

FORMULASI BIOPESTISIDA *Trichoderma asperellum* Samuels, Liecck & Nirenberg

**BIOPESTICIDE FORMULATION OF *Trichoderma asperellum*
Samuels, Liecck & Nirenberg**

**Lukita Devy^{1*}, Yuda Purwana Roswanjaya¹, Nur Alfi Saryanah¹, Ahmad Suhendra¹,
dan Ade Lia Putri²**

¹Pusat Teknologi Produksi Pertanian, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi
Gedung 612 LAPTIAB, Kawasan Puspitek Serpong, Tangerang Selatan 15314 - Indonesia

²Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia

Cibinong Science Center, Jl. Raya Jakarta-Bogor km. 46, Bogor 16911 - Indonesia

*Korespondensi: lukita.devy@bppt.go.id

ABSTRAK

Biopestisida dengan efektifitas dan efisiensi tinggi akan mendukung keberhasilan praktek proteksi tanaman di lapangan. Tahapan yang cukup penting dalam produksi biopestisida berkualitas adalah formulasi. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari formulasi biopestisida berbahan dasar *Trichoderma asperellum* yang diisolasi dari tanah di PTPN XII Kediri, Jawa Timur. Proses formulasi dilakukan dengan seleksi substrat padat untuk produksi konidia, uji konsistensi substrat, uji *scaling up* produksi substrat dan uji daya simpan biopestisida. Seleksi substrat dilakukan terhadap lima kombinasi substrat padat yaitu beras 100%; beras:jagung (50%:50%); beras:jagung (75%:25%); beras:jagung (25%:75%) dan jagung 100%. Hasil menunjukkan bahwa beras 100% merupakan substrat terbaik untuk produksi konidia *T. asperellum* (3×10^9 konidia g^{-1}). Uji konsistensi beras 100% sebagai substrat dilakukan dalam dua tahap yaitu dalam volume sama dengan uji seleksi dan dalam volume lebih besar sebagai uji *scaling up*. Hasil menunjukkan terdapat konsistensi antara kedua uji tersebut dengan uji seleksi ($7,88 \times 10^9$ dan $7,95 \times 10^9$ konidia g^{-1}). Uji daya simpan *T. asperellum* pada beras 100% menunjukkan stabilitas jumlah konidia ($\geq 10^5$ konidia g^{-1}) sampai 105 hari setelah simpan pada suhu ruang. Oleh karena itu, formulasi *T. asperellum* sebagai biopestisida dapat menggunakan beras 100% sebagai substrat.

Kata kunci: biopestisida, formulasi, substrat, *Trichoderma*

ABSTRACT

Biopesticides with high effectiveness and efficiency will support the success of plant protection practices. The crucial step to produce high-quality biopesticides is formulation process. This research aimed to study biopesticide formulation based on *Trichoderma asperellum*, a fungal-phytopathogen, isolated from soil at PTPN XII Kediri, East Java. The formulation started by solid substrate selection for conidia production, followed by substrate consistency test, scaling up test, and storability test. Five combinations of solid substrate used for the selection (100% rice; 50% rice:50% maize; 75% rice:25% maize; 25% rice:75% maize; 100% maize). Our data showed 100% rice was the best substrate for *T. asperellum* production (3×10^9 conidia g^{-1}). Consistency test for 100% rice as a substrate was conducted in two steps, repeated in the same volume with the selection test and in a bigger volume as a scale-up production. The results showed consistency with the selection test ($7,88 \times 10^9$ and $7,95 \times 10^9$ conidia g^{-1} , respectively). The *T. asperellum* storability test in 100% rice showed stabile conidia numbers up to 105 days after storage at room temperature. Therefore, 100% of rice was recommended as a substrate for the formulation of *T. asperellum* as a biopesticide.

