

JAMUR ENTOMOPATOGEN DAN AKTIVITAS ENZIM EKSTRASELULERNYA [Entomopathogenic fungi and their extracellular enzyme activity]

Suciatmih^{1✉}, Titik Kartika² dan Sulaeman Yusuf²

¹Bidang Mikrobiologi, Pusat penelitian Biologi – LIPI

²Pusat Penelitian Biomaterial - LIPI

CSC Jl. Jakarta – Bogor Km 46, Cibinong, Bogor

email: suciatmih2008@yahoo.ca

ABSTRACT

Isolation of entomopathogenic fungi and their extracellular enzyme activity from rhizosphere soil were carried out. Soil samples were collected from rhizosphere under *Arecaceae* plant collection and a shrub in Bogor Botanic Garden, West Java; and another samples were gathered from forest floor on peat land in Sebangau National Park, Central Kalimantan. Insect bait method was used to catch fungi from soil samples by using *Coptotermes* sp. termites and *Xystrycera festiva* larva in the laboratory. A total of 38 fungal isolates belonging to 18 species and 12 genera were successfully isolated and identified. Isolated fungi were dominated by Deuteromycotina; and *Fusarium* is the most common (5 species). Peat and *Pinanga coronata* rhizospheres; and termites bait gave the highest fungal diversity of 9 species respectively. All fungal isolates did not indicate chitinase activity, but 60.53 %, 10.53 % and 13.16 % had both of lipase and protease; lipase and protease activities, respectively. Only 15.79 % fungal isolates were negatively in lipase or protease activities.

Key words: insect-associated fungi, chitinase, lipase, protease

ABSTRAK

Telah dilakukan isolasi jamur entomopatogen dan aktivitas enzim ekstra selulernya dari tanah rizosfer tanaman. Sampel tanah dikoleksi dari rizosfer di bawah koleksi tanaman *Arecaceae* dan semak belukar yang ada di Kebun Raya Bogor, Jawa Barat; dan sampel lainnya dikumpulkan dari lantai hutan pada lahan gambut Taman Nasional Sebangau, Kalimantan Tengah. Di laboratorium, untuk menangkap jamur dari sampel tanah menggunakan metode umpan serangga dengan ulat *Xystrycera festiva* dan rayap *Coptotermes* sp. Berhasil diisolasi dan diidentifikasi sebanyak 38 isolat jamur yang masing-masing termasuk dalam 18 spesies dan 12 marga (genus). Jamur yang terisolasi didominasi oleh Deuteromycotina; dan *Fusarium* merupakan marga jamur yang banyak ditemukan, yaitu 5 spesies. Rizosfer gambut dan *Pinanga coronata*; serta umpan rayap menghasilkan diversitas jamur tertinggi masing-masing 9 spesies. Semua isolat jamur tidak menghasilkan aktivitas kitinase, tetapi 60,53 %, 10,53 % dan 13,16 % masing-masing mempunyai aktivitas lipase dan protease; lipase serta protease. Hanya 15,79 % isolat jamur tidak mempunyai aktivitas lipase atau protease.

Kata kunci: jamur yang berasosiasi dengan serangga, kitinase, lipase, protease

PENDAHULUAN

Penggunaan insektisida untuk mengendalikan hama tanaman dapat merugikan pada banyak organisme non-target di alam. Penggunaan insektisida yang tidak bijaksana juga dapat mengakibatkan timbulnya strain hama yang resisten terhadap bahan kimia tersebut. Pengendalian hayati pada hama tanaman dengan menggunakan jamur entomopatogen merupakan pendekatan alternatif yang perlu dikembangkan sebab relatif murah, mudah dilakukan dan bersifat ramah lingkungan.

Ravensberg (2010) menginformasikan bahwa jamur memainkan peranan penting sebagai patogen serangga dan dapat menekan serangga melalui *epizootic* di alam. Jamur dapat menginfeksi rentang yang sangat luas dari serangga termasuk larva Lepidoptera (Kulkarni and Lingappa, 2002), nematoda (Kiewnick and Sikora, 2006), kutu daun (Ujjan and Shahzad, 2012) dan thrips (Ugine *et al.*, 2005) yang banyak menimbulkan masalah besar pada tanaman pertanian di seluruh dunia.

Jamur diketahui juga sebagai agen yang menjanjikan untuk pengendalian vektor, seperti nyamuk (Mnyone *et al.*, 2010; Paula *et al.*, 2011; Singh and Prakash, 2011), *triatomine* (Gutiérrez *et al.*, 2003; Forlani *et al.*, 2011) dan kutu (Stafford III and Allan, 2010) yang masing-masing menyebabkan penyakit demam berdarah, filariasis dan malaria; penyakit *chagas* dan penyakit *lyme*. Fungsi jamur pada pengendalian vektor menjadi penting untuk mengatasi kecepatan transmisi beberapa parasit yang menyebabkan penyakit-penyakit tersebut.

Ravensberg (2010) melaporkan bahwa hanya sedikit spesies jamur dengan aktivitas entomopatogen yang digunakan untuk pengendalian hama. Oleh karena itu, penting untuk mengintensifkan isolasi jamur tersebut untuk mendapatkan spesies dan strain baru yang lebih kuat. Isolasi jamur entomopatogen diperlukan untuk memberikan pemahaman baru ke depan dalam pemanfaatan keanekaragaman hayati jamur, dan untuk menyediakan sumber agen pengendalian hayati.

Tanah rizosfer tumbuhan, salah satunya berfungsi untuk menyimpan atau menyediakan jamur patogen terhadap serangga. Tanaman Arecaceae yang ditanam di Kebun Raya Bogor adalah salah satu koleksi tanaman yang dibudidayakan (ada gangguan) secara monokultur yang spesiesnya cukup banyak. Semak belukar dan gambut merupakan ekosistem yang ditumbuhi beraneka tumbuhan yang tidak dibudidayakan (tidak terganggu). Kedua ekosistem yang berbeda tersebut tentunya akan mempengaruhi keberadaan jamur yang ada.

Beberapa spesies jamur entomopatogen yang ditemukan baik di tanah yang digunakan untuk budidaya tanaman maupun yang tidak adalah *Beauveria* spp., *Metarhizium anisoplae* var. *anisoplae* (Metschn.) Sorokin, dan *Paecilomyces* spp. (Keller and Zimmerman, 1989). Spesies jamur lainnya yang termasuk patogen oportunistis dan pengkoloni sekunder juga dapat mempengaruhi serangan terhadap serangga dan dapat menekan populasinya (Gunde-Cimerman *et al.*, 1998).

Produksi enzim ekstraseluler dari jamur entomopatogen merupakan salah satu rangkaian dari proses infeksi pada serangga. Enzim penting yang disekresikan oleh jamur entomopatogen adalah kitinase, lipase dan protease (Smith *et al.*, 1981). Beberapa jamur yang sudah dilaporkan menghasilkan enzim kitinase adalah jamur *B. bassiana* (Fang *et al.*, 2005; Sanivada and Challa, 2014), *M. anisoplae* (Rustiguel *et al.*, 2012; Sanivada and Challa, 2014) dan *P. lilacinus* (Park *et al.*, 2004). Isolat jamur *B. bassiana* menghasilkan aktivitas protease (Feng, 1998); *M. anisoplae* menghasilkan aktivitas lipase and protease (Nahar *et al.*, 2004); serta *P. lilacinus* menghasilkan aktivitas protease (Park *et al.*, 2004).

