium lecanii* through (1) regulation of chitinase synthesis and (2) finding compatible pesticides to be applied together with *L. lecanii*. Analysis of the role of chitinase on the pathogenicity of *L. lecanii* was carried out through the selection of basal media composition, optimization of culture conditions (media pH, temperature and incubation period), and bioassay against soybean pod sucking pest *Riptortus linearis*. Meanwhile, the compatibility test of fungi with pesticides was carried out by growing the fungus on PDA media added with fungicides with the active ingredients of carbendazime, triadimefon, methyl thiophanate, kaptan, iprodion, and mankozeb. The results showed that *L. lecanii* grown on I basal media, pH 5, temperature 30 °C, and an incubation period of 5 or 6 days was able to optimally increase chitinase activity. Bioassays on *R. linearis* showed a mortality of up to 80% at 3 days after application. The pathogenicity of *L. lecanii* in this study is much more significant than in previous research reports. In the second study, the compatibility test with pesticides showed that *L. lecanii* was compatible with pesticides with the active ingredients of mankozeb. Pesticides with the active ingredients of kaptan, iprodione, carbendazime, triadimefon, and methyl thiophanate are toxic (strongly inhibit) the growth of *L. lecanii* colonies. The two findings of this study indicate that *L. lecanii* has good prospects as a bioinsecticide in terms of increasing its pathogenicity and compatibility with pesticides.

Keyword: chitinase, pesticide compatibility, *Lecanicillium lecanii*, pathogenicity, *Riptortus linearis*

ABSTRAK

Penelitian ditujukan untuk meningkatkan daya bunuh *Lecanicillium lecanii* melalui (1) regulasi sintesis kitinase dan (2) menemukan pestisida kompatibel untuk diaplikasikan bersama dengan *L. lecanii*. Tujuan tersebut dicapai melalui dua kegiatan penelitian yang berbeda. Analisis peran kitinase terhadap patogenisitas *L. lecanii* dilakukan melalui tahapan seleksi komposisi media basal, optimalisasi kondisi kultur (pH media, suhu dan periode inkubasi), dan *bioassay* terhadap hama pengisap polong kedelai *R. linearis*. Sementara itu, uji kompatibilitas cendawan dengan pestisida dilakukan dengan menumbuhkan cendawan pada media PDA yang ditambahkan dengan fungisida berbahan aktif karbendazin, triadimefon, tiofanat metil, kaptan, iprodion, dan mankozeb. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *L. lecanii* yang ditumbuhkan pada media basal I, pH 5, suhu 30 °C, dan periode inkubasi 5 atau 6 hari mampu meningkatkan aktivitas kitinase secara optimal. *Bioassay* terhadap *R. linearis* menunjukkan mortalitas mencapai 80% pada 3 hari setelah aplikasi (HSA). Patogenisitas *L. lecanii* pada penelitian ini jauh lebih signifikan dibandingkan pada laporan penelitian sebelumnya. Pada penelitian kedua, uji kompatibilitas dengan fungisida menunjukkan bahwa *L. lecanii* kompatibel dengan pestisida berbahan aktif mankozeb. Pestisida dengan bahan aktif kaptan, iprodione, karbendazin, triadimefon, dan tiofanat metil bersifat toksik (menghambat kuat) terhadap pertumbuhan koloni *L. lecanii*. Dua hasil temuan penelitian ini menunjukkan bahwa *L. lecanii* memiliki prospek yang baik sebagai bioinsektisida terkait dengan peningkatan daya patogenisitas dan kompatibilitasnya dengan pestisida.

Kata Kunci: kitinase, kompatibilitas pestisida, *Lecanicillium lecanii*, patogensitas, *Riptortus linearis*

PENDAHULUAN

Hama pengisap polong kedelai antara lain adalah *Nezara viridula*, *Piezodorus hybneri*, dan *Riptortus linearis* (Indiati *et al.*, 2017). *R. linearis* (L.) (Hemiptera: Alydidae) merupakan salah satu jenis hama pengisap polong kedelai yang sangat penting di antara tiga jenis hama pengisap polong yang disebut di atas. Hama tersebut tersebar hampir di seluruh propinsi di Indonesia dan menyebabkan kerugian panen, baik itu dari segi kualitas maupun kuantitas (Krisnawati *et al.*, 2016). Kerugian hasil panen akibat hama pengisap polong kedelai hingga mencapai 80% (Prayogo, 2011).

Upaya pengendalian *R. linearis* dengan menggunakan agens hayati telah banyak diteliti. *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) (Viegas) Zare & Gams (Deuteromycotina: Hyphomycetes) merupakan salah satu cendawan agens hayati yang sudah diketahui potensinya untuk mengendalikan berbagai jenis hama, termasuk didalamnya *R. linearis* (Prayogo, 2011). Cendawan ini memiliki kisaran inang yang luas, meliputi Ordo Orthoptera, Hemiptera, Lepidoptera, Thysanoptera, dan Coleoptera (Khoiroh *et al.*, 2014).

Meskipun sudah diketahui potensinya dalam mengendalikan hama, akan tetapi cendawan *L. lecanii* kurang memenuhi harapan sebagai agen pengendali biologis terkait dengan daya bunuh yang relatif lebih lambat dibandingkan pestisida kimia (Fang *et al.*, 2009). Pada umumnya, cendawan entomopatogen membutuhkan waktu lebih dari 7 hari untuk mematikan serangga inang (Faria dan Wraight, 2001). Empat isolat *L. lecanii* yang terseleksi sebagai isolat yang paling berpotensi dalam mengendalikan telur *R. linearis* dibandingkan 33 isolat lainnya, membutuhkan waktu 6 hari untuk menekan 72% perkembangan telur *R. linearis* (Prayogo, 2011). Tiga isolat *L. lecanii*, yaitu *L. lecanii* 2, *L. lecanii* 3, dan *L. lecanii* 5 yang diujicobakan terhadap green peach aphid *Myzus persicae* hanya mampu menyebabkan mortalitas secara berturut-turut sebesar 47.19%, 24.56%, dan 26.17% pada 3 HSA. Pada 6 HSA, mortalitas *M. persicae* akibat aplikasi 3 isolat tersebut secara berturut-turut sebesar 67.42%, 80.70%, dan 68.22% (Khan *et al.*, 2012). Pada pengamatan 5 hari setelah aplikasi (HSA), *L. lecanii* menyebabkan mortalitas *T. tabaci*

Lindeman sebesar 49-54% (Moctezuma *et al.*, 2014). Hasil penelitian Putra *et al.* (2013) menunjukkan bahwa *L. lecanii* menyebabkan mortalitas *Bemisia tabaci* sebesar 68.5% pada 7 HSA.