Keywords: biopesticide, formulation, substrate, *Trichoderma*

PENDAHULUAN

Penggunaan pestisida kimia merupakan metode pengendalian organisme pengganggu tanaman yang umum dilakukan. Metode ini cukup mahal dan tidak ramah lingkungan. Penggunaan biopestisida yang mengandung agen hayati dapat menjadi alternatif. Salah satu agen hayati yang dapat digunakan sebagai biokontrol adalah cendawan dari genus *Trichoderma*. *Trichoderma* telah lama dikenal sebagai agen hayati dalam pengendalian penyakit tanaman; peningkatan pertumbuhan, perkembangan akar dan produktivitas tanaman; pemicu resistensi terhadap cekaman abiotik serta pengambilan dan penggunaan hara (Singh *et al.*, 2014). Cendawan ini mampu melawan banyak patogen tanaman, termasuk cendawan patogen tular tanah (Kumar dan Sharma, 2016).

Trichoderma termasuk Ascomycetes yang bersifat biotrof dan saprofit, cendawan yang paling banyak diisolasi dan sering ditemui hidup pada cendawan lain, pada batang dan dahan yang telah mati serta pada tanah dan rizosfer (Atanasova, 2014). Berbagai tanaman menunjukkan peningkatan resistensi terhadap patogen saat diberi *Trichoderma*. *Trichoderma* mampu berinteraksi dan menginduksi perubahan metabolik dalam tanaman sehingga

meningkatkan resistensi terhadap virus dan mikroorganisme patogen. Beberapa studi menunjukkan kolonisasi akar oleh *Trichoderma* menyebabkan perubahan besar pada genom dan metabolisme tanaman, lalu menyebabkan akumulasi senyawa antimikroba (Singh *et al.*, 2011).

Selain kemampuan *Trichoderma* untuk menyerang atau menghambat pertumbuhan patogen tanaman secara langsung, mereka juga dapat menginduksi resistensi sistemik dan lokal terhadap suatu patogen tanaman (Singh *et al.*, 2014). Beberapa studi telah dilakukan untuk menguji peran *Trichoderma* sebagai biokontrol diantaranya pada bawang bombay (Rivera-Méndez *et al.*, 2020), kacang tunggak (Wang dan Zhuang, 2019), kakao (Rosmana *et al.*, 2018), jagung (Li *et al.*, 2016), tomat (El_Komy *et al.*, 2015), mangga (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013) dan talas (Mbarga *et al.*, 2012).

Pengujian *T. asperellum* terhadap penyakit layu fusarium mentimun dan busuk batang jagung menunjukkan bahwa cendawan ini mensekresi kitinase, glukonase dan protease yang mampu mendegradasi dinding sel cendawan dan menjadikannya mikoparasit. Selain itu xylanase yang diproduksi oleh cendawan ini mampu menginduksi resistensi tanaman dan memicu imunitas tanaman melawan patogen. Cendawan ini

menghasilkan metabolit primer prekursor senyawa antimikroba, juga enam senyawa antimikroba dari golongan peptida (Wu *et al.*, 2017).

Trichoderma perlu dikemas dalam suatu formulasi agar dapat digunakan sebagai biopestisida. Keberhasilan pengembangan formulasi agen biokontrol tergantung pada pemilihan substrat. Penggunaan substrat yang tepat harus menunjang sintesis enzim yang diperlukan untuk mekanisme biokontrol dan mempertahankan sumber makanan yang cukup sehingga tidak menghambat sintesis enzim saat diperlukan (Singh *et al.*, 2014). Formulasi dapat dilakukan menggunakan berbagai substrat, diantaranya substrat padat (Cumagun 2014). Proses produksi massal pada perbanyak *Trichoderma* banyak menggunakan substrat padat karena kemampuan bersporulasinya lebih baik pada substrat padat daripada media cair (Singh *et al.*, 2007).

Optimasi substrat padat untuk perbanyak cendawan mutlak diperlukan untuk mengetahui jenis substrat padat yang paling cocok untuk pertumbuhan *Trichoderma*. Substrat dalam perbanyak cendawan merupakan penyedia sumber karbon dan nitrogen yang sangat diperlukan dalam metabolisme cendawan terutama untuk pertumbuhannya. Perbandingan karbon dan nitrogen (nisbah C/N) yang tepat

akan mendukung perbanyak cendawan yang optimum (Arbianto, 1995).