Tujuan penelitian adalah mengisolasi, mengidentifikasi dan mengevaluasi aktivitas enzim ekstraseluler dari jamur entomopatogen pada tanah rizosfer tanaman yang dibudidayakan (ada gangguan) dan tidak dibudidayakan (tidak terganggu). Jamur yang terisolasi merupakan sumber genetik yang dapat dimanfaatkan untuk tujuan pengendalian hayati.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan penelitian

Bahan hidup yang digunakan dalam penelitian berupa ulat *Xystrocera festiva* (Coleoptera) diperoleh

dari pasar dan rayap *Coptotermes* sp. merupakan koleksi Pusat Penelitian Biomaterial, LIPI. Bahan kimia yang digunakan adalah agar (Oxoid), alkohol 70 % (teknis), bayclin (Johnson), glukosa (Merck), HCl 37 % (Merck), KH₂PO₄ (Oxoid), kitin Crustacea (Oxoid), kloramfenikol (Oxoid), MgSO₄.7H₂O (Oxoid), Na₂CO₃ (Oxoid), NaOH 1 M (Oxoid), parafin cair (teknis), pepton (Oxoid), *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Oxoid), susu skim (Dancow), *triglyceride* (Merck), tween 80 (Merck) dan *yeast extract* (Oxoid).

Tanah rizosfer tanaman

Tanah rizosfer tanaman sebagai tempat penyimpanan atau penyediaan jamur entomopatogen diambil dari Arecaceae koleksi Kebun Raya Bogor, seperti (1) *Eugeissona utilis* Becc.; (2) *Pactris major* (Jacq) Kosterm. C & S; (3) *Pinanga coronata* (Blume ex Mart.) Blume; (4) *Cyrtostachys microcarpa* Burn.; (5) *Ptychosperma macarthurii* (H.A. Wendl.) Nicholson; dan (6) semak belukar di dekat koleksi tanaman Arecaceae. Tanah rizosfer tanaman gambut dikoleksi dari Taman Nasional Sebangau, Kalimantan Tengah. Sebanyak 250 g masing-masing tanah rizosfer tanaman diambil dari kedalaman 5-15 cm pada beberapa lokasi di sekitar tanaman kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik. Masing-masing tanah rizosfer tanaman dikering anginkan selama 1 minggu kemudian diayak dengan ayakan 600 mesh.

Pengumpanan

Rayap *Coptotermes* sp. (Insecta: Isoptera: Rhinotermitidae) dan ulat *Xystrocera festiva* Pascoe (Insecta: Coleoptera: Cerambycidae) digunakan sebagai umpan untuk mendeteksi dan mengisolasi jamur entomopatogen dari tanah rizosfer tanaman (Sun *et al.*, 2008a yang dimodifikasi). Sebanyak 25 g masing-masing tanah rizosfer tanaman dimasukkan dalam cawan Petri kemudian diberi 3 ulat atau 3 rayap sebagai umpan agar terserang jamur. Cawan Petri diinkubasi dalam suhu ruang (27° C) selama 2 minggu (ulat dan rayap sudah mati). Masing-masing perlakuan diulang 3 x. Ulat dan rayap mati akibat perlakuan selanjutnya dibersihkan dari tanah yang melekat dengan kuas dan disterilisasi permukaannya dengan 1% natrium hipoklorit selama 3 menit. Ulat dan rayap kemudian dibilas dengan air yang telah disterilisasi sebanyak 3 kali dan dikering anginkan diatas kertas saring yang telah disterilisasi.

Isolasi jamur

Isolasi jamur entomopatogen menggunakan metode Hasan *et al.* (2012) yang dimodifikasi. Masing-masing ulat atau rayap mati dihancurkan dan dimasukkan dalam tabung reaksi berisi air yang telah disterilisasi kemudian divortek selama ½ jam. Sebanyak 0,2 ml suspensi ulat atau rayap dari masing-masing tanah rizosfer tanaman disebar dengan batang kaca bengkok diatas media *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang mengandung 0,01 g/l kloramfenikol. Cawan Petri kemudian diinkubasi pada suhu ruang (27°C) selama tiga hari. Koloni tunggal dari jamur pada masing-masing cawan Petri diambil dan ditransfer ke media PDA dan diinkubasi selama 1-4 minggu.

Identifikasi jamur

Isolat tunggal dari jamur kemudian diidentifikasi secara morfologi meliputi pengamatan makroskopis maupun mikroskopis. Pengamatan makroskopis jamur meliputi: (1) pemeriksaan warna dan permukaan koloni (granular; seperti tepung; menggunung; licin; ada atau tidak adanya tetes-tetes eksudat); (2) ada atau tidak adanya garis-garis radial dari pusat koloni ke arah tepi koloni; (3) ada atau tidak adanya lingkaran konsentris, sedangkan pengamatan mikroskopis jamur meliputi: (1) ada atau tidak adanya septum pada hifa; (2) pigmentasi hifa (tidak berwarna atau berwarna gelap); (3) bentuk hifa (seperti spiral, bernodul atau mempunyai rizoid); dan (4) ukuran, warna, hiasan serta bentuk spora atau konidia (Domsch *et al.*, 1980). Isolat jamur yang sudah teridentifikasi dan berpotensi menghasilkan enzim disimpan dalam InaCC, Cibinong (dalam proses migrasi dari LIPI MC ke InaCC). Oleh karena itu, dalam tulisan ini masih menggunakan No LIPI MC.

Aktivitas kitinase

Aktivitas kitinase dari jamur diuji menggunakan metode Lingappa and Lockwood (1962). Medium yang mengandung koloid kitin digunakan sebagai sumber karbon dan nitrogen. Medium kitin agar dituang ke dalam cawan petri berdiameter 5 cm kemudian diinokulasi dengan masing-masing isolat jamur dan diinkubasi pada suhu ruang (27 °C) selama 3 hari. Aktivitas kitinase diindikasikan dengan adanya zona bening di sekitar

masing-masing koloni jamur.

Aktivitas lipase

Metode yang digunakan untuk determinasi aktivitas lipase adalah modifikasi metode Peterson and Johnson (1949). *Triglyceride* digunakan sebagai substrat untuk menguji aktivitas lipase. Sebanyak 35 µl *triglyceride* ditambahkan pada 5 ml medium dan dikocok dengan vortex selama 1 menit kemudian dituang ke dalam cawan Petri berdiameter 5 cm. Cawan Petri berisi medium diinokulasi dengan masing-masing isolat jamur dan diinkubasi pada suhu ruang (27°C) selama 3 hari. Aktivitas lipase ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar masing-masing koloni jamur.

Aktivitas protease

Susu skim digunakan sebagai substrat untuk menguji aktivitas protease dengan menggunakan metode Uria *et al.* (2006 *unpublihed*). Medium protease dituangkan ke dalam cawan petri berdiameter 5 cm kemudian diinokulasi dengan masing-masing isolat jamur dan diinkubasikan pada suhu ruang (27°C) selama 3 hari. Aktivitas protease ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar masing-masing koloni jamur.