Salah satu faktor yang menentukan keberhasilan pengendalian hama menggunakan cendawan entomopatogen yaitu virulensi isolat (Khan *et al.*, 2012). Virulensi isolat salah satunya ditentukan oleh kemampuannya memproduksi enzim degradatif (Hasan *et al.*, 2013). Enzim degradatif tersebut berfungsi untuk mendegradasi kutikula serangga yang bertindak sebagai penghalang pertama melawan infeksi cendawan (Xie *et al.*, 2010). Zhu *et al.* (2008) menyatakan bahwa kitinase merupakan enzim degradatif yang utama pada *L. lecanii*. Khan *et al.* (2012) melaporkan bahwa *L. lecanii* 3 yang memproduksi kitinase tertinggi menunjukkan daya patogenitas tertinggi pula terhadap green peach aphid *Myzus persicae*, dibandingkan 2 strain uji lainnya. Temuan ini menjadi informasi yang sangat penting terkait pengendalian hama menggunakan cendawan entomopatogen mengingat pada umumnya komponen utama eksoskeleton serangga merupakan senyawa kitin (Muthukhishnan *et al.*, 2020).

Upaya peningkatan virulensi cendawan dapat dicapai optimalisasi media serta kondisi kultur (Jholapara *et al.*, 2013). Produksi kitinase diyakini dapat meningkat tajam apabila cendawan ditumbuhkan pada media dengan komposisi yang optimal (Rebecca *et al.*, 2013). pH, suhu, dan periode inkubasi merupakan kondisi kultur yang mempengaruhi produksi enzim. Hal tersebut dikarenakan enzim hanya dapat diproduksi secara optimal pada pH dan suhu spesifik serta periode inkubasi tertentu (Vitolo, 2020).

Selain kitinase sebagai faktor internal, daya patogenitas agens hayati juga dipengaruhi oleh faktor eksternal saat aplikasi di lapang. Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi kinerja jamur tersebut dalam mengendalikan hama di lapangan adalah senyawa kimia, yaitu pestisida. Tkaczuk *et al.* (2015) menyatakan bahwa informasi mengenai pengaruh pestisida kimia terhadap cendawan entomopatogen sekaligus penentuan mengenai kemungkinan cendawan untuk diaplikasikan bersama dengan pestisida merupakan hal yang penting dalam pengendalian hama terpadu.

Di Indonesia, uji kompatibilitas yang telah dilaporkan sampai saat ini adalah

kompatibilitas *L. lecanii* dengan pestisida nabati (Indriati *et al.*, 2015 dan Prayogo, 2011). Belum pernah ada laporan mengenai uji kompatibilitas *L. lecanii* dengan pestisida kimia. Penelitian ini penting dilakukan mengingat tingginya penggunaan pestisida kimia untuk mengendalikan *R. linearis*. Informasi mengenai kompatibilitas *L. lecanii* dengan pestisida kimia menentukan keberhasilan penggunaan cendawan ini sebagai bioinsektisida.

Berdasarkan paparan di atas, penelitian ini ditujukan untuk (1) menemukan komposisi media serta kondisi kultur yang dapat mengoptimalkan produksi kitinase *L. lecanii* serta (2) menemukan pestisida kimia yang kompatibel untuk diaplikasikan bersama *L. lecanii*. Upaya tersebut ditujukan untuk meningkatkan patogenisitas *L. lecanii* terhadap *R. linearis* yang selama ini kurang memenuhi harapan sebagai agens hayati terkait daya bunuhnya yang relatif lambat..

BAHAN DAN METODE

Tempat, waktu, alat, dan bahan

Seluruh kegiatan penelitian dilakukan di Laboratorium Jurusan Biologi, FMIPA, UB. Penelitian tahap I (regulasi kitinase dan bioassay-nya terhadap *R. linearis*) dilakukan mulai Februari sampai dengan April 2015. Penelitian tahap II (uji kompatibilitas cendawan dengan pesisida) dilakukan pada Mei-Juni 2021.

Bahan-bahan yang digunakan yaitu isolat *L. lecanii*, serangga uji *R. linearis*, Potato Dextrose Agar (PDA); cling wrap; aluminium foil; akuades; kertas saring; kitin bubuk; kitin koloid; N-asetil D-glukosamin; Na₂HPO₄.2H₂O; KH₂PO₄; NaCl; NH₄Cl; MgSO₄.7H₂O; CaCl₂; pereaksi Schales, buffer asetat, buffer fosfat, dan buffer Tris HCl, dan pestisida dengan bahan aktif karbendazin, tradimefon, tiofanat metil, kaptan, iprodion, dan mankozeb.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: cawan petri; laminar air flow; tabung reaksi; jarum inokulum lurus; erlenmeyer 250 ml; bor gabus; hand sprayer; kuas halus; Tween 80; vortex; thermohygrograph; mikropipet; blue tip; yellow tip; microfuge tube; sentrifuge; microwave; waterpass; auctoclave; shaking water bath; timbangan digital; sangkar untuk rearing *R. linearis* dengan diameter 30 cm dan tinggi 40

cm; penggaris, milar plastik, oven kering; dan magnetik stirer.

