

Proteolytic Activity of The Entomopathogenic Fungi (*Penicillium* sp.) of Cockroaches (*Periplaneta americana*)

Ahmad Ikhsanudin*, Emantis Rosa, C.N Ekowati

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung,
Jl. Soemantri Brojonegoro, Gedung Meneng, Bandar Lampung, 35145, Lampung, Indonesia
*Email: ahmadikhsanudin21@yahoo.com

ABSTRACT

Cockroaches (*Periplaneta americana*) were the insect vectors of disease that caused adverse effects on human health. Control cockroach excessive use of insecticides can lead to residus in the environment and resistance cockroach. Therefore it was necessary to use an alternatives such as such as entomopathogenic fungal as biological agents. The entomopathogenic fungi penetrated via the integument of an cockroach to reach the hemocoel. Proteins were the molecules responsible for integument strength in cockroach, It was synthesis the proteases to degrading proteins. The study begins with the isolation of entomopathogenic fungi using the moist chamber method with cockroach as insect bait. Fungus that grow on cockroches are cultured and purified on Potato Dextrose Agar (PDA) medium then identified. Identification was carried out through macroscopic observations including colony color and diameter and microscopic observations including conidia, conidiophores, hyphae, vesicles, fialids, and leg cells. The result of isolation and identification obtained as *Penicillium* sp. Proteases enzymatic activity tested on PDA with anlene 1%. The clear zone formed is measured to show the activity of proteases produced by *Penicillium* sp.

Keywords: cockroaches, entomopathogenic fungal, *Penicillium* sp., proteases.

PENDAHULUAN

Kecoa merupakan serangga yang termasuk phylum Arthropoda dari Ordo Orthoptera dan termasuk salah satu serangga yang hidup pada kisaran habitat yang luas (kosmopolitan). Sama seperti serangga lainnya, kecoa mempunyai daya reproduksi yang cukup tinggi. Dalam seminggu dapat menghasilkan kira-kira 15-90 ootecha yang berisi sekitar 15 butir telur untuk setiap ootecha (WHO,1970).

Kecoa dalam kehidupannya berperan sebagai vektor mekanis atau pembawa bibit penyakit baik berupa parasit, cacing dan bakteri seperti *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., yang dapat menyebabkan berbagai masalah kesehatan pada manusia. (Cornwell,1968). Cara pengendalian yang biasa digunakan untuk mengatasi populasi kecoa adalah secara kimiawi yang menggunakan insektisida kimia. Berdasarkan data dari *World Health Organization* (WHO), insektisida yang sering digunakan dalam mengendalikan kecoa diantaranya Prophetamphos, Permethrin, Dichlorvos, Diazinon, dan insektisida kimia lainnya.

Kelebihan pengendalian secara kimiawi antar lain dapat membunuh dalam jumlah yang banyak, tidak membutuhkan waktu yang lama dan hasil lebih cepat terlihat. Namun pengendalian cara kimia ini dapat menimbulkan masalah lain seperti mencemari lingkungan, menimbulkan resistensi terhadap vektor dan menyebabkan matinya hewan yang bukan sasaran.

Oleh karena itu, diperlukan upaya pengendalian hayati dengan memanfaatkan bahan alami yang lebih ramah lingkungan. Salah satu alternatif yang bisa dilakukan yaitu pemanfaatan cendawan entomopatogen sebagai agen hayati pengendali kecoa. Cendawan entomopatogen merupakan golongan cendawan yang mengakibatkan kematian pada serangga. Hal ini disebabkan karena cendawan entomopatogen dapat menghasilkan toksin, selain itu endawan entomopatogen juga menghasilkan beberapa enzim ekstraselluler seperti kitinase, protease, dan lipase yang digunakan oleh cendawan pada waktu untuk menginvasi tubuh serangga target.

Mekanisme infeksi jamur entomopatogen pada tubuh serangga menurut Kanga et al., (2003) yaitu dengan cara menempelnya propagul jamur pada tubuh serangga, selanjutnya propagul berkecambah pada integumen serangga, berikutnya tabung kecambah melakukan penetrasi masuk ke tubuh serangga.

