

Komparasi Enzim Kitinase dari *Beauveria bassiana* galur Lokal Sulawesi Selatan Terhadap Mortalitas Ulat Grayak (*Spodoptera litura*)
(*The Comparison Chitinase Enzyme of Beauveria bassiana Local Strain South Sulawesi to Mortality Spodoptera litura*)

Rachmawaty

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Makassar

Abstract

This study aims to determine the enzyme activity of chitinase *B. bassiana* strain found in South Sulawesi. Knowing the relationship between the activity of chitinase enzyme isolate-isolate *B. bassiana* strain in South Sulawesi with mortality grayak caterpillar (*Spodoptera litura*). This descriptive research by linking the enzyme activity of chitinase from *Beauveria bassiana* strain local South Sulawesi on mortality grayak caterpillar larvae (*Spodoptera litura*). Based on the research that has been done shows that the activity of the enzyme from South Sulawesi *B. bassiana* local strains showed differences in each isolate, isolates the origin Enrekang 7.15 units / ml, isolate origin Bantaeng 7.12 units / ml, 6.32 units of isolate origin Pinrang / mi and isolate the origin of Maros 6.2 units / ml. There is a relationship between enzyme activity with mortality rates of larvae of *Spodoptera litura*. The highest mortality is caused by the isolate origin Enrekang 86%, followed by the isolate origin Bantaeng 83%, 76% Pinrang origin isolates and isolate the origin of Maros 73%.

Keywords : *Beauveria bassiana*, enzim kitinase, *Spodoptera litura*

A. Pendahuluan

Untuk mengurangi ketergantungan terhadap pestisida, para ahli dibidang proteksi tanaman telah mencari alternatif lain untuk mengendalikan hama dan pathogen. Cara pengendaliannya antara lain dengan memanfaatkan musuh-musuh alami dari hama dan pathogen tersebut terutama dari golongan mikroorganisme yang lebih dikenal dengan istilah pengendalian secara hayati (*biological control*).

Salah satu alternatif metode pengendalian hama yang dilakukan adalah pengendalian secara biologis. Beberapa cara yang diterapkan antara lain mengintroduksi predator, parasit, pathogen serangga maupun parasitoid. Introduksi pathogen serangga yang digunakan adalah dari kelompok mikrobial mencakup fungi, bakteri, dan virus (Fegatella, 1993). *Beauveria bassiana* merupakan salah satu kapang entomopatogen yang telah digunakan sebagai bahan aktif insektisida atau biasa disebut sebagai mikoinsektisida. Kapang ini tidak hanya menyerang serangga dewasa tapi juga menyerang larva, pupa dan imago yang masih muda. Kapang

ini memiliki spora aseksual berupa konidia bersel satu, bentuknya oval dengan ukuran yang sangat kecil. Spora dan hifa tidak berpigmen sehingga koloninya tampak berwarna putih (Anonim, 2002).

Beberapa galur *B. bassiana* yang telah di isolasi dari berbagai tempat di beberapa Kabupaten di Sulawesi Selatan dilaporkan memiliki daya virulensi yang berbeda. Isolate tersebut umumnya diperoleh pada lahan pertanian jagung, kacang ijo dan padi. Isolat-isolat tersebut telah diuji kemampuan virulensinya terhadap ulat grayak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolate dari Kabupaten Enrekang dan Sengkang memiliki daya virulensi tinggi dibandingkan isolate dari Kabupaten Pinrang dan Maros (Emilia, 2002)

Pencarian galur yang memiliki daya virulensi yang tinggi dalam mematikan serangga sasaran merupakan kajian utama yang telah banyak dilakukan. Akan tetapi komparasi aktivitas enzimatik terhadap mortalitas serangga pada masing-masing isolate belum pernah dilaporkan. Aktivitas enzim yang paling erat kaitannya dengan sifat virulensi adalah kitinase

dan protease. Aktivitas enzim kemungkinan dapat dijadikan sebagai informasi untuk meramalkan tingkat virulensi dari suatu kapang. Untuk itu sangat penting dilakukan penelitian mengenai komparasi aktivitas enzim terhadap mortalitas serangga.

B. Metode Penelitian

1. Isolat *B.bassiana*

Isolat *B.bassiana* yang dijadikan sebagai sampel penelitian merupakan koleksi dari Laboratorium Hama dan Penyakit Tanaman BALITJAS Maros. Selanjutnya isolat *B. bassiana* yang diperoleh ditumbuhkan pada media agar (PDA).

2. Produksi Enzim

Produksi enzim dilakukan dalam media yang terdiri atas: ekstrak khamir 0,45%, pepton 0,1% , KH_2PO_4 0,3%, K_2HPO_4 0,58%, L-sistein HCl 0,1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,26%, Na_2CO_3 0,25%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01%, CaCl_2 0,2%, dan koloid kitin 1% pada pH 7,0, kemudian dicukupkan dengan aquades sebanyak 1000 ml (Meryandini *et al.*, 2004).