HASIL

Isolasi dan identifikasi jamur

Diversitas jamur yang terisolasi dengan metode umpan ulat dari tanah rizosfer tanaman *Arecaceae* dan gambut diperlihatkan dalam Tabel 1 dan Gambar 1. Berhasil diisolasi 17 dan 9 spesies jamur masing-masing dari tanah rizosfer tanaman *Arecaceae* (*Eugeissona utilis*, *Pactris major* dan *Pinanga coronata*); dan gambut. Tanah rizosfer tanaman gambut yang digunakan untuk menempatkan ulat menghasilkan 9 spesies jamur, sedangkan tanah rizosfer *P.*, *coronata*, *E. utilis* dan *P. major* menghasilkan jumlah jamur masing-masing 9, 5 dan 3 spesies. Tujuh belas spesies jamur yang diisolasi dari tanah rizosfer tanaman *Arecaceae* diketahui semuanya termasuk dalam Deuteromycotina, sedangkan 9 spesies jamur yang diisolasi dari tanah rizosfer tanaman gambut termasuk dalam Deuteromycotina dan Zygomycotina.

Tabel 2 dan Gambar 1 menyajikan diversitas jamur yang terisolasi dengan metode umpan ulat dan

Tabel 1. Diversitas jamur yang terisolasi dari umpan ulat (*Diversity of fungi isolated from larva bait*)

No	Jamur (<i>Fungi</i>)	<i>E. utilis</i>	<i>P. major</i>	<i>P. coronata</i>	Gambut (<i>Peat</i>)
Deuteromycotina					
1.	<i>Acremonium</i> sp. (745; 958)	+	-	-	+
2.	<i>Aspergillus chevalieri</i> (L. Mangin) Thom & Church (842)	-	-	-	+
3.	<i>Aspergillus</i> sp. (790; 843; 856)	+	-	+	+
4.	<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill. (759)	-	-	+	-
5.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht. (853; 916; 754; 854)	+	+	+	+
6.	<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. (951)	-	-	+	-
7.	<i>Fusarium</i> sp. 1 (944)	-	-	+	-
8.	<i>Fusarium</i> sp. 2 (941)	-	+	-	-
9.	<i>Gliocladium (Trichoderma) virens</i> Miller, Giddens and Foster (849; 947)	-	-	+	+
10.	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metchnikoff) Sorokin (1543)	-	-	+	-
11.	<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson (861; 860; 838)	+	-	+	+
12.	<i>Penicillium</i> sp. 1 (799; 945)	+	-	-	+
13.	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (837; 850; 862)	-	+	+	+
Zygomycotina					
14.	<i>Syncephalastrum</i> sp. (865)	-	-	-	+
	Total	5	3	9	9

Catatan: + = ada; - = tidak ada (*Note: + = present; - = absent*)

rayap dari tanah rizosfer tanaman Arecaceae dan semak belukar. Dengan rizosfer tanaman yang sama (*Cyrtostachys microcarpa*, *Ptychosperma macarthurii* dan semak belukar), umpan rayap menghasilkan lebih banyak jamur yang terisolasi (9 spesies) daripada umpan ulat (3 spesies). Jamur yang terisolasi dengan umpan ulat termasuk dalam Deuteromycotina dan Zygomycotina, sedangkan jamur yang terisolasi dengan umpan rayap termasuk dalam Ascomycotina, Deuteromycotina dan Zygomycotina.

Deteksi enzim

Tabel 3 dan Gambar 2 menunjukkan bahwa dari 29 isolat jamur yang terisolasi dari umpan ulat, semuanya tidak menghasilkan aktivitas kitinase, tetapi beberapa isolat menghasilkan aktivitas lipase dan protease. Tujuh belas isolat (58,62 %), 3 isolat (10,34 %) dan 4 isolat (13,79 %) dari 29 isolat jamur

masing-masing menghasilkan aktivitas lipase dan protease; lipase serta protease. Lima isolat (17,24 %) dari 29 isolat jamur, yaitu *C. elegans* (952), *G. virens* (849), *P. lilacinus* (838), *Syncephalastrum* sp. (865) dan *T. harzianum* (966) selain tidak menghasilkan aktivitas kitinase juga diketahui tidak menghasilkan aktivitas lipase maupun protease.

Tabel 3 dan Gambar 2 menunjukkan pula bahwa dari 9 isolat jamur yang terisolasi dari umpan rayap, semuanya tidak menghasilkan aktivitas kitinase, tetapi beberapa isolat menghasilkan aktivitas lipase dan protease. Enam isolat (66,67 %), 1 isolat (11,11 %) dan 1 isolat (11,11 %) dari 9 isolat jamur masing-masing menghasilkan aktivitas lipase dan protease; lipase serta protease. Hanya 1 isolat (11,11 %) dari 9 isolat jamur, yaitu *Penicillium* sp. 2 (959) selain tidak menghasilkan aktivitas kitinase juga

Tabel 2. Diversitas jamur yang terisolasi dari umpan ulat dan rayap (*Diversity of fungi isolated from larva and termites bait*)

No	Jamur (<i>Fungi</i>)	<i>C. microcarpa</i>		<i>P. macarthurii</i>		Semak belukar (<i>Shrub</i>)	
		Ulat/ <i>Larva</i>	Rayap/ <i>Termites</i>	Ulat/ <i>Larva</i>	Rayap/ <i>Termites</i>	Ulat/ <i>Larva</i>	Rayap/ <i>Termites</i>
Ascomycotina							
1.	<i>Byssochlamys</i> sp. (Anamorf: <i>Paecilomyces</i>) (983)	-	-	-	+	-	-
Deuteromycotina							
2.	<i>Acremonium</i> sp. (1503)	-	+	-	-	-	-
3.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht. (965)	-	-	-	+	-	-
4.	<i>Fusarium</i> sp. 2 (877)	-	-	-	-	-	+
5.	<i>Fusarium</i> sp. 3 (954)	-	-	-	-	+	-
6.	<i>Penicillium</i> sp. 2 (962; 959)	-	-	-	+	-	+
7.	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (966; 1904; 967)	+	+	-	-	-	+
Zygomycotina							
8.	<i>Cunninghamella elegans</i> Lendner (952; 963)	-	-	+	-	-	+
	Total	1	2	1	3	1	4

Catatan: + = ada; - = tidak ada (*Note: + = present; - = absent*)

diketahui tidak menghasilkan aktivitas lipase maupun protease.