Penentuan media basal optimal untuk analisis kitinase berdasarkan tiga karakter virulensi: pertumbuhan koloni, jumlah dan ukuran konidia

Terdapat tiga komposisi media basal yang diuji, yaitu Media basal I, II, dan III. Media basal yang telah di auctoclave pada suhu 121°C selama 15 menit kemudian dituang kedalam petri dish sebanyak 15 ml. Pada media yang telah memadat kemudian dibuat lubang difusi dengan diameter 7 mm. Suspensi konidia sebanyak 65 µL diinokulasikan pada lubang difusi dan diinkubasi pada suhu ruang. Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak kelompok dengan 4 ulangan pada parameter pertumbuhan koloni, 40 ulangan pada parameter jumlah konidia, dan 20 ulangan pada parameter ukuran konidia. Parameter-parameter yang diamati diukur pada 7 HSA. Pertumbuhan koloni diukur dengan mengukur dua sisi diameter koloni. Jumlah konidia dihitung dengan menggunakan haemocytometer. Ukuran konidia diukur dengan menggunakan mikrometer meja dan okuler.

Pengaruh kondisi kultur terhadap aktivitas kitinase

Kondisi kultur yang diuji antara lain pH, suhu, dan periode inkubasi. pH media yang diuji yaitu 4, 4.5, 5, 5.5, 6, dan kontrol masing-masing 4 ulangan. Variasi suhu yang diuji yaitu 25°C, 30 °C, 35 °C, dan kontrol (suhu ruang) dengan 6 ulangan. Aktivitas kitinase pada perlakuan pH dan suhu inkubasi ditentukan secara kuantitatif pada 5 HSA. Perlakuan periode inkubasi dilakukan selama 10 hari pada guhu ruang dan pengukuran aktivitas kitinase secara kuantitatif dilakukan setiap 24 jam selama 10 hari. Data yang diperoleh dianalisis dengan anova satu arah. Apabila nilai F_{hitung} signifikan, uji lanjut dilakukan dengan LSD.

Analisis kuantitatif aktivitas kitinase

Erlenmeyer flask 100 ml yang mengandung 35 ml media diauctoclave selama 15 menit pada suhu 121 °C. Suspensi konidia sebanyak 1 ml 1 x 10⁶ diinokulasikan pada media steril. Cendawan diinkubasi selama 5 hari pada rotary shaker. Pengukuran aktivitas kitinase adalah dengan menggunakan metode

Scales dengan merujuk pada Spindler (1997) dengan modifikasi. Satu unit aktivitas kitinase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat membebaskan glucosamine sebesar 1 µmol per menit. Desain penelitian adalah rancangan acak kelompok dengan 4 ulangan. Data yang diperoleh dianalisis dengan anova satu arah. Apabila nilai F_{hitung} signifikan, uji lanjut dilakukan dengan LSD.

Rumus penentuan aktivitas kitinase:

$$A = \frac{[\text{GlcNAc}]_{\text{sampel}} - [\text{GlcNAc}]_{\text{blanko}}}{t \times V_a \times V_e}$$

Keterangan A : Aktivitas Kitinase (Unit ml⁻¹), [GlcNAc]: Konsentrasi N-asetil-D-glukosamina hasil reaksi enzimatis, ditetapkan dengan menggunakan persamaan kurva standar, t: waktu inkubasi, Vtr: Volume total reaksi enzimatis (ml), Ve: Volume enzimatis yang digunakan (ml), Va: Volume filtrat yang dianalisa.

Uji Patogenisitas Inokulum terhadap Nimfa *I. linearis*

Aplikasi inokulum terhadap nimfa *I. linearis* dilakukan dengan cara disemprotkan pada seluruh tubuh nimfa yang telah dimasukkan dalam milar plastik. Jumlah nimfa yang diuji adalah 20 nimfa. Volume suspensi konidia larutan kitinase untuk setiap unit percobaan adalah 3 ml. Pada perlakuan kontrol, nimfa disemprot dengan akuades steril dalam jumlah yang sama (Indriyati, 2009).

Penghitungan Mortalitas Nimfa *R. linearis*

Jumlah nimfa *R. linearis* yang mati terinfeksi *L. lecanii* dari masing-masing perlakuan dihitung pada 3, 6, dan 10 HSA. Rumus yang digunakan untuk menentukan keefektifan *L. lecanii* dalam menyebabkan mortalitas nimfa *R. linearis* adalah sebagai berikut:

$$\text{Mortalitas} = \frac{\sum \text{serangga yang mati}}{\sum \text{total serangga perlakuan}} \times 100\%$$

Data persentase hasil perhitungan mortalitas imago *R. linearis* ditransformasikan ke arc sin \sqrt{x} sebelum dilakukan perhitungan dengan menggunakan sidik ragam.

Uji kompatibilitas cendawan dengan fungisida

Platting dilakukan di dalam laminar air flow dengan mengambil 1 ml pestisida dari masing-masing perlakuan kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri berdiameter 9 cm. Konsentrasi pestisida yang ditambahkan adalah sesuai dengan rekomendasi penggunaannya. Pada cawan petri tersebut ditambahkan PDA sebanyak 10 ml. Tiap perlakuan diulang tiga kali. *V. lecanii* dari biakan murni diambil dengan menggunakan bor gabus berdiameter 1 cm, kemudian diinokulasikan ke dalam cawan petri yang telah diisi dengan fungisida dan PDA sesuai dengan perlakuan. Selanjutnya cawan petri disimpan di dalam ruangan pada temperatur 27-31°C. Pengamatan dilakukan setiap 12 jam sekali selama 7 hari. Data pertumbuhan koloni *V. lecanii* dianalisis dengan analisis variansi tunggal. Bila ada pengaruh jenis fungisida terhadap pertumbuhan jamur tersebut, maka dilakukan uji lanjut beda nyata terkecil (LSD).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil dan pembahasan penelitian tahap I Media basal optimal untuk analisis kitinase berdasarkan tiga karakter virulensi: pertumbuhan koloni, jumlah dan ukuran konidia