3. Pembuatan Koloidal Kitin

Sebanyak 10 gram *crab shell chitin* dicuci dengan 1000 ml akuades menggunakan pengaduk magnetik stirer, lalu disentrifuse selama 10 menit pada kecepatan 3.000 rpm. Endapan diambil, lalu diekstraksi dengan 50,5 ml larutan etanol-eter-asam selama 15 menit. Campuran tersebut disentrifugasi kembali selama 20 menit dengan kecepatan 3.000 rpm. Endapan yang terbentuk diputihkan (bleech) dengan menggunakan 300 ml 0,2 NaClO_2 selama 1 jam pada suhu 75°C dan diaduk menggunakan magnetik stirrer. Campuran tersebut disentrifugasi kembali selama 20 menit dengan kecepatan 3.000 rpm. Endapan yang terbentuk diambil lalu ditambahkan 1 ml aseton dan 250 ml HCl, diaduk sampai semua endapan larut. Langkah ini dilakukan pada suhu 0°C dan dibiarkan semalam. Selanjutnya diberi es (yang dibuat dari 500 ml akuades) dan 1,5 liter akuades, lalu diaduk rata dan dibiarkan semalaman pada suhu 4°C . Campuran tersebut disentrifugasi kembali selama 20 menit dengan kecepatan 3.000 rpm. Diambil endapan berupa pasta putih, lalu dicuci 5 kali menggunakan akuades steril melalui sentrifugasi. Koloidal kitin yang telah diperoleh dimasukkan dalam wadah tertutup dan disimpan pada suhu 4°C .

4. Uji kualitatif kitinase

Jamur ditumbuhkan ke dalam media kitin agar selama 4 hari, lalu diamati terbentuknya zona bening disekitar koloni. Aktivitas enzim secara kualitatif ini diukur dengan cara menentukan aktivitas hidrolisis. Nilai aktivitas ditentukan dengan cara membandingkan antara diameter zona bening dengan diameter koloni jamur.

5. Uji aktivitas kitinase

Masing-masing jamur ditumbuhkan ke dalam media kitin cair. Selanjutnya difermentasi selama 4 hari pada shaker yang berkecepatan 120 rpm pada suhu kamar. Enzim kasar dipanen dengan cara sentrifugasi medium kultur pada 4000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan enzim kasar dan digunakan lebih lanjut untuk uji aktivitas kitinase.

Dasar pengukuran yang digunakan adalah pengurangan jumlah substrat (koloidal kitin) yang ditandai dengan berkurangnya kekeruhan (turbiditas) suspensi koloidal kitin. Langkah kerjanya sebagai berikut:

Substrat disiapkan dengan cara membuat larutan 1% koloidal kitin (b/v) pada 50 mM buffer potassium fosfat dengan pH akhir 6,7. Substrat sebanyak 0,5 ml dicampur dengan larutan enzim kasar sebanyak 0,5 ml, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28°C . Pada larutan yang telah diinkubasi tersebut ditambahkan aquadest sebanyak 3 ml dan diukur nilai serapannya pada panjang gelombang 510 nm. Untuk kontrol digunakan enzim yang telah dinonaktifkan pada suhu 0°C selama 15 menit.

Aktivitas kitinase dinyatakan sebagai persentase reduksi relatif turbiditas terhadap koloidal kitin tanpa enzim (kontrol). Satu unit enzim merupakan jumlah enzim yang diperlukan untuk mereduksi turbiditas 5% koloidal kitin.

6. Perbanyakan Ulat Grayak (*Spodoptera litura*)

Telur ulat grayak dikumpulkan dari lapangan dan di bawah ke laboratorium untuk selanjutnya disimpan dalam wadah pemeliharaan telur sampai berbentuk imago. Imago dikumpulkan dan dimasukkan ke dalam cawan petri plastik dan dibiarkan menetas menjadi larva instar 1-2. Larva yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva instar 2 yang dipilih dari telur-telur yang menetas bersamaan.

7. Uji Mortalitas Ulat Grayak

Pada tiap kantong plastik yang berukuran 10 cm dan tinggi 15 cm, dimasukkan media yang beratnya 100 g. Kantong plastic di masukkan pipa karet sepanjang 10 cm lalu diikat di tengah-tengah mulut kantong. Mulut pipa disumbat dengan

kapas dan ditutup dengan aluminium foil. Setelah itu disterilkan dengan otoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Selanjutnya dilakukan penyaringan media dengan cara sebagai berikut : sebanyak 10 g media ditambahkan dengan 100 mL aquades lalu disaring. Cairan hasil saringan dihitung konsentrasi konidia dengan menggunakan haemositometer. Tiap media diinokulasikan 10 mL hasil saringan yang mempunyai konsentrasi 10^6 konidia spora per millimeter. Daun muda jagung yang berukuran 10 cm sebanyak 10 lembar dicelupkan ke dalam cairan selama 5 menit, lalu diangin-anginkan selama 3 menit. Selanjutnya 10 ekor ulat grayak instar 2 dimasukkan ke dalam wadah percobaan. Pengamatan mortalitas dilakukan selama 12 hari dengan pengamatan setiap 2 hari sekali.