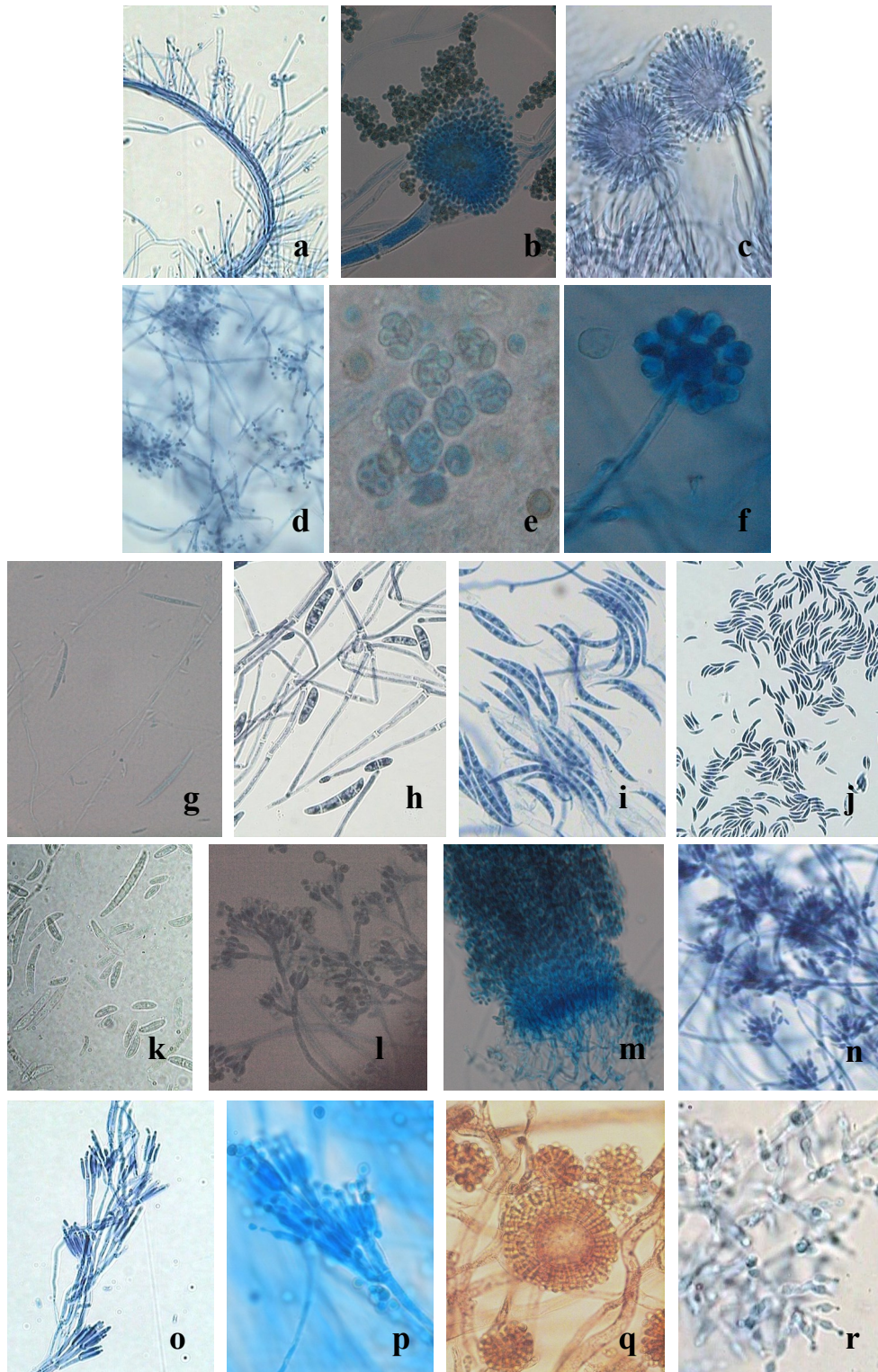
PEMBAHASAN

Jamur entomopatogen dapat diisolasi dari ulat dan rayap mati setelah ditempatkan pada semak belukar dan berbagai tanah rizosfer tanaman *Arecaceae* koleksi Kebun Raya Bogor; dan tanah rizosfer tanaman gambut Taman Nasional Sebangau, Kalimantan Tengah (Tabel 1 dan 2). Tanah rizosfer tanaman memainkan peranan penting sebagai tempat penyimpanan atau penyediaan jamur entomopatogen.

Tiga puluh delapan isolat jamur yang diperoleh dari penelitian ini didominasi oleh Deuteromycotina (89,47%), diikuti Zygomycotina (7,89%) dan Ascomycotina (2,63%). Karakter morfologi jamur dari Deuteromycotina memiliki sejumlah besar konidia yang berukuran kecil sehingga konidia dapat menyebar dalam jarak yang jauh untuk meningkatkan populasinya (Swier *et al.*, 2011). Penelitian ini menunjukkan pula bahwa dengan metoda umpan ulat dan rayap, *Fusarium* merupakan marga jamur yang

banyak ditemukan, yaitu 5 spesies diikuti oleh *Aspegillus* and *Penicillium*, masing-masing dengan 2 species. Marga *Fusarium* dan *Penicillium* diisolasi dari setiap percobaan (Tabel 1 dan 2) sehingga dapat dilaporkan bahwa ke duanya adalah jamur yang umum pada ulat dan rayap.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dengan umpan yang sama (ulat), diversitas jamur yang terisolasi dari masing-masing tanaman *Arecaceae* (*E. utilis*, *P. major* dan *P. coronata*) yang tumbuh di Kebun Raya Bogor dan gambut menunjukkan perbedaan (Tabel 1). Demikian pula dengan umpan yang berbeda (rayap dan ulat), diversitas jamur yang terisolasi dari masing-masing tanaman *Arecaceae* (*C. microcarpa* dan *P. macarthurii*) dan semak belukar yang masing-masing tumbuh di Kebun Raya Bogor menunjukkan perbedaan (Tabel 2). Komposisi populasi dan aktivitas mikroba tanah banyak dipengaruhi oleh sifat-sifat fisika dan kimia tanah, iklim serta vegetasi (Jha *et al.*, 1992) dan aktivitas manusia (Sun *et al.*, 2008a). Dalam hal ini vegetasi dan aktivitas manusia dapat mempengaruhi diversitas jamur ento-



Gambar 1. Jamur entomopatogen (*Entomopathogenic fungi*) 1000 x. a . *Acremonium* sp., b. *Aspergillus chevalieri*, c. *Aspergillus* sp., d. *Beauveria bassiana*, e. *Byssosclamyces* sp., f. *Cunninghamella elegans*, g. *Fusarium oxysporum*, h. *Fusarium solani*, i. *Fusarium* sp. 1, j. *Fusarium* sp. 2, k. *Fusarium* sp. 3, l. *Gliocladium virens*, m. *Metarhizium anisopliae*, n. *Paecilomyces lilacinus*, o. *Penicillium* sp. 1, p. *Penicillium* sp. 2, q. *Syncephalastrum* sp., dan r. *Trichoderma harzianum*.