Parameter-parameter yang digunakan untuk menentukan media basal optimal untuk analisis kitinase yaitu pertumbuhan koloni, jumlah konidia, dan ukuran konidia. Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa macam media basal berpengaruh terhadap pertumbuhan koloni dan jumlah konidia. Pada parameter ukuran konidia, hasil anova menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan secara signifikan ukuran konidia *L. lecanii* yang ditumbuhkan pada media basal I, II, dan III (Tabel 1). Namun demikian, konidia cendawan yang ditumbuhkan pada media basal I menunjukkan ukuran yang lebih besar dibandingkan media basal II dan III. Rata-rata ukuran konidia *L. lecanii* pada media basal I, II, dan III secara berturut-turut yaitu 4.625 µm x 11.875 µm, 3.875 µm x 10.375 µm, dan 3.75 µm x 11.75 µm.

Tabel 1. Pertumbuhan koloni, jumlah dan ukuran konidia *L. lecanii* pada 7 HSA, pada media basal I, II, dan III

Media basal	Parameter yang diamati		
	Rata-rata pertumbuhan koloni (mm)	Rata-rata jumlah konida	Rata-rata ukuran konidia (μm)
I	78.25 ^b	45 ^b	4.63 ^a
II	53.75 ^a	9.9 ^a	3.88 ^a
III	86 ^b	10.4 ^a	3.75 ^a

Keterangan: Hari Setelah Aplikasi; angka dalam satu lajur yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% dan 1% menurut uji LSD

Atas dasar paparan data, dapat disimpulkan bahwa media basal I memiliki potensi lebih baik dibandingkan media basal II dan III terkait tiga parameter yang dipakai sebagai acuan penentuan media basal yang akan dipakai pada analisis kitinase. Komposisi utama yang membedakan antara media basal I, II, dan III adalah sumber nitrogen penyusunnya. Media basal I memiliki sumber nitrogen organik berupa urea dan *yeast extract*, sedangkan media basal II dan III memiliki sumber karbon berupa pepton. Pada dasarnya, *yeast extract* maupun pepton memiliki unsur penyusun yang sama. *Yeast extract* sebagai faktor pertumbuhan tersusun atas nitrogen, asam amino, vitamin terlarut dalam air, dan karbohidrat. Pepton mengandung senyawa

nitrogen, faktor pertumbuhan, dan oligomer N-acetyl-glucosamine (Jholapara *et al.*, 2013). Karbohidrat pada *yeast extract* dan N-acetyl-glucosamine pada pepton sama-sama berperan sebagai sumber karbon. Berdasarkan kesamaan tersebut, dapat dikatakan bahwa *L. lecanii* memang lebih sesuai tumbuh pada media basal I dan kurang cocok pada media basal II maupun III.

Pengaruh Kondisi Kultur terhadap Aktivitas Kitinase *L. lecanii* pada 7 HSA

Hasil analisis menunjukkan bahwa pH, suhu, dan periode inkubasi merupakan kondisi kultur yang mempengaruhi aktivitas kitinase *L. lecanii*. Kitinase *L. lecanii* diproduksi secara optimal pada pH 5, suhu 30 °C dengan periode inkubasi selama 3 hari (Tabel 2).

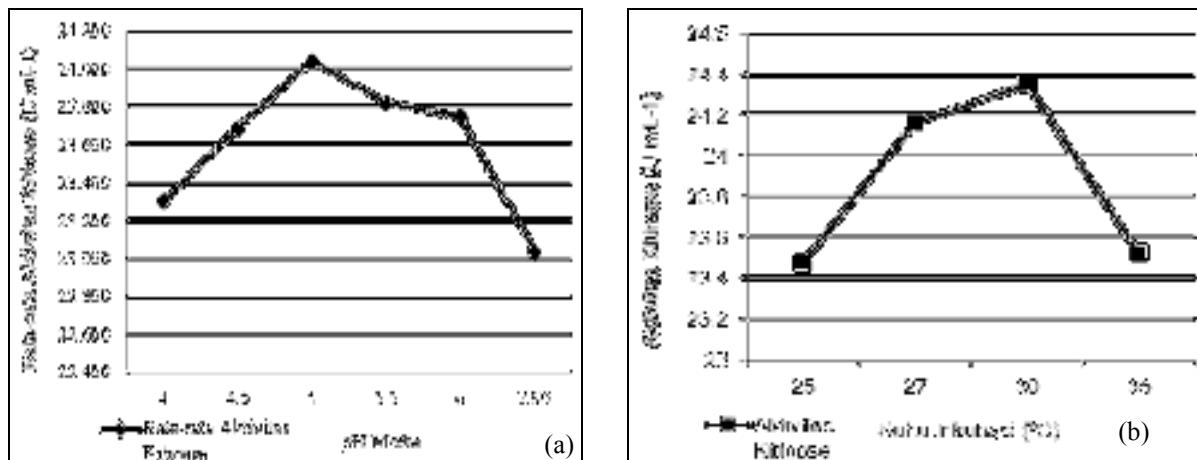
pH

Sifat ionik gugus karboksil dan gugus amino suatu senyawa dipengaruhi oleh pH. Menurut Vitolo (2020), produksi kitinase dipengaruhi pH. Hal tersebut dapat mengakibatkan perubahan daerah katalitik dan konformasi enzim. *L. lecanii* mampu menghasilkan kitinase pada pH 4 hingga pH 6; akan tetapi mencapai maksimum pada pH 5. Hasil penelitian ini sesuai dengan pernyataan Sinkar dan Kasav (2009) bahwa endokitinase mengalami peningkatan pada saat pH rendah.