C. Hasil dan Pembahasan

1. Uji Mortalitas Larva *Spodoptera litura*

Berdasarkan hasil pengamatan mortalitas larva ulat grayak (*Spodoptera litura*) akibat daya virulensi *B. bassiana* menunjukkan perbedaan tingkat mortalitasnya. *B. bassiana* galur Maros mengakibatkan mortalitas larva *S. litura* sebesar 73%, *B. bassiana* asal Pinrang mengakibatkan mortalitas larva *S. litura* sebesar 76 %, *B. bassiana* asal Enrekang mengakibatkan mortalitas larva *S. litura* sebesar 86% dan *B. bassiana* asal Bantaeng mengakibatkan mortalitas larva sebesar 83%. Secara keseluruhan tingkat mortalitas larva *S. litura* akibat daya virulensi *B. bassiana* asal local Sulawesi Selatan setelah 10 hari pengamatan dapat dilihat pada tabel 1

Tabel 1: Persentase Mortalitas Larva *Spodoptera litura* akibat daya virulensi dari *B. bassiana*

Asal Isolat	Persentase Mortalitas Larva <i>Spodoptera litura</i>
<i>B. bassiana</i> asal Bantaeng	83%
<i>B. bassiana</i> asal Pinrang	76%
<i>B. bassiana</i> asal Enrekang	86%
<i>B. bassiana</i> asal Maros	73%

2. Uji kualitatif kitinase

Hasil uji kualitatif menggunakan media kitin agar selama 4 hari, lalu diamati terbentuknya zona bening disekitar koloni. Aktivitas enzim

secara kualitatif ini diukur dengan cara menentukan aktivitas hidrolisis. Nilai aktivitas ditentukan dengan cara membandingkan antara diameter zona bening dengan diameter koloni jamur. Didapatkan hasil sebagai berikut :

Tabel 2. Diameter Zona Bening *B. bassiana* pada Media Kitin

Asal Isolat	Diameter zona (mm)		Ratio Hidrolisis
	Zona Bening	Koloni	
<i>B. bassiana</i> asal Bantaeng	10,5	7	1.5
<i>B. bassiana</i> asal Pinrang	9	6	1.5
<i>B. bassiana</i> asal Enrekang	12	6	2
<i>B. bassiana</i> asal Maros	9,2	7	1.3

3. Uji aktivitas kitinase

Berdasarkan hasil uji aktivitas enzim yang diamati dengan menggunakan spektrofotometer didapatkan hasil yaitu:

Tabel 3. Aktivitas Enzim Kitinase *B. bassiana* Galur Lokal Sulawesi Selatan

Asal Isolat	Aktivitas Kitinase (unit/ml)
<i>B. bassiana</i> asal Bantaeng	7,12
<i>B. bassiana</i> asal Pinrang	6,2
<i>B. bassiana</i> asal Enrekang	7.15
<i>B. bassiana</i> asal Maros	6,32

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas enzim kitinase dengan menggunakan media kitin agar didapatkan hasil bahwa pada uji kualitatif yakni melihat kemampuan *B. bassiana* mendegradasi kitin terlihat Isolat asal Enrekang yang memiliki kemampuan paling besar dalam mendegradasi kitin yaitu sebesar 2 pada ratio hidrolisisnya. Begitu juga dengan pada pengujian aktivitasnya dengan menggunakan spektrofotometer terlihat isolate asal Enrekang yang memiliki aktivitas paling tinggi sebesar 7.15 unit/ml.

Isolat dari Bantaeng pada uji kualitatif ratio hidrolitiknya sebesar 1.5 dan uji aktivitas enzimnya sebesar 7.12 dan isolate dari Maros dan Pinrang memiliki kemampuan hampir sama yaitu masing-masing 1,3 aktivitas enzim sebesar 7,12 dan isolat dari Pinrang ratio hidrolitiknya 1,5 dan uji aktivitas enzim kitinase sebesar 6,2.

Jika dihubungkan dengan kemampuan mematikan isolate *B.bassiana* galur lokal Sulawesi Selatan terlihat, isolat asal Enrekang memiliki kemampuan mematikan lebih tinggi yaitu sebesar 86%, diikuti oleh isolat asal Bantaeng 83%, isolat asal Pinrang 76% dan isolat asal Maros sebesar 73%. Hal ini menunjukkan bahwa makin tinggi aktivitas enzim kitinase maka makin tinggi kemampuan isolat tersebut untuk mematikan hama.