Tabel 3. Aktivitas enzim ekstraseluler jamur yang terisolasi dari umpan ulat dan rayap (*Extracellular enzyme activity of fungi isolated from larva and termites baits*)

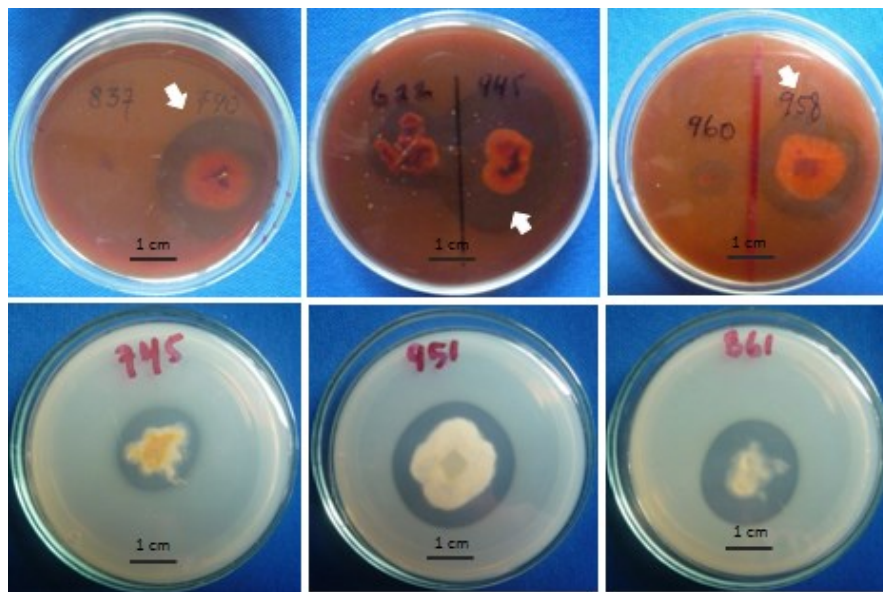
No	Jamur (<i>Fungi</i>)	Aktivitas enzim (<i>Enzyme activity</i>)		
		Kitinase (<i>Chitinase</i>)	Lipase	Protease
Umpan ulat (<i>Baiting by larva</i>)				
1.	<i>Acremonium</i> sp. (745)	–	+	+
	(958)	–	+	+
2.	<i>Aspergillus chevalieri</i> (842)	–	+	+
3.	<i>Aspergillus</i> sp. (790)	–	+	+
	(843)	–	+	+
	(856)	–	+	–
4.	<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill. (759)	–	–	+
5.	<i>Cunninghamella elegans</i> (952)	–	–	–
6.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht. (754)	–	–	+
	(853)	–	+	+
	(854)	–	+	+
	(916)	–	+	+
7.	<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. (951)	–	+	+
8.	<i>Fusarium</i> sp. 1 (944)	–	+	–
9.	<i>Fusarium</i> sp. 2 (941)	–	+	+
10.	<i>Fusarium</i> sp. 3 (954)	–	+	+
11.	<i>Gliocladium virens</i> Miller, Giddens and Foster			
	(849)	–	–	–
	(947)	–	+	–
12.	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metchnikoff) Sorokin (1543)	–	+	+
13.	<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson			
	(860)	–	–	+
	(861)	–	+	+
	(838)	–	–	–
14.	<i>Penicillium</i> sp.1 (945)	–	+	+
	(799)	–	+	+
15.	<i>Syncephalastrum</i> sp. (865)	–	–	–
16.	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (837)	–	+	+
	(850)	–	–	+
	(862)	–	+	+
	(966)	–	–	–
Umpan rayap (<i>Baiting by termites</i>)				
1	<i>Acremonium</i> sp. (1503)	–	+	+
2	<i>Byssosclamyces</i> sp. (983)	–	+	+
3	<i>C. elegans</i> Lendner (963)	–	+	–
4	<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht. (965)	–	+	+
5	<i>Fusarium</i> sp. 2 (877)	–	+	+
6	<i>Penicillium</i> sp. 2 (959)	–	–	–
	(962)	–	–	+
7	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1904)	–	+	+
	(967)	–	+	+

Catatan: + = ada; - = tidak ada (Note: + = present; - = absent)

mopatogen. Gambut dan semak belukar dengan vegetasi campuran dan relatif tidak terganggu oleh manusia memiliki diversitas jamur tinggi masing-masing 9 dan 5 spesies. Demikian pula di antara tanaman *Arecaceae* yang tumbuh secara monokultur dan agak terganggu, *P. coronata* juga memiliki diversitas jamur tinggi (9 spesies). Meskipun gambut dan

P. coronata memiliki diversitas jamur yang sama (9 spesies), tanah gambut memiliki jamur yang lebih bervariasi (*Deuteromycotina* dan *Zygomycotina*), sedangkan *P. coronata* hanya memiliki jamur yang termasuk dalam *Deuteromycotina*.

Umpan yang berbeda (ulat dan rayap) pada masing-masing tanaman *Arecaceae* (*C. microcarpa*



Gambar 2. Aktivitas lipase dari *Aspergillus* sp.(790), *Penicillium* sp.1 (945) dan *Acremonium* sp. (958); serta aktivitas protease dari *Acremonium* sp. (745), *Fusarium solani* (951) dan *Paecilomyces lilacinus* (861) [Lipase activity of *Aspergillus* sp.(790), *Penicillium* sp. 1 (945) and *Acremonium* sp. (958); and protease activity of *Acremonium* sp. (745), *Fusarium solani* (951) and *Paecilomyces lilacinus* (861)]

dan *P. macarthurii*) serta semak belukar yang masing-masing tumbuh di Kebun Raya Bogor memiliki diversitas jamur yang berbeda (Tabel 2). Umpun rayap memiliki diversitas jamur (9 spesies) lebih besar daripada umpun ulat (3 spesies). Hal ini dapat terjadi mungkin selain rayap lebih lincah bergerak daripada ulat sehingga memungkinkan lebih banyak kontak dengan tanah rizosfer yang diuji, rayap juga tergolong *detritivore* atau pemakan bahan tanaman mati dan kotoran binatang (Freyman *et al.*, 2008; de Souza and Brown, 2009). Di lain pihak, ulat bukan tergolong *detritivore*, tetapi pemakan tanaman hidup sehingga tidak dapat memakan tanah rizosfer. Ferron (1985) menginformasikan bahwa ada empat tahapan mekanisme penyakit pada serangga yang disebabkan oleh jamur, yaitu (1) inokulasi atau kontak antara propagul jamur dengan tubuh serangga; (2) proses penempelan dan perkecambahan propagul jamur pada integumen serangga; (3) penetrasi dan invasi; serta (4) destruksi pada titik penetrasi dan terbentuknya konidia yang kemudian beredar ke dalam hemolimfa dan membentuk hifa sekunder untuk menyerang jaringan lainnya

Jamur entomopatogen yang terisolasi dalam penelitian ini adalah *Acremonium*, *Aspergillus*

chevalieri, *Aspergillus* sp., *Beauveria bassiana*, *Byssochlamys* sp. (anamorf: *Paecilomyces*), *Cunninghamella elegans*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Fusarium* spp., *Gliocladium (Trichoderma) virens*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium* spp., *Syncephalastrum* dan *Trichoderma harzianum*. Beberapa penelitian berikut yang mendukung hasil penelitian jamur entomopatogen yang terisolasi dalam penelitian ini melaporkan bahwa *B. bassiana* dan *M. anisopliae* adalah jamur patogen pada *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) (Cherry *et al.*, 2005), *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera: Buprestidae) (Marannino *et al.*, 2006), *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), *bean-weevil*, *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera, Bruchidae) (Pedrini *et al.*, 2007), *Oryctes elegans* (Coleoptera: Scarabaeidae) (Latifian and Rad, 2012) dan caplak *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Ren *et al.*, 2012). Samek *et al.* (2006) menginformasikan bahwa *Acremonium strictum* diisolasi dari pupa *Cameraria ohridella* Deschka et Dimic. *Paecilomyces lilacinus* dilaporkan sebagai jamur patogen pada vektor penyakit *chagas*, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) (Gerrardo *et al.*, 2006), *glasshouse whitefly* (GWF), *Trialeurodes vaporarior-*