Perbanyak *Trichoderma* umumnya menggunakan limbah, seperti jerami padi atau gandum, limbah tebu, kelobot jagung, serbuk gergaji, bekatul beras secara tunggal atau campuran (Cumagun, 2014). Perbanyak *Trichoderma* di Indonesia biasanya menggunakan onggok sebagai limbah dari pembuatan tepung tapioka namun sulit diperoleh dan harganya tidak jauh berbeda dengan biji-bijian yang lebih mudah diperoleh. Oleh karena itu pada kegiatan ini kajian formulasi *Trichoderma* dilakukan menggunakan substrat biji-bijian.

Biji-bijian yang digunakan dalam pengujian ini adalah beras dan jagung. Beras dan jagung memiliki nisbah C/N rasio yang cukup untuk pertumbuhan cendawan sehingga cendawan masih bisa berkembang biak dengan subur pada media tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis substrat padat yang optimum untuk produksi konidia *T. asperellum*, proses formulasi dan daya simpannya sehingga *T. asperellum* dapat digunakan sebagai produk biopestisida di masyarakat.

BAHAN DAN METODE

a. Inokulum Cendawan

Cendawan *T. asperellum* yang digunakan adalah koleksi Laboratorium

Proteksi Tanaman Pusat Teknologi Produksi Pertanian, BPPT hasil isolasi dari tanah perkebunan kakao PT Perkebunan Nusantara XII (PTPN XII) Kediri, Jawa Timur. Inokulum cendawan merupakan hasil perbanyakan bertahap pada media *Potato Dextrosa Broth* (PDB) dari volume kecil ke volume lebih besar yang ditanam dalam substrat padat sebanyak 5% (v/w) dan diperoleh dari perbanyakan pada media cair 1000 mL di dalam *shaker incubator* (suhu 30°C, kecepatan putar 170 rpm). Perhitungan jumlah konidia dilakukan untuk melihat jumlah konidia yang layak digunakan sebagai inokulum yaitu $\geq 10^6$ konidia/mL (Waites *et al.*, 2009).

b. Perhitungan jumlah konidia

Penghitungan jumlah konidia *T. asperellum* dilakukan dengan metoda pengenceran cawan tuang (*serial dilution plate*) yang hanya menghitung jumlah konidia hidup (Oliveira *et al.*, 2015). Beberapa tabung reaksi yang telah diisi larutan NaCl fisiologis 0.85% steril sebanyak 9 mL diinokulasikan 1 mL kultur cendawan dari Erlenmeyer 2 L atau 1 gram substrat padat yang telah dihaluskan sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} . Satu mL kultur dari pengenceran 10^{-1} dipindahkan ke tabung reaksi berikutnya, diperoleh pengenceran 10^{-2} , demikian seterusnya sampai diperoleh pengenceran sesuai dengan yang diinginkan ($10^{-1} - 10^{-9}$).

Sebanyak 1 mL dari masing-masing hasil pengenceran ($10^{-5} - 10^{-9}$) dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang telah berisi media agar padat, diratakan dengan batang L dan diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam lalu jumlah koloni *T. asperellum* dalam masing-masing cawan petri dihitung dan diinterpretasikan. Setiap pengerjaan dilakukan duplo. Penghitungan jumlah konidia dilakukan dengan memilih cawan yang mengandung jumlah koloni antara 30 - 300 dengan asumsi bahwa satu koloni berasal dari satu konidia maka beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan satu kumpulan koloni yang besar, bila jumlah koloninya diragukan dapat dihitung sebagai satu koloni. Banyaknya jumlah konidia per mL dihitung dengan menggunakan rumus :

Jumlah sel per mL =

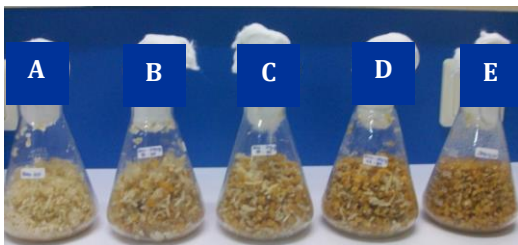
jumlah koloni x (1 / faktor pengenceran)

c. Seleksi dan Optimasi Substrat Padat

Seleksi substrat yang digunakan terdiri dari 5 jenis biji-bijian yaitu (1) beras 100%, (2) beras : jagung (50% : 50%), (3) beras : jagung (75% : 25%), (4) beras : jagung (25% : 75%) dan (5) jagung 100% (Gambar 1). Substrat yang akan digunakan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL, dicuci bersih, direndam dalam air selama 3 jam kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* (suhu 121°C, tekanan 15 atm, 60 menit). Substrat diinokulasi oleh