Mortalitas larva ditentukan oleh berbagai faktor, tetapi yang penting adalah virulensi dan sifat resistensi inang serta kondisi lingkungan. Salah satu sifat virulensi yang diduga berdampak pada kemampuan patogenitasnya adalah aktivitas enzimatisnya. Kitinase merupakan enzim yang paling bertanggung jawab sebagai faktor patogenitas dari suatu mikroba terhadap suatu hama. Enzim ini mampu merusak tubuh serangga utamanya lapisan kitin sebagai penyusun utama tubuh bagian luar serangga.

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa tingkat virulensi *B. bassiana* terhadap serangga inang sangat bervariasi. Perbedaan virulensi ini dipengaruhi oleh berbagai faktor antara lain karena lingkungan dan perbedaan strain dari *B.bassiana* (Wiryadiputra, 1994). Terjadinya perbedaan ras (strain) dari cendawan dapat disebabkan oleh berbagai faktor antara lain perbedaan inang dan lokasi

D. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Aktivitas enzim dari *B.bassiana* galur lokal Sulawesi Selatan menunjukkan perbedaan setiap isolate, Isolat asal Enrekang 7,15 unit/mil, isolate asal Bantaeng 7,12 unit/mil, isolate asal Pinrang 6,32 unit/mil dan isolate asal Maros 6,2 unit/mil
2. Ada hubungan antara aktivitas enzim dengan tingkat mortalitas larva *Spodoptera litura*. Mortalitas paling tinggi disebabkan oleh isolate asal Enrekang sebesar 86%, diikuti oleh isolate asal Bantaeng 83%, isolate asal Pinrang 76% dan isolate asal Maros 73%.

E. Daftar Pustaka

- Alexopoulos, C.J. 1962. *Introductory Mycology*. USA: John Wiley & Sons Inc.
- Anonim. 2002. *Beauveria bassiana*. [Online], www.vogvelph.ca.
- Anonim. 2008. *Beauveria bassiana Pengendali Walang Sangit*. [Online], <http://www.distan.pemda-diy.go.id>.
- Anonim. 2008. *Kitin, Zat Pelapis yang Sempurna*. [Online], <http://www.oaseislam.com>.
- Anonim. 2008. *Peluang Pemanfaatan Enzim Kitinase di Industri Gula*. [Online], <http://p3gi.net>.
- Cohen-Kupiec R, Chet I. 1998. The Molecular Biology of Chitin Digestion. *Curr Opin Biotechnol* 9: 270-277.
- Daud, D.I., 2003. *Entomopathogen Kapang Sebagai Pengendali Organisme Pengganggu Tanaman*. Makalah Pelatihan Tingkat Nasional Makassar.
- Emilia, A. 2002. *Efektivitas Berbagai Konsentrasi Kapang Beauveria Bassiana Terhadap Hama Rhopalium maidis pada Tanaman Sorgum*. Makassar: FMIPA UNM.
- Fegatella, F, 1993. *Potensi Bacillus thuringiensis Sebagai Agen Pengendali Populasi Hama dalam Pengendalian Hama Terpadu*. Makalah Seminar Sains Nasional. Makassar: FMIPA UNHAS.
- Lehninger. 1997. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: Erlangga.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 1997. *Biology of Microorganisms*. 8th Ed. Prentice Hall, International Inc.
- Murray *et al.* 1996. *Biokimia Harper*, Edisi 24. Alih bahasa Andri hartono. Jakarta: EGC.
- Nelson, T.L., Low, A., Glare, T.R. 1996. *Large Scale Production of New Zealand Galurs of Metarrhizium*. Proc. 49th N.Z. Plant Protection Conf 1996.
- Page, D.S., 1981. *Prinsip-Prinsip Biokimia*, Edisi 2. Alih bahasa, Soendoro. Jakarta: Erlangga.
- Riyatno dan S. Santoso. 1991. *Cendawan Beauveria bassiana Vuillemin dan Cara Perkembangannya guna Pengendalian Hama Bubuk Buah Kopi*. Jakarta: Jenderal Perkebunan.
- Sila, M. 1983. *Microbial Control of Dry Wood Termites, Cryptoterms, Cyanocephales hight (Kalotermitidae, Isoptera)*. MSC. Thesis University of Philippines at Los Banos. 145 pp

Toha, A. 2001. *Biokimia: Metabolisme Biomolekul*. Bandung: Alfabeta.

Wahyudi, P., Pawiroharsono, S., Gandjar. 2002. Optimasi Produksi Mikoinsektisida dari

Beauveria bassiana Pribumi dengan Substrat Tepung Beras. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, Vol 7. No.1 :(4-6)