Proses penetrasi dimulai dengan pertumbuhan spora pada kutikula serangga selanjutnya hifa akan mengeluarkan enzim kitinase, lipase, dan protease untuk mendegradasi kutikula serangga (Suntoro, 1991). Pada penelitian ini, akan berfokus pada cendawan entomopatogen penghasil protease. Salah satu jenis protease yang dihasilkan cendawan entomopatogen adalah substilisin protease yang mampu mendegradasi integumen dari serangga [Shaukat,2011].

Untuk itu, dilakukan penelitian untuk mengisolasi cendawan entomopatogen asal kecoa yang mampu menghasilkan protease.

METODE PENELITIAN

Persiapan Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya cawan Petri, tabung reaksi, neraca analitik digital, ose jarum, bunsen, erlenmeyer, beaker glass, gelas ukur, mikroskop, vortex mixer, haemocytometer, autoclave, *Biological Safety Cabinet* (BSC) dan inkubator.

Bahan-bahan yang digunakan diantaranya kecoa, media *Potato Dextrose Agar* (PDA), antibiotik *chloramphenicol*, *Lactophenol Cotton Blue* (LCB), susu anlene, aquades, alkohol 70%, spritus, kapas, tissue, kain kasa, dan *cling wrap*.

Isolasi Cendawan Entomopatogen

Isolasi cendawan entomopatogen menggunakan metode *Moist Chamber*. Yang dilakukan sebagai berikut: Kecoa yang telah disiapkan dibiarkan mati kemudian diletakkan pada cawan Petri yang sudah berisi tissue yang sebelumnya sudah dilembabkan menggunakan aquades steril. Lalu cawan yang sudah berisi kecoa diinkubasi pada suhu 25-28°C selama 7 hari di inkubator.

Pemurnian Cendawan Entomopatogen

Cendawan yang tumbuh pada tubuh kecoa dimurnikan menggunakan media PDA. Selanjutnya cendawan yang mempunyai warna yang berbeda di inokulasikan kedalam media PDA menggunakan ose jarum. Lalu diinkubasi pada suhu 25-28°C selama 7 hari diinkubator. Pemurnian dilakukan sampai mendapatkan cendawan yang hanya mempunyai satu warna.



Gambar 1. Isolasi cendawan entomopatogen menggunakan metode *Moist Chamber*

Identifikasi Cendawan Entomopatogen

Cendawan entomopatogen yang telah murni diamati secara mikroskopis menggunakan metode *slide culture* (Sundari, 2012). Metode ini menggunakan potongan media PDA yang diletakkan dalam *object glass* dalam cawan Petri. Lalu, cendawan entomopatogen dititik menggunakan ose jarum pada media PDA dan ditutup menggunakan *cover glass*. Selanjutnya diinkubasi selama 3-4 hari pada suhu 25-28°C. Setelah isolat tumbuh, *cover glass* diangkat dan diletakkan pada *object glass* baru yang telah ditetesi menggunakan LCB, lalu diamati menggunakan mikroskop. Selanjutnya, diidentifikasi menggunakan buku identifikasi menurut Barnett dan Hunter (1998).

Uji Proteolitik Isolat Cendawan Entomopatogen

Uji proteolitik menggunakan media PDA (200 g kentang, 20 g dextrose, 15 g agar, 1 l aquades). Lalu disterilisasi dalam autoclave selama 15 menit. Selanjutnya ditambahkan antibiotik *chloramphenicol* (500 mg/l) dan susu anlene 1%. Cendawan entomopatogen diinokulasikan dalam cawan Petri yang sudah berisi media uji menggunakan ose

jarum. Lalu diinkubasi selama 3-4 hari pada suhu 25-28°C. Aktivitas proteolitik diamati dari terbentuknya zona jernih yang terdapat disekitar koloni.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi cendawan entomopatogen asal kecoa yang telah dilakukan didapatkan satu genus cendawan entomopatogen (kode P2) yang termasuk dalam genus *Penicillium*.



Gambar 2. Hasil pemurnian cendawan entomopatogen asal kecoa (*P. americana*) pada media PDA.