biakan cendawan yang telah tumbuh dalam media cair PDB 1000 mL dan telah dihitung jumlah konidianya. Setelah diinokulasi, substrat disimpan di tempat gelap selama 15 hari sampai seluruh permukaan biji ditumbuhi oleh miselium cendawan. Pada hari ke-7, substrat dikocok untuk meratakan pertumbuhan cendawan (Wijaya *et al.*, 2011, dimodifikasi).

Substrat pada masing-masing perlakuan yang telah ditumbuhi cendawan dikeluarkan dari dalam Erlenmeyer pada hari ke-15, kemudian dikeringanginkan selama sekitar 5 hari di dalam *drying chamber*. Pengerinan konidia penting untuk mencegah kontaminasi mikroba lain (Jin dan Custis, 2011). Setelah kering sempurna, substrat dihaluskan menggunakan blender dan disaring untuk memisahkan bagian yang masih berukuran besar. Proses penghalusan dengan blender tidak dilakukan terlalu lama untuk menghindari kerusakan konidia.



Gambar 1. Variasi substrat padat untuk perbanyakan *T. asperellum* menunjukkan kepadatan dan warna berbeda (A=Beras 100%; B=Beras : Jagung (50% : 50%); C= Beras : Jagung (75% : 25%); D= Beras : Jagung (25% : 75%); E= Jagung 100%)

d. Uji Konsistensi Substrat

Uji konsistensi substrat dilakukan dengan dua tahap. Tahap pertama adalah mengulang perbanyakan *T. asperellum* dalam substrat terseleksi dan tahap kedua adalah menguji perbanyakan *T. asperellum* pada volume yang lebih besar untuk skala produksi (*scaling up*). Tahap pertama dilakukan dengan prosedur yang sama dengan uji optimasi substrat. Tahap kedua dilakukan dengan perlakuan awal yang sama namun pada tempat perbanyakan yang berbeda. Pada saat optimasi substrat dan uji konsistensi, tempat perbanyakan cendawan dilakukan pada labu Erlenmeyer 250 mL, sedangkan pada skala produksi dilakukan pada plastik tahan panas. Substrat ditimbang sebanyak 500 gram, dicuci bersih, direndam selama 3 jam, ditiriskan, dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dan disterilisasi menggunakan *autoclave* (suhu 121°C tekanan 15 atm, 1 jam), didinginkan dan diinokulasi oleh inokulum yang telah disiapkan. Substrat yang telah diinokulasi diinkubasi pada suhu kamar dalam kondisi gelap selama 15 hari dengan pengadukan setiap hari yang dimulai pada hari ke-3 atau setelah secara visual cendawan tumbuh penuh di permukaan substrat. Pengadukan dilakukan dengan cara meremas plastik dari bagian luar. Pengerinan dan penghalusan dilaksanakan seperti uji

optimasi substrat padat dan uji konsistensi substrat tahap 1.

e. Uji Daya Simpan

Uji daya simpan dilakukan dengan menyimpan *T. asperellum* dan substrat yang telah berbentuk serbuk di dalam plastik berklip pada suhu ruang. Penyimpanan dilakukan sampai 105 hari. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah konidia g^{-1} pada setiap 15 hari.

f. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menghitung nilai rata-rata dari hasil data pengujian yang dilaksanakan pada masing-masing tahapan penyusunan formulasi biopestisida.

HASIL DAN PEMBAHASAN

a. Pertumbuhan dan seleksi *T. asperellum* pada berbagai substrat

Berdasarkan perhitungan jumlah konidia pada media PDB, cendawan *T. asperellum* telah memenuhi syarat sebagai inokulum untuk bisa ditanam pada substrat padat yaitu $1,08 \times 10^9$. Pada uji lima substrat padat nampak pertumbuhan cendawan sampai hari ke-7 belum maksimal sehingga inkubasi dilanjutkan sampai hari ke-15. Hal ini terlihat dari masih nampaknya butiran biji yang belum masif terhubung oleh miselium cendawan. Meskipun demikian, pada hari ke-7 substrat tetap dikocok dalam botol untuk memutar substrat sehingga di sisa

masa inkubasi seluruh substrat dapat ditumbuhi oleh miselium cendawan. Pengadukan juga bertujuan memberikan oksigen bebas.