rum (Gokce and Er, 2005), nematoda *Meloidogyne javanica* (Esfahani and Pour, 2006), nematoda *Meloidogyne hapla* (Kiewnick and Sikora, 2006), greenhouse white fly (*Trialeurodes vaporariorum*), glasshouse red spider mite (*Tetranychus urticae*), kutu kapas *Aphis gossypii* dan western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) (Fiedler and Sosnowska, 2007). Zarrin *et al.* (2007) menginformasikan bahwa *Aspergillus*, *Penicillium*, dan *Fusarium* diisolasi dari lalat rumah (*Musca domestica*). *Fusarium solani* dilaporkan sebagai jamur entomopatogen pada sugar-beet root maggot (*Tetanops myopaeformis* Röder) di Dakota Utara (Majumdar *et al.*, 2008) dan dapat menginvasi telur serangga *Panstrongylus geniculatus* dalam *vivarum* (Hartung and Lugo, 1996), sedangkan *F. oxysporum* dilaporkan virulen pada *Culex pipiens* di laboratorium (Scholte *et al.*, 2004) dan diisolasi berkali-kali dari *Ochlerotatus detritus* Haldy (Hasan and Vago, 1972). Sun *et al.* (2008b) melaporkan bahwa *Syncephalastrum racemosum* mempunyai aktivitas nematisida terhadap *Bursaphelenchus xylophilus*, sedangkan filtrat *T. harzianum* dapat menurunkan populasi nematoda *Meloidogyne javanica* pada tanaman okra dan mungbean (Siddiqui *et al.*, 2001) serta mempunyai aktivitas larvicidal and pupicidal dari *Aedes aegypti* L. (Sundaravadivelan and Padmanabhan, 2014). Filtrat *Cunninghamella elegans* dapat menurunkan puru (*gall*) akar tanaman tomat yang terserang nematoda *Meloidogyne javanica* (Galper *et al.*, 1991), sedangkan *Gliocladium roseum* menghasilkan metabolit yang mempunyai aktivitas antinematoda terhadap *Caenorhabditis elegans* dan *Panagrellus redivivus* (Dong *et al.*, 2005).

Banyaknya jamur yang terdeteksi menghasilkan aktivitas lipase dan protease (60,53 %) atau lipase (10,53 %) atau protease (13,16 %) saja tentunya sangat menguntungkan karena selain hifa jamur yang mempenetrasi dapat memisahkan lamellae secara fisik, enzim lipase dan protease jamur juga dapat mendegradasi komponen utama kutikula serangga (Sandhu *et al.*, 2012). Peneliti yang sama melaporkan bahwa selain lipase dan protease, kitinase dan esterase juga terlibat mendegradasi kutikula serangga. Enzim-enzim tersebut berfungsi selama proses patogenitas jamur. Jamur-jamur yang menghasilkan aktivitas lipase dan protease adalah

Acremonium (745, 958 dan 1503), *A. chevalieri* (842), *Aspergillus* (790 dan 843), *Byssoschlamys* sp. (983), *F. oxysporum* (853, 854, 916 dan 965), *F. solani* (951), *Fusarium* sp. 2 (877 dan 941), *Fusarium* sp.3 (954), *M. anisopliae* (1543), *P. lilacinus* (861), *Penicillium* sp. 1 (799 dan 945) dan *T. harzianum* (837, 862, 967 dan 1904). Jamur-jamur tersebut selanjutnya dapat dijadikan sebagai kandidat untuk agen pengendalian serangga dan untuk uji bioasai penelitian mendatang.

Beberapa penelitian berikut yang mendukung hasil penelitian jamur entomopatogen yang dapat menghasilkan enzim melaporkan bahwa *Acremonium alcalophilum* menghasilkan aktivitas lipase (Pereira *et al.*, 2013) dan *Acremonium* sp. menghasilkan aktivitas protease (Liu *et al.*, 2007). *Fusarium oxysporum* and *F. solani* menghasilkan aktivitas lipase dan protease (Aboul-Nasr *et al.*, 2013). Jamur entomopatogen *B. bassiana* menghasilkan aktivitas protease (Feng, 1998), sedangkan *C. elegans* menghasilkan aktivitas fosfolipase (de Vasconcelos *et al.*, 2003). *Metarhizium anisopliae* menghasilkan aktivitas lipase dan protease (Nahar *et al.*, 2004); serta *P. lilacinus* menghasilkan aktivitas protease (Park *et al.*, 2004). *Penicillium restrictum* menghasilkan aktivitas lipase dan protease (Freire *et al.*, 1999), *T. harzianum* dan *T. (Gliocladium) virens* mensekresikan lipase (Bhale and Rajkonda, 2012) dan protease (Mishra, 2010).

Selain 38 isolat (100 %) jamur entomopatogen yang terisolasi dengan umpan ulat dan rayap yang ditempatkan pada rizosfer tanaman tidak menghasilkan aktivitas kitinase, 6 isolat (15,79 %) jamur juga diketahui tidak menghasilkan lipase maupun protease, 5 isolat (13,16 %) jamur tidak menghasilkan lipase dan 4 isolat (10,53 %) jamur tidak menghasilkan protease. Ketidakmampuan isolat jamur menghasilkan aktivitas kitinase atau lipase atau protease dalam penelitian ini mungkin karena faktor biologi seperti sifat genetik isolat yang terisolasi memang tidak menghasilkan aktivitas ke tiga enzim tersebut.

Selain lipase dan protease, secara umum jamur diketahui pula menghasilkan aktivitas kitinase. Beberapa penelitian berikut melaporkan bahwa aktivitas kitinase dihasilkan oleh *Acremonium implicatum* (Sen *et al.*, 2013), *B. bassiana* (Fang *et al.*,

2005; Sanivada and Challa, 2014), *F. oxysporum* F3 (Gkargkas *et al.*, 2004), *G. virens* (Di Pietro *et al.*, 1993), *M. anisopliae* (Rustiguel *et al.*, 2012; Sanivada and Challa, 2014), *P. lilacinus* (Park *et al.*, 2004), *Penicillium chrysogenum* (Patidar *et al.*, 2005) dan *T. harzianum* VSL291 (Cuervo-Parra *et al.*, 2011).

KESIMPULAN

Jamur entomopatogen dapat diisolasi dari tanah rizosfer tanaman dengan bantuan umpan ulat dan rayap. Umpan rayap direkomendasikan untuk mengisolasi jamur entomopatogen

Kecuali pada tanah rizosfer *P. coronata*, gambut dan semak belukar dengan vegetasi campuran dan relatif tidak terganggu manusia memiliki diversitas jamur lebih tinggi daripada tanaman Arecaceae lainnya yang ditanam secara monokultur dan relatif terganggu manusia.