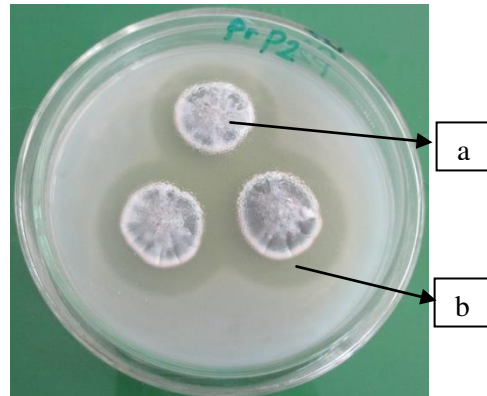
Berdasarkan hasil pengamatan secara makroskopis, menunjukkan adanya koloni cendawan dengan ciri – ciri sebagai berikut: koloni cendawan yang berwarna abu-abu. Sedangkan berdasarkan pengamatan secara mikroskopis, terlihat ciri- ciri koloni cendawan mempunyai konidia yang berbentuk: koloni bulat atau globose, konidiofor mempunyai cabang, mempunyai hifa bersekat, tidak mempunyai vesikel dan sel kaki, mempunyai fialid tunggal yang dapat dilihat pada (Gambar 3).



Gambar 3. Hasil pengamatan mikroskopis *Penicillium* sp.

Selanjutnya isolat *Penicillium* sp. yang sudah didapatkan kemudian diuji aktivitas proteolitiknya menggunakan media uji yang sudah disediakan dan dari hasil pengamatan

yang dilakukan disekitar koloni didapatkan luas zona jernih sebesar 1,5 cm yang dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil Uji Proteolitik *Penicillium* sp. (a) koloni *Penicillium* sp. (b) zona jernih yang terbentuk

Terbentuknya zona jernih disekitar koloni menurut Susanti (2002) disebabkan karena adanya aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh *Penicillium* sp. itu sendiri, yang dapat menyebabkan terjadinya degradasi kasein dalam skim milk sebagai substrat protease sehingga terbentuk zona jernih disekitar koloni cendawan.

Selain itu cendawan proteolitik mampu memproduksi enzim protease yang berperan dalam proses hidrolisis kasein menjadi peptida-peptida dan asam-asam amino yang larut dalam media. Terjadinya aktivitas proteolitik yang semakin tinggi ditunjukkan dengan semakin luas zona jernih yang terbentuk (Irena, 2010).

KESIMPULAN

Hasil isolasi cendawan entomopatogen yang sudah dilakukan didapatkan cendawan entomopatogen yang termasuk golongan *Penicillium* sp. yang mempunyai aktivitas proteolitik sebesar 0,6.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, Shaukat. (2011). Production and Regulation of Extracellular Proteases from the Entomopathogenic Fungus *Metarhiziumanisopliae* (Cordycipitaceae; Hipocreales) in the Presence of Diamondback Moth Cuticle. Pakistan. *J. Zool.*, vol. 43 (6), pp. 1203-1213.

- Cornwell PB. (1968). *The cockroach*. Vol. 1. London. Hutchinson
- Irena, A. (2010). *Isolasi dan Optimasi Protease Bakteri Termofilik dari Sumber Air Panas Tangkuban Perahu Bandung*. Unpublished Thesis, Departemen Biokimia FMIPA IPB. Bogor.
- Kanga, L.B.B., W.A. Jones, and R.R. James. (2003). Field trials using fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes:Hyphomycetes) to control the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* (Acari:Varroidae) in honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae) colonies. *J. Entomol.* (96):1091–1099
- Steven. (2013). *Entomological notes*. Department of Entomology. The Pennsylvania State University.
- Sundari. (2012). Suatu Model Pengembangan Media Pembelajaran *Slide Culture* untuk Pengamatan Struktur Mikroskopis Kapang pada Mata Kuliah Mycology. *Jurnal Bioedukasi*. 1(1): 39-47
- Susanti, E. (2002). *Petunjuk Praktikum Biokimia*. Jurusan Kimia FMIPA UM. Malang
- Suntoro. (1991). Uji Efikasi *Beauveria bassiana* (Balls) Vuill Terhadap *Hypothenemus hampai* (Ferr). Tesis. Fakultas Pascasarjana UGM. Yogyakarta
- World Health Organization. (1970). Tentative instructions for determining the susceptibility or resistance of cockroaches to insecticides. *Technical Report Series*. No. 443. Geneva. 130-133.