Inkubasi cendawan *T. asperellum* dihentikan pada umur 15 hari atau saat seluruh permukaan substrat ditumbuhi cendawan, dan seluruh substrat terlihat menjadi 1 massa yang masif. Meskipun pada hari ke-7 dilakukan pengocokan substrat yang mengakibatkan substrat menjadi terpisah-pisah, tetapi setelah hari ke-15, substrat tersebut bersatu kembali membentuk massa yang menunjukkan bahwa cendawan masih tumbuh (Gambar 2).



Gambar 2. Pertumbuhan *T. asperellum* dalam berbagai substrat padat pada 15 hari masa inkubasi menunjukkan perbedaan persentase penutupan oleh konidia (A : Beras 100%; B : Beras : Jagung (50% : 50%); C : Beras : Jagung (75% : 25%); D : Beras : Jagung (25% : 75%); E : Jagung 100%)

Kualitas suatu formula cendawan dapat ditentukan berdasarkan beberapa kriteria diantaranya mengandung konidia hidup minimal 10^5 Colony Forming Unit (CFU) g^{-1} , dapat disimpan dalam jangka waktu tertentu dan mudah diaplikasikan (Suwahyono, 2010). Perhitungan jumlah konidia *T. asperellum* pada berbagai

substrat menunjukkan adanya perbedaan respon (Tabel 1).

Hasil uji optimasi substrat menunjukkan bahwa semua substrat memenuhi syarat untuk perbanyakkan *T. asperellum* berdasarkan jumlah konidianya yaitu di atas 10^5 CFUg⁻¹ (Suwahyono 2010). Substrat beras 100% menghasilkan jumlah

konidia paling banyak yaitu 3×10^9 konidia g⁻¹ (Tabel 1) sehingga berdasarkan aspek efisiensi penggunaan biopestisida maka substrat ini dianggap paling baik untuk perbanyakkan *T. asperellum*.

Tabel 1. Perhitungan jumlah konidia *T. asperellum* pada berbagai jenis substrat padat menunjukkan variasi ¹⁾

Konsentrasi	Beras 100%	Jagung 100%	Beras:Jagung 75%:25%	Beras:Jagung 25%:75%	Beras:Jagung 50%:50%
10 ⁵	TBUD	TBUD	4,00 x 10 ⁶	1,35 x 10 ⁷	5,00 x 10 ⁶
10 ⁶	TBUD	9,00 x 10 ⁷	1,00 x 10 ⁷	2,00 x 10 ⁷	0
10 ⁷	2,50 x 10 ⁹	3,00 x 10 ⁸	0	0	0
10 ⁸	3,50 x 10 ⁹	0	0	0	0
Rataan	3,00 x 10 ⁹	1,90 x 10 ⁸	7,00 x 10 ⁶	1,68 x 10 ⁷	5,00 x 10 ⁶

¹⁾TBUD = Terlalu Banyak Untuk Dihitung

Dalam pengembangan formulasi agensia pengendalian hayati, ada 3 parameter yang sangat penting yaitu air, hara, dan lingkungan (Muslim 2019). Jumlah masing-masing hara yang diperlukan untuk pertumbuhan cendawan bervariasi, namun yang terpenting adalah nisbah C/N. Sebagian dari karbon dalam cendawan akan hilang sebagai CO₂ maka jumlah karbon yang diperlukan lebih banyak daripada nitrogen. Nisbah C/N optimum dalam fermentasi adalah 20 atau 25 hingga 1. Semakin tinggi selisih jumlah nitrogen dari optimum maka akan semakin lambat proses fermentasi berlangsung (Arbianto, 1995).

Manfaat utama dari suatu substrat adalah menyediakan nutrisi bagi

mikroba. Substrat tersebut harus memiliki suplai elemen minimum yang diperlukan untuk menyusun materi-materi seluler serta jumlah minimum dari elemen tertentu yang masuk ke dalam aktivitas metabolik organisme sebagai sumber energi atau unsur pokok enzim (Arbianto, 1995).