Dua puluh tiga isolat jamur (*Acremonium* 745, 958 dan 1503, *A. chevalieri* 842, *Aspergillus* 790 dan 843, *Byssosclamyces* sp. 983, *F. oxysporum* 853, 854, 916 dan 965, *F. solani* 951, *Fusarium* sp. 2 (877 dan 941), *Fusarium* sp.3 (954), *M. anisopliae* 1543, *P. lilacinus* 861, *Penicillium* sp. 1 (799 dan 945) dan *T. harzianum* 837, 862, 967 serta 1904) menghasilkan aktivitas lipase dan protease sehingga jamur-jamur tersebut dapat dijadikan sebagai kandidat untuk agen pengendalian serangga dan untuk uji bioasai pada penelitian mendatang.

DAFTAR PUSTAKA

Aboul-Nasr MB, ANA Zohri and EM Amer. 2013. Enzymatic and toxigenic ability of opportunistic fungi contaminating intensive care units and operation rooms at Assiut University Hospitals, Egypt. *Springerplus* 2, 347. doi: 10.1186/2193-1801-2-347.

Bhale UN and JN Rajkonda. 2012. Enzymatic activity of *Trichoderma* species. *Novus Natural Science Research* 1 (4), 1-8.

Cherry AJ, P Abalo and K Hell. 2005. A laboratory assessment of the potential of different strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) to control *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. *Journal of Stored Products Research* 41(3), 295-309.

Cuervo-Parra JA, M Ramirez-Suero, V Sánchez-López and M Ramirez-Lepe. 2011. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* VSL291 on phytopathogenic fungi isolated from cocoa (*Theobroma cacao* L.) fruits. *African Journal of Biotechnology* 10(52), 10657-10663.

de Souza OF and VK Brown. 2009. Effects of habitat fragmentation on Amazonian termite communities. *Journal of Tropical Ecology* 10(2), 197-206. doi:10.1017/S0266467400007847.

de Vasconcelos WE, MS Rios, AH de Sousa, EV de Medeiros,

GM da Costa Silva and PB Maracajá. 2003. Caracterização bioquímica e enzimática de *Cunninghamella* isoladas de manguezal. *Revista De Biologia E Ciências Da Terra* 3(2-20).

Di Pietro A, M Lorito, CK Hayes, RM Broadway and GE Harman. 1993. Endochitinase from *Gliocladium virens*: isolation, characterization and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. *Phytopathology* 83, 308-313.

Domsch KH, W Gams and T Anderson. 1980. Compendium of Soil Fungi Vol I. London: Academic Press.

Dong JY, HP He, YM Shen and KQ Zhang. 2005. Nematocidal epipolysulfanyldioxopiperazines from *Gliocladium roseum*. *Journal of Natural Products* 68(10), 1510-1513.

Esfahani MN and BA Pour. 2006. The effects of *Paecilomyces lilacinus* on the pathogenesis of *Meloidogyne javanica* and tomato plant growth parameters. *Iran Agricultural Research* 24(2), 67-75.

Fang W, B Leng, Y Xiao, K Jin, J Ma, Y Fan, J Feng, X Yang, Y Zhang and Y Pei. 2005. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 71(1), 363-370.

Feng M. 1998. Reliability of extracellular protease and lipase activities of *Beauveria bassiana* isolates used as their virulence indices. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 38(6), 461-467.

Ferron P. 1985. Fungal control. In *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology* (G. A. Kerkut and L. I. Gilbert, eds.) Vol. 12, 313-346. Pergamon Press, Oxford.

Fiedler Z and D Sosnowska. 2007. Nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson is also a biological agent for control of greenhouse insects and mite pests. *Bio Control* 52, 547-558.

Forlani L, N Pedrini and MP Juárez. 2011. Contribution of the horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to the overall performance of a fungal powder formulation against *Triatoma infestans*. *Research and Reports in Tropical Medicine* 2, 135-140.

Freire DMG, GL Sant'Anna Jr. and TLM Alves. 1999. Mathematical modeling of lipase and protease production by *Penicillium restrictum* in a batch fermenter. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 79(1-3), 845-855.

Freyman BP, R Buitenwerf, O Desouza, and Olf. 2008. The importance of termites (Isoptera) for the recycling of herbivore dung in tropical ecosystems: a review. *European Journal of Entomology* 105(2), 165-173. doi:10.14411/eje.2008.025.

Galper S, E Cohn, Y Spiegel and I Chet. 1991. A Collagenolytic fungus, *Cunninghamella elegans*, for biological control of plant-parasitic nematodes. *The Journal of Nematology* 23(3), 269-274.

Gerrardo AM, CCL Lastra, SA Pelizza and JJ Garcia. 2006. Isolation of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (Ascomycota: Hypocreales) from the chagas disease vector *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera: Reduviidae) in an endemic area in Argentina. *Mycopathologia* 162, 369-372.

Gkargkas K, D Mamma, G Nedev, E Topakas, P Christakopoulos, D Kekos and BJ Macris. 2004. Studies on a N-acetyl--d-glucosaminidase produced by *Fusarium oxysporum* F3 grown in solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 39, 1599-1605.

Gokce A and MK Er. 2005. Pathogenicity of *Paecilomyces* spp. to the glass house white fly, *Trialeurodes vaporariorum*, with some observations on the fungal infection process. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 29, 331-339.

Gunde-Cimerman N, P Zalar and S Jeram. 1998. Mycoflora of cave cricket *Troglophilus neglectus* cadavers. *Mycopathologia* 141, 111-114.