Tabel 2. Aktivitas kitinase pada berbagai perlakuan kondisi kultur

pH	Aktivitas kitinase (U ml^{-1})	Suhu	Aktivitas kitinase (U ml^{-1})	Periode Inkubasi (jam)	Aktivitas kitinase (U ml^{-1})
4	23.306 ^{ab}	25	23.477 ^a	24	49.167 ^{ab}
4.5	23.688 ^{bc}	27 (kontrol)	24.162 ^{bc}	48	50.056 ^{cdef}
5	24.042 ^c	30	24.352 ^c	72	50.611 ^f
5.5	23.819 ^{bc}	35	23.523 ^{ab}	96	50.667 ^f
6	23.750 ^{bc}			120	50.667 ^f
Kontrol	23.038 ^a (7.95)			144	50.472 ^{ef}
				168	49.861 ^{bcede}
				192	49.694 ^{abcd}
				216	49.667 ^{abcd}
				240	49.472 ^{abc}

Keterangan: Angka dalam satu lajur yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 1% menurut uji LSD

Gambar 1. Aktivitas kitinase *L. lecanii* pada kondisi kultur (a) pH, (b) suhu inkubasi

Vitolo *et al.* (2020) menjelaskan bahwa enzim dapat berperilaku asam, basa, atau netral sesuai dengan konstitusi asam amino yang dapat mempengaruhi sisi aktif enzim. Berdasarkan pernyataan tersebut, diketahui bahwa sisi aktif enzim kitinase *L. lecanii* dipengaruhi oleh kondisi asam. Pada kisaran pH yang diuji, pH 5 dapat mempengaruhi secara optimal sisi aktif kitinase sehingga mampu berikatan dengan substrat yang pada gilirannya dapat menghasilkan aktivitas kitinase secara optimal pula. Pada pH dibawah 5 atau diatas 5, sisi aktif enzim tidak dapat bekerja optimal. Kondisi tersebut menyebabkan menurunnya kemampuan berikatan dengan substrat sehingga aktivitas kitinase yang dihasilkan juga tidak optimal. Aktivitas kitinase *L. lecanii* pada kondisi asam hingga basa ditunjukkan pada Gambar 1a.

Suhu

Selain pH, reaksi-reaksi kimia yang dikatalisis enzim juga peka terhadap suhu. Hal tersebut dikarenakan enzim merupakan struktur protein yang akan mengalami denaturasi pada suhu yang tidak tepat. Denaturasi menyebabkan kerja enzim mengalami penurunan (Vitolo, 2020).

Pada empat suhu yang diuji, pada suhu 25°C, kitinase diproduksi pada jumlah yang rendah. Produksi kitinase meningkat seiring dengan peningkatan suhu dan mencapai optimal pada suhu 30°C; akan tetapi tidak berbeda signifikan pada suhu 27°C (rata-rata suhu ruang). Produksi kitinase mengalami penurunan pada suhu 35°C. Hasil penelitian ini sesuai dengan pernyataan Vitolo (2020) yang menjelaskan bahwa aktivitas kitinase akan

semakin meningkat seiring dengan kenaikan suhu sampai ke tingkat optimal. Peningkatan suhu menyebabkan energi kinetik enzim semakin tinggi. Kondisi tersebut menyebabkan peningkatan gerakan vibrasi, translasi, dan rotasi antara enzim dengan substrat sehingga peluang substrat – enzim bereaksi semakin besar (Rochima, 2006). Pada saat suhu kultur terus dinaikkan melebihi suhu optimal aktivitas enzim, maka akan mengakibatkan penurunan aktivitas enzim. Penurunan aktivitas kitinase tersebut diduga karena enzim mengalami denaturasi sehingga kehilangan sebagian aktivitasnya (Vitolo, 2020). Aktivitas kitinase *L. lecanii* pada suhu inkubasi 25°C, 27°C, 30°C, dan 35°C ditunjukkan pada Gambar 1b.

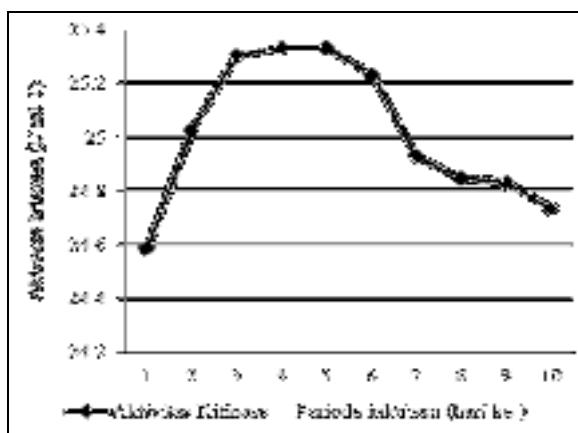
Periode Inkubasi

Secara umum, aktivitas kitinase *L. lecanii* dimulai pada 24 jam setelah inkubasi dan mengalami peningkatan pada 2 hari setelah inkubasi (HSI) hingga 6 HSI. Hasil tersebut didukung pernyataan Sinkar dan Kasav (2009) yang menyatakan bahwa aktivitas kitinase cendawan berfilamen, salah satunya yaitu *L. lecanii*, mengalami peningkatan seiring dengan periode inkubasi. Pada periode inkubasi yang lebih lama (melebihi periode waktu inkubasi optimal), aktivitas kitinase mengalami penurunan. Penurunan aktivitas kitinase diduga berkaitan dengan dihasilkannya protease yang mampu mendegradasi kitinase.