Beras nampak lebih mampu mendukung pertumbuhan *T. asperellum* daripada jagung karena memiliki kandungan karbohidrat lebih tinggi dan protein lebih rendah daripada jagung (Tabel 2) sehingga nisbah C/N nya lebih tinggi. Selain rendahnya nisbah C/N dalam jagung, kandungan karbohidratnya juga tidak siap untuk digunakan oleh cendawan secara umum (Arbianto, 1995).

Tabel 2. Komposisi kimia jagung dan beras (per 100 g bahan kering)

Komponen	Jagung	Beras
Air (g)	10.00	12.00
Kalori (kJ)	1528	1528
Protein (g)	9.40	7.10
Lemak (g)	4.74	0.66
Karbohidrat (g)	74.00	80.00
Serat (g)	7.30	1.30
Gula (g)	0.64	0.12
<i>Mineral</i>		
Kalsium (mg)	7.00	28.00
Besi (mg)	2.71	0.80
Magnesium (mg)	127.00	25.00
Mangan (mg)	0.49	1.09
<i>Vitamin</i>		
B1 (mg)	0.39	0.07
A (IU)	214.00	0
E (mg)	0.49	0.11

Sumber: USDA (2016)

Natalia *et al.* (2014) yang melakukan uji penambahan bahan organik pada biakan *Trichoderma* dengan molase, tepung ketan putih dan tepung jagung melaporkan bahwa penambahan tepung jagung memiliki efek penghambatan terendah terhadap pertumbuhan cendawan patogen *Sclerotium rolfsii* pada kacang tanah. Hal ini disebabkan karena pertumbuhan *Trichoderma* yang kurang baik pada media tepung jagung dibandingkan dua media lainnya.

Efektivitas beras sebagai substrat formulasi *Trichoderma* juga dinyatakan oleh Mahdizadehnaraghi *et al.* (2015) pada uji pengendalian penyakit *white rot* pada bawang putih. Hasil menunjukkan bahwa bioformulasi dengan bahan organik (beras) lebih efektif daripada dengan bahan anorganik (talk). Bioformulasi menggunakan beras ini juga

sama efektifnya terhadap penghambatan penyakit dengan fungisida Carbendazim. Kecenderungan efektivitas penggunaan beras sebagai substrat juga pernah dilaporkan oleh Kakvan *et al.* (2013) dan Samavat *et al.* (2014).

b. Konsistensi perbanyakan *T. asperellum* pada substrat padat terseleksi

Jumlah konidia cendawan *T. asperellum* telah memenuhi syarat untuk bisa ditanam pada substrat padat yaitu $6,25 \times 10^9$ konidia mL⁻¹. Uji konsistensi dilakukan pada substrat beras 100% karena *T. asperellum* menghasilkan jumlah konidia paling banyak pada jenis substrat tersebut. Uji konsistensi substrat ini dilakukan untuk membuktikan bahwa jumlah konidia yang diperoleh pada kegiatan optimasi tidak dipengaruhi secara langsung oleh faktor pengerjaan atau kesalahan teknis.

Substrat beras 100% dianggap konsisten untuk perbanyakan cendawan apabila konidia yang terbentuk dari hasil perbanyakan cendawan pada substrat tersebut berjumlah tidak jauh berbeda dengan jumlah konidia yang terbentuk pada uji optimasi substrat yaitu kisaran 3×10^9 konidia/gram (Tabel 1). Hasil perhitungan menunjukkan substrat beras 100% pada uji konsistensi menghasilkan $7,88 \times 10^9$ konidia/gram (Tabel 3). Hal ini menunjukkan bahwa substrat beras 100% mampu secara konsisten

mempertahankan konsentrasi konidia *T. asperellum* seperti saat uji optimasi substrat. Hasil tersebut lebih tinggi daripada hasil optimasi substrat dimana pada tahapan tersebut beras 100% menghasilkan jumlah konidia 3×10^9 konidia g^{-1} (Tabel 1) meskipun

perbedaannya tidak terlalu signifikan karena masih pada kisaran 10^9 .