Gutiérrez FP, YS Osorio, JC Osorno and SU Soto. 2003. Sus-

- ceptibility of *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae) of fifth instar nymph to the action of *Beauveria* spp. *Entomotropica* **18**(3), 163-168.
- Hartung and Lugo. 1996.** *Fusarium solani* invader of the eggs of the insect *Panstrongylus geniculatus* in a vivarium. *Mycopathologia* **135**(3), 183-185.
- Hasan S and C Vago. 1972.** The pathogenicity of *Fusarium oxysporum* to mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* **20**, 268-271.
- Hasan WA, Assaf LH and Abdullah SK. 2012.** Occurrence of entomopathogenic and other opportunistic fungi in soil collected from insect hibernation sited and evaluation of their entomopathogenic potential. *Bulletin of the Iraq Natural History Museum* **12**(1), 19-27.
- Jha DK, GD Sharma and RR Mishara. 1992.** Ecology of soil microflora and mycorrhizal symbionts. *Biology and Fertility of Soils* **12**, 272-278.
- Keller S and G Zimmerman. 1989.** Mycopathogens of soil insects. In: Fungus-insect interactions. Wilding, N, Collins MN, Hammond PM, Webber JF (eds), 240-270. Academic Press, London.
- Kiewnick S and RA Sikora. 2006.** Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 for the biological control of the northern root-knot nematode *Meloidogyne hapla* Chitwood. *Nematology* **8**(1), 69-78.
- Kulkarni NS and S Lingappa. 2002.** Pathogenicity of entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson on lepidopterous pests. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*. **15**(2), 293-298.
- Latifian M and B Rad. 2012.** Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillmin, *Beauveria brongniartii* Saccardo and *Metarhizium anisopliae* Metsch to adult *Oryctes elegans* Prell and effects on feeding and fecundity. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* **4**(14), 1026-1032.
- Lingappa Y and JL Lockwood. 1962.** Chitin medium for selective isolation and culture of Actinomycetes. *Phytopathology* **52**, 317-323.
- Liu C, Y Matsushita, K Shimizu, K Makimura and K Hasumi. 2007.** Activation of prothrombin by two subtilisin-like serine proteases from *Acremonium* sp. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **358**(1), 356-362.
- Majumdar A, MA Boetel and ST Jaronski. 2008.** Discovery of *Fusarium solani* as naturally occurring pathogen of sugarbeet root maggot (Diptera: Ulidiidae) pupae: Prevalence and baseline susceptibility. *Journal of Invertebrate Pathology* **97**(1), 1-8.
- Marannino P, C Santiago-Alvarez, E de Lillo and E Quesada-Moraga. 2006.** A new bioassay method reveals pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against early stages of *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera; Buprestidae). *Journal of Invertebrate Pathology* **93**(3), 210-213.
- Mishra VK. 2010.** In-vitro antagonism of *Trichoderma* species against *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Phytotherapy* **2**(9), 28-35.
- Mnyone LL, MJ Kirby, DW Lwetoijera, MW Mpingwa, ET Simfukwe, BGJ Knols, W Takken and TL Russell. 2010.** Tools for delivering entomopathogenic fungi to malaria mosquitoes: effects of delivery surfaces on fungal efficacy and persistence. *Malaria Journal* **9**, 246. doi:10.1186/1475-2875-9-246.
- Nahar P, V Ghormade and MD Deshpande. 2004.** The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. *Journal of Invertebrate Pathology* **85**(2), 80-88.
- Park J-O, JR Hargreaves, EJ McConville, GR Stirling, EL Ghisalberti and K Sivasithamparam. 2004.** Production of leucinostatin and nematocidal activity of Australian isolates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Letters in Applied Microbiology* **38**, 271-276.
- Patidar P, D Agrawal, T Banerjee and S Patil. 2005.** Optimization of process parameters for chitinase production by soil isolates of *Penicillium chrysogenum* under solid substrate fermentation. *Process Biochemistry* **40**(9), 2962-2967.
- Paula AR, AT Carolino, CO Paula and RI Samuels. 2011.** The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide imidacloprid increases virulence against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasites and Vectors* **4**, 8. doi:10.1186/1756-3305-4-8.
- Pedrini N, R Crespo and MP Juarez. 2007.** Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. Comparative biochemistry and physiology part C. *Toxicology and Pharmacology* **146**(1-2), 124-137.
- Pereira EO, A Tsang, TA McAllister and R Menassa. 2013.** The production and characterization of a new active lipase from *Acremonium alcalophilum* using a plant bioreactor. *Biotechnology for Biofuels* **6**, 111. doi:10.1186/1754-6834-6-111
- Peterson MH and MJ Johnson. 1949.** Delayed hydrolysis of butter fat by certain Lactobacilli and Micrococci isolated from cheese. *Journal of Bacteriology* **58**, 701-708.
- Ravensberg WJ. 2010.** *A Roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropods*, 1-8. Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
- Ren QY, ZJ Liu, GQ Guan, M Sun, ML Ma, QL Niu, YQ Li, AH Liu, JL Liu, JFYang, H Yin and JX Luo. 2012.** Laboratory evaluation of virulence of Chinese *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to engorged female *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. *Biological Control* **63**(2), 98-101.
- Rustiguel CB, JA Jorge and LHS Guimarães. 2012.** Optimization of the chitinase production by different *Metarhizium anisopliae* strains under solid-state fermentation with silkworm chrysalis as substrate using CCRD. *Advances in Microbiology* **2**, 268-276.
- Samek T, D Novotny and L Jankovsky. 2006.** Infection of wintering pupae of horse-chestnut leafminer *Cameraria ohridella* Deschka et Dimic. by *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viegas. *Journal of Forest Science* **52**(3), 136-140.
- Sandhu SS, AK Sharma, V Beniwal, G Goel, P Batra, A Kumar, S Jaglan, AK Sharma and S Malhotra. 2012.** Myco-biocontrol of insect pests: Factors involved, mechanism and regulation. *Journal of Pathogens* http://dx.doi.org/10.1155/2012/126819.
- Sanivada SK and M Challa. 2014.** Mycolytic effect of extracellular enzymes of entomopathogenic fungi to *Colletotrichum falcatum*, red rot pathogen of sugarcane. *Journal of Biopesticides* **7**(Sup), 33-37.
- Scholte EJ, BGJ Knol, RA Samson and W Takken. 2004.** Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *Journal of Insect Science* **4**, 1-24.
- Sen L, WU Xia, CAO Jun-zheng and W Feng-long. 2013.** Biocontrol potential of chitinase-producing nematophagous fungus *Acremonium implicatum* against *Meloidogyne incognita*. *Acta Phytopathologica Sinica* **43**(5), 509-517.
- Siddiqui IA, Amer-Zareen, MJ Zaki and SS Shaukat. 2001.** Use of *Trichoderma* species in the control of *Meloidogyne javanica*, root knot nematode in okra and mungbean. *Pakistan Journal of Biological Science* **4**(7), 846-848.
- Singh G and S Prakash. 2011.** Studies on fungal cultural filtrates against adult *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) a vector of filariasis. *Journal of Parasitology Research* http://dx.doi.org/10.1155/2011/147373
- Smith RJ, S Pekrul and EA Grula. 1981.** Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm *Heliothis zea*. *Journal of Invertebrate Pathology* **38**, 335-344.
- Stafford III KC and SA Allan. 2010.** Field applications of

- entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) for the control of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* **47**(6), 1107-1115.
- Sun BD, HY Yu, AJ Chen and XZ Liu. 2008a.** Insect-associated fungi in soils of field crops and orchard. *Crop Protection* **27**, 1421-1426.
- Sun J, H Wang, F Lu, L Du and G Wang. 2008b.** The efficacy of nematocidal strain *Syncephalastrum racemosum*. *Annals of Microbiology* **58**(3), 369-373.
- Sundaravadivelan C and MN Padmanabhan. 2014.** Effect of mycosynthesized silver nanoparticles from filtrate of *Trichoderma harzianum* against larvae and pupa of dengue vector *Aedes aegypti*L. *Environmental Science Pollution Research International* **21**(6), 4624-4633.
- Swier H, MS Dkhar and H Kayang. 2011.** Fungal population and diversity in organically amended agricultural soils of Meghalaya, India. *Journal of Organic System* **6**(2), 3-12.
- Ugine TA, SP Wraight, M Brownbridge and JP Sanderson. 2005.** Development of a novel bioassay for estimation of median lethal concentrations (LC50) and doses (LD50) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, against western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Invertebrate Pathology* **89**, 210-218.
- Ujjan AA and S Shahzad. 2012.** Use of entomopathogenic fungi for the control of mustard aphid (*Lipaphis erysimi*) on canola (*Brassica napus* L.). *Pakistan Journal of Botany* **44**(6), 2081-2086.
- Zarrin M, B Vazirianzadeh, SS Solary, AZ Mahmoudabadi and M Rahdar. 2007.** Isolation of fungi from housefly (*Musca Domestica*) in Ahwaz, Iran. *Australian Journal of Botany* **35**(1), 69-77.