Produksi kitinase pada kultur cendawan pada umumnya diketahui maksimum pada waktu inkubasi 3 dan 4 HSI. Periode inkubasi optimal aktivitas kitinase bergantung pada jenis substrat pada medium. Pada penelitian ini, aktivitas kitinase optimal dicapai pada hari

kedua inkubasi pada media dengan sumber karbon N-acetyl-D-glucosamine. Aktivitas optimal tersebut bertahan hingga hari keenam inkubasi. Hasil penelitian sebelumnya melaporkan produksi optimal kitinase *B. bassiana* terjadi pada 3 HSI pada media wheat bran-based (Suresh dan Chandrasekharan, 1999). Nampoothiri *et al.* (2004) melaporkan periode inkubasi 4 HSI sebagai periode aktivitas kitinase optimal pada *T. Harzianum* TUBF 781.

Pada paparan sebelumnya, telah dijelaskan bahwa aktivitas kitinase tertinggi dijumpai pada media dengan sumber karbon kitin dan produk hidrolisisnya N-acetyl-D-glucosamine. Kesesuaian substrat diduga mempengaruhi sisi aktif enzim untuk dapat bereaksi lebih cepat sehingga aktivitas kitinase mencapai optimal pada waktu yang lebih cepat. Aktivitas kitinase selama 10 hari inkubasi ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 3. Aktivitas Kitinase *L. lecanii* pada 10 hari periode inkubasi

Uji Patogenisitas *L. lecanii* terhadap Hama Pengisap Polong Kedelai *Riptortus linearis*

Bioinsektisida berbahan aktif *L. lecanii* diaplikasikan dalam bentuk suspensi. Preparasi inokulum dilakukan pada kondisi kultur optimal sesuai rekomendasi tahap penelitian sebelumnya. Aplikasi inokulum menggunakan tiga konsentrasi yang berbeda. Hasil anova faktorial menunjukkan bahwa interaksi konsentrasi inokulum dan hari pengamatan berpengaruh signifikan terhadap patogenisitas *L. Lecanii* (Tabel 3).

Berdasarkan Tabel 3, diketahui bahwa konsentrasi inokulum 10^8 merupakan konsentrasi inokulum paling efektif dibandingkan dua konsentrasi perlakuan

lainnya. Efektifitas tersebut dicapai pada 3 HSA.

Tabel 3. Mortalitas *R. linearis* pada pengamatan 3, 6, dan 10 HSA

Perlakuan [In Hari pengamatan]	Total (individu)	Rata-rata (individu)	Notasi
10^6	H3	18	a
	H6	32	ab
	H10	43	bc
10^7	H3	15	a
	H6	41	bc
	H10	60	a
10^8	H3	64	a
	H6	67	16,75
	H10	67	16,75

Keterangan: Angka dalam satu lajur yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 1% menurut uji LSD

Hasil-hasil penelitian sebelumnya mengindikasikan bahwa *L. lecanii* merupakan cendawan entomopatogen yang kurang memenuhi harapan sebagai agen pengendali biologis. Moctezuma *et al.* (2014) melaporkan bahwa pada kerapatan 10^9 , *L. lecanii* mampu menyebabkan mortalitas *Thrips tabaci* Lindeman sebesar 49-54% pada 5 HSA. Penelitian yang dilakukan Suhairiyah *et al.* (2013) dengan menggunakan kerapatan konidia 10^8 dan 10^9 , pengamatan pada 7 HSA menunjukkan tingkat mortalitas *Spodoptera litura* secara berturut-turut sebesar 80% dan 83%. Putra *et al.* (2013) melaporkan bahwa pada pengamatan 7 HSA, *L. lecanii* mampu menyebabkan mortalitas *Bemisia tabaci* sebesar 68,5%. Hasil penelitian Khan *et al.* (2012) menunjukkan bahwa pada kerapatan konidia 10^8 , tiga isolat *L. lecanii* (*L. lecanii* 2, *L. lecanii* 3, dan *L. lecanii* 5) yang diujicobakan terhadap green peach aphid *Myzus persicae* hanya mampu menyebabkan mortalitas secara berturut-turut sebesar 47,19%, 24,56%, dan 26,17% pada 3 HSA. Pada 6 HSA, mortalitas *M. persicae* akibat aplikasi 3 isolat tersebut secara berturut-turut sebesar 67,42%, 80,70%, dan 68,22%.

Berdasarkan beberapa laporan hasil penelitian tersebut, dapat dinyatakan bahwa hasil penelitian ini memberikan harapan yang lebih baik terkait pemanfaatan *L. lecanii* sebagai agen pengendali biologis. Patogenisitas *L. lecanii* yang tinggi diduga berkaitan dengan

pengaruh preparasi inokulum sebelum diaplikasikan. Pinnamaneni *et al.* (2010) dan Fang *et al.* (2010) menyatakan bahwa optimalisasi kondisi kultur pada saat preparasi inokulum diperlukan untuk keberhasilan pengendalian biologis. Hal tersebut dikarenakan media dan kondisi kultur tidak hanya mempengaruhi pertumbuhan dan sporulasi cendawan, tetapi juga viabilitas dan virulensi konidia.

Pada hasil penelitian sebelumnya, diperoleh media basal yang mampu mendukung produksi kitinase serta produksi konidia dalam jumlah yang optimal. Selain media basal yang optimal, pada penelitian tahap I juga diperoleh kondisi kultur yang meliputi pH media, suhu inkubasi, serta periode inkubasi yang optimal pula untuk mendukung produksi kitinase serta jumlah konidia. Pada tahap preparasi inokulum, hal yang membedakan penelitian ini dengan penelitian-penelitian yang telah disebutkan yaitu terkait media yang digunakan, pH media, serta umur inokulum (periode inkubasi).

Pada beberapa penelitian yang telah disebutkan, media kultur yang digunakan yaitu beras jagung, *Adamek liquid media* (glukosa 20 g L⁻¹, corn steep liquor 15 g L⁻¹, yeast extract 20 g L⁻¹, dan tween 80 4 g L⁻¹). Informasi lain yang diperoleh dari laporan penelitian tersebut yaitu periode inkubasi (umur inokulum), yaitu berkisar 20-21 HSI. Adanya perbedaan

komposisi media serta periode inkubasi tersebut dimungkinkan mempengaruhi produksi kitinase *L. lecanii*. Akan tetapi, penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mendapat jawaban yang pasti terkait hal-hal tersebut.