Perbedaan tersebut diduga disebabkan oleh sumber inokulum yang berbeda dengan jumlah konidia awal yang berbeda pula sehingga menyebabkan perbedaan laju pertumbuhan *T. asperellum* dalam substrat.

Tabel 3. Perhitungan jumlah konidia *T. asperellum* pada substrat beras 100%¹⁾

Konsentrasi	Jumlah Konidia		Rataan
	Ulangan 1	Ulangan 2	
10^{-5}	TBUD	TBUD	TBUD
10^{-6}	TBUD	TBUD	TBUD
10^{-7}	$1,95 \times 10^9$	$2,30 \times 10^9$	$2,13 \times 10^9$
10^{-8}	$7,00 \times 10^9$	$6,00 \times 10^9$	$6,50 \times 10^9$
10^{-9}	$1,00 \times 10^{10}$	$2,00 \times 10^{10}$	$1,50 \times 10^{10}$
	Rataan		$7,88 \times 10^9$

¹⁾TBUD = Terlalu Banyak Untuk Dihitung

c. Konsistensi perbanyakkan *T. asperellum* pada skala produksi

Jumlah konidia *T. asperellum* telah memenuhi syarat sebagai inokulum yaitu $1,02 \times 10^{10}$ konidia mL^{-1} . Uji konsistensi selanjutnya pada volume yang lebih banyak (*scaling up*) menunjukkan konsistensi jumlah konidia dengan hasil uji optimasi substrat dan uji konsistensi. Jumlah konidia *T. asperellum* pada uji *scaling up* substrat beras 100% adalah $7,95 \times 10^9$ konidia g^{-1} (Tabel 4). Hasil tersebut hampir sama dengan hasil uji konsistensi yaitu $7,88 \times 10^9$ konidia g^{-1} (Tabel 3).

Uji *scaling up* dilakukan menggunakan 500 gram beras 100%. Jumlah 500 gram substrat ini merupakan hasil uji coba sebelumnya. Masing-masing plastik hanya diisi dengan 500 gram

substrat, sehingga memudahkan kalkulasi jumlah plastik yang digunakan saat produksi kelak.

Tabel 4. Perhitungan jumlah konidia *T. asperellum* pada perbanyakkan uji konsistensi *scaling up*¹⁾

Konsentrasi	Jumlah Konidia
10^{-5}	TBUD
10^{-6}	TBUD
10^{-7}	$1,85 \times 10^9$
10^{-8}	$7,00 \times 10^9$
10^{-9}	$1,50 \times 10^{10}$
Rataan	$7,95 \times 10^9$

¹⁾TBUD = Terlalu Banyak Untuk Dihitung

Pengadukan bertujuan untuk meratakan pertumbuhan cendawan di seluruh bagian substrat, memberikan pertukaran oksigen bebas dan memelihara kelembaban. Oksigen bebas dan kelembaban merupakan faktor pembatas yang sangat mempengaruhi keberhasilan suatu fermentasi koji atau

fermentasi substrat padat (Arbianto, 1995). Oksigen bebas pada perbanyakan *scaling up* diperoleh dari lubang-lubang kecil yang sengaja dibuat pada plastik, sedangkan kelembaban dapat dijaga karena pada saat pengadukan, uap air yang terbentuk di dinding bagian dalam plastik sebagai *by product* metabolisme cendawan tercampur kembali dengan substrat. Sama halnya dengan dua uji sebelumnya, pemberian kondisi gelap pada perbanyakan skala produksi bertujuan agar pertumbuhan cendawan dapat berlangsung lebih optimum karena kondisi gelap akan menunjang proses sporulasi cendawan (Casas-Flores dan Herrera-Estrella, 2013).

Berdasarkan pengamatan visual, laju pertumbuhan *T. asperellum* lebih cepat pada perbanyakan skala produksi dibandingkan pada uji optimasi dan uji konsistensi. Pertumbuhan miselium cendawan *T. asperellum* pada dua uji tersebut terbentuk mulai hari ke-3, tetapi pada uji *scaling up*, semua permukaan substrat sudah dipenuhi oleh miselium pada hari ke-2. Laju pertumbuhan yang lebih cepat ini diduga dipengaruhi oleh lebih banyaknya oksigen bebas. Pada uji optimasi dan uji konsistensi, perbanyakan dilakukan di dalam labu erlenmeyer dengan mulut tersumbat kapas sehingga oksigen bebas yang tersedia relatif terbatas, sedangkan pada perbanyakan skala produksi dilakukan di

dalam plastik tahan panas yang dilubangi sehingga memudahkan oksigen bebas untuk berpenetrasi ke dalam substrat.