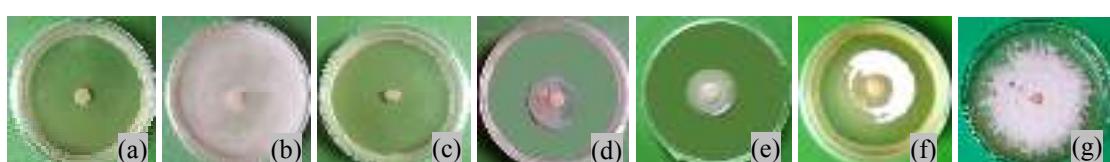
Hasil dan Pembahasan Penelitian Tahap II Kompatibilitas Bioinsektisida Berbahan Aktif *L. lecanii* dengan Pestisida

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa jenis pestisida berpengaruh terhadap pertumbuhan cendawan *L. lecanii* (Tabel 4). Pertumbuhan koloni *L. lecanii* tertinggi terjadi pada medium yang diberi perlakuan fungisida dengan bahan aktif mankozeb. Hal ini berarti bahwa mankozeb merupakan jenis fungisida yang paling kompatibel (dapat diaplikasikan bersama) dengan *L. lecanii* dibandingkan dengan fungisida lainnya. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Koppert (2002) bahwa fungisida dengan bahan aktif mankozeb dapat dikombinasikan penggunaannya dengan *L. lecanii*. Selain diameter pertumbuhan, aplikasi bersamaan dengan fungisida juga dapat mempengaruhi perubahan warna koloni. Pada berbagai jenis perlakuan fungisida, hanya pada media yang ditambahkan fungisida berbahan aktif mankozeb yang tidak menimbulkan perubahan warna koloni (Gambar 4).

Tabel 4. Pengaruh jenis pestisida terhadap pertumbuhan dan warna koloni *L. lecanii*

Jenis Fungisida	Rata-rata diameter pertumbuhan koloni <i>L. lecanii</i> pada hari ke-7	Warna koloni
Karbendazin	14 ^a	Coklat kehitaman
Triadimefon	14 ^a	Coklat kehitaman
Tiofanat metil	14 ^a	Coklat kehitaman
Kaptan	21,03 ^b	Putih kecoklatan
Iprodion	27,13 ^c	Putih kecoklatan
Mankozeb	46,07 ^d	Putih kekuningan
Kontrol		Putih kekuningan
LSD 1%	2,81	

Keterangan: Angka dalam kolom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 1% uji LSD)



Gambar 4. Pertumbuhan dan warna koloni *L. lecanii* pada media PDA+fungisida: a. karbendazin; b. triadimefon; c. tiofanat metil; d. kaptan; e. iprodione; f. mankozeb; g. PDA saja (kontrol)

Pestisida dengan bahan aktif kaptan dan iprodion bersifat menghambat pertumbuhan koloni, akan tetapi tidak bersifat toksik (menghambat kuat). Hasil penelitian ini sesuai dengan Alves *et al.* (1998), yaitu dari dua jenis iprodion yang diberikan, iprodion 2 bersifat menghambat pertumbuhan *L. lecanii*, akan tetapi tidak bersifat toksik. Meskipun demikian, fungisida berbahan aktif kaptan dan iprodion tetap tidak dapat diaplikasikan bersamaan dengan *L. lecanii* terkait dengan kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan cendawan. Tkaczuk (2015) menyatakan bahwa fungisida tertentu dapat membahayakan kehidupan cendawan entomopatogen dan hendaknya tidak diterapkan serempak dengan agen hayati. Selang waktu penggunaan fungisida berbahan aktif mankozeb dengan bioinsektisida berbahan aktif *L. lecanii* lebih pendek penerapannya dibandingkan dengan kaptan dan iprodion yang membutuhkan selang waktu yang lebih lama untuk aplikasinya bersama dengan *L. lecanii*. Akan tetapi, berapa lama selang waktu yang pasti untuk kombinasi penggunaan fungisida dengan cendawan masih memerlukan penelitian lebih lanjut.

Temuan dua kegiatan penelitian di atas memberikan prospek positif penggunaan bioinsektisida berbahan aktif *L. lecanii*. Pada penelitian tahap I, temuan media basal dan kondisi kultur optimal untuk preparasi inokulum *L. lecanii* yang mampu menunjukkan daya bunuh yang lebih cepat dibandingkan temuan penelitian sebelumnya memberikan harapan baru terkait penggunaan cendawan entomopatogen untuk pengendalian hama. Temuan penelitian tahap II memberikan informasi bahwasannya aplikasi bioinsektisida berbahan aktif *L. lecanii* di lapang bersamaan dengan pestisida tertentu tidak mempengaruhi daya bunuhnya terhadap hama sasaran.

KESIMPULAN

- Penelitian tahap I. Preparasi inokulum *L. lecanii* pada media basal I dengan kondisi kultur pH 5, suhu 30 °C, dan periode inkubasi selama 5 hari mampu mengoptimalkan produksi kitinase *L. lecanii*. Peningkatan produksi kitinase ini mampu meningkatkan daya bunuh/patogenisitas *L. lecanii* terhadap *R. linearis*.

- Penelitian tahap II. Bioinsektisida berbahan aktif *L. lecanii* dapat diaplikasikan bersama dengan pestisida berbahan aktif mankozeb.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Indonesia yang telah mendanai penelitian tahap I dan kepada Fakultas MIPA, Universitas Negeri Malang yang telah mendanai penelitian tahap II..

DAFTAR PUSTAKA

- Alves. 1998. Biological Control Efeito de Produtos Fitossanitarios Quimicos Utilizados em Alface e Crisântemo Sobre Furgos Entomopathogenicos. <http://www.Neotrop.Entomol.V.31n2.Iondrina.abr./jun.2002> [8-02-2021].
- Fang. W., Feng, J., Fan, Y., Zhang, Y., Bidochka, M.J., St. Leger, R., Pei, Y. 2009. Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 102:155–159.
- Faria, M. dan Wright, S.P. 2001. Biological Control of *Bemisia tabaci* with fungi. *Crop Protection (Elsevier)*. 20:767-778.
- Hasan S, Anis A, Abinav P, Naushen K, Rishi K, Garima G, 2013. Production of Extracellular Enzymes in the Entomopathogenic Fungus *Verticillium lecanii*. *Bioinformation* 9(5): 238-242.
- Indiati, S.W., Bejo, Rahayu, M. 2017. Diversity of Mung Bean Insect Pest and Their Natural Enemies in Farmer's Fields in East Java, Indonesia. *Biodiversitas*, 18(4): 1300-1307.
- Indriati, G., Samsudin, Amaria, W. 2015. Potensi *Lecanicillium lecanii* untuk pengendalian *Helopeltis antonii* pada Tanaman Teh. *J. TIDP*, 2(2): 99-106.
- Jholapara R.J., Mehta R.S., Bhagwat A.M. and Sawant C.S. (2013). Exploring and Optimizing the Potential of Chitinase Production by Isolated *Bacillus Spp.* *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5: 412-418.

- Khan, S., Guo, L., Shi, H., Mijit., Qiu, D. 2012. Bioassay and enzymatic comparison of six entomopathogenic fungal isolates for virulence or toxicity against green peach aphids *Myzus persicae*. *African Journal of Biotechnology*. 11(77):14193-14203. ISSN 1684-5315.
- Khoiroh, F., Isnawati, Faizah, U. 2014. Patogenitas Cendawan Entomopatogen (*Lecanicillium lecanii*) seagai Bioinsektisida untuk Pengendalian Hama Wereng Coklat secara In Vitro. *LenteraBio*, 3(2): 115-121.
- Koppert, B.V.2002. *General Information*. Netherlands: Berkel en Rodenrijs
- Moctezuma, H.E.F., Gutierrez, C.L-G., Ayala, C. 2014. Effectiveness of *Lecanicillium lecanii* for Control of *Thrips tabaci* Lindeman on Onion Crop. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 4 No. 5, 95
- Muthukhishnan, S., Mun, S., Noh, M.Y., Geisbrecht, Arakane, Y. 2020. Insect Cuticular Chitin Contributes to Form and Function. *Curr Pharm Des*, 26(29): 3530-3545.
- Nampoothiri, K.M., Abdulhameed, S., Szkacs, G., Pandey, A. 2004. Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochemistry*, 39(2004): 1583-1590.
- Krisnawati, A., Bayu, M.S.Y.I., Adie, M.M. 2016. Identification of Soybean Resistance to Pod Sucking Bug (*Riptortus linearis*) by No-Choice Test. *Biosaintifika*, 8(3): 406-413.
- Pinnamaneni, R., Kalidas, P., Rao, K.R.S.S. 2010. Cloning and Expression of *Bbchit1* gene of *Beauveria bassiana*. *The Open Entomology Journal*. 4: 30-35.
- Prayogo, Y. 2011. Isolat Virulen Cendawan Entomopatogen *Lecanicillium lecanii* sebagai Bioinsektisida Untuk Pengendalian Telur Kepik Coklat *Riptortus linearis* (F.) Pada Kedelai. *Buletin Palawija*, No. 21: 39-54.
- Putra, G.M., Hadiastono, T., Afandhi, A., Prayogo, Y. 2013. Patogenisitas Jamur Entomopatogen *Lecanicillium lecanii* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) terhadap *Bemisia Tabaci* (G.) sebagai Vektor Cowpea Mild Mottle Virus (CMMV) pada Tanaman Kedelai. *Jurnal HPT*, 1: 27-39.
- Rebecca L.J., Susithra G., Sharmila S. and Singh A. 2013. Optimization of Physical Parameters for Chitinase Production from *Serratia marcescens*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 4: 1676-1682.
- Rochima, E. 2006. Pemurnian dan karakterisasi Kitin Deasetilase Termostabil dari Bacillus papandayan Asal Kawah Kamojang Jawa Barat. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran, Jatinagor. Bandung 8, 193-209.
- Sinkar, T. A dan Kasav, A.R. 2009. *Isolation and Screening of Bacterial and Fungal Isolates Based on Chitinolytic Enzymes For The Control Of Insect Pests in Agriculture*. Unpublished Dissertation: University of Pune.
- Spindler K.-D. 1997. Chitinase and Chitosanase Assays. In: Chitin Handbook (eds.: R.A.A. Muzzarelli and M.G. Peter), 229-235.
- Suresh PV and Chandrasekaran M. 1999. Impact of Processes Parameters on Chitinase Production By An Alkalophilic Marine *Beauveria Bassiana* in Solid State Fermentation. *Process Biochem*, 34:257– 267
- Tkaczuk, C., Harasimluk, M., Krol, A., Beres, P.K. 2015. The Effect of Selected Pesticides on the Growth of Entomopathogenic Fungi *Hirsutella nodulosa* and *Beauveria bassiana*. *Journal of Ecological Engineering*. 16(3):177-183.
- Vitolo, M. 2020. Brief Review on Enzyme Activity. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 9(2): 60-76.
- Xie, Y., Liu, W., Xue, J., Peng, Z., Han, Zhang, Y. 2010. Integument of soft scale insects and the invasion of the pathogenic fungus *Lecanicillium lecanii*. *Entomologia Hellenica*. 19: 66-75
- Zhu, Y., Pan, J., Qiu, J., Guan, X. 2008. Isolation and Characterization of a Chitinase Gene From Entomopathogenic Fungus *Verticillium lecanii*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39: 314-320