Laju pertumbuhan cendawan yang lebih cepat pada uji *scaling up* juga mempengaruhi proses pembentukan konidia atau sporulasi. Konidia *T. asperellum* terbentuk di hari ke-8 pada 2 uji sebelumnya, sedangkan pada uji *scaling up*, konidia sudah terbentuk di hari ke-3. Pembentukan konidia berkorelasi positif dengan laju pertumbuhan cendawan (Griffin, 1996). Hal ini disebabkan karena laju pertumbuhan yang cepat akan mempercepat akhir fase eksponensial dan segera memasuki fase stasioner. Pada fase stasioner ini tidak ada lagi pertumbuhan massa cendawan dan cendawan akan membentuk konidia sebagai proses lanjut dari pertumbuhan.

Hubungan antara laju pertumbuhan yang cepat dan proses sporulasi juga berkaitan dengan strategi yang dilakukan dalam proses pertumbuhan cendawan. Pada awal pertumbuhan, cendawan akan melakukan strategi G (*Growth*) sampai akhir fase eksponensial setelah itu ketika cendawan mulai memasuki fase Stasioner, cendawan akan melakukan strategi R (*Reproductive*) yaitu dengan cara membentuk konidia (Griffin, 1996).

Proses sporulasi cendawan pada uji *scaling up* sudah mulai terjadi pada hari ke-3 tetapi belum maksimal karena

tujuan akhir dari perbanyak cendawan tersebut adalah produksi konidia. Oleh karena itu harus dilakukan “manipulasi” agar konidia yang sudah mulai terbentuk dapat berkecambah kembali dan membentuk massa miselium. Manipulasi dilakukan melalui proses pengadukan. Selain memberikan suplai oksigen bebas, pengadukan juga dapat menghancurkan substrat yang sudah diikat satu sama lain oleh miselium cendawan, memberikan kelembaban dan menambah luas permukaan substrat untuk perkecambahan konidia.

Proses pengadukan yang dilakukan setiap hari setelah hari ke-3 diharapkan akan memperbanyak jumlah konidia yang dihasilkan pada akhir proses perbanyak. Perbanyak cendawan skala produksi dalam substrat beras 100% dihentikan setelah hari ke-15 dimana pada umur tersebut jumlah konidia yang terdapat di dalam substrat sudah mencukupi untuk digunakan sebagai biopestisida (Gambar 3).

d. Daya simpan *T. asperellum* yang diperbanyak pada beras 100%

Perbanyak cendawan *T. asperellum* sebagai bahan aktif dalam formulasi biopestisida mengandalkan proses sporulasi dari cendawan tersebut. Bagian yang dimanfaatkan dari cendawan yang diformulasi sebagai biopestisida adalah konidianya dan bukan miseliumnya, sehingga apabila massa miselium berlimpah tetapi tidak menghasilkan konidia yang cukup maka biopestisida tersebut tidak terlalu efektif.

Kondisi lingkungan selama proses inkubasi diarahkan untuk proses sporulasi cendawan. Keuntungan menggunakan konidia cendawan pada formulasi biopestisida adalah bentuknya yang stabil dan tidak terlalu terpengaruh oleh perubahan lingkungan (Wahyudi, 2008). Selain itu konidia juga memiliki viabilitas lebih lama sehingga menguntungkan dalam penyimpanan (Soe dan de Costa, 2012).

Tabel 5. Perhitungan jumlah konidia *T. asperellum* pada masa penyimpanan¹⁾

Pengenceran	Hari Penyimpanan ke-						
	15	30	45	60	75	90	105
-4	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD
-5	8.65x10 ⁷	7.90 x10 ⁷	5.00x10 ⁷	4.45x10 ⁷	3.60x10 ⁷	2.50x10 ⁷	1.90x10 ⁷
-6	5.50x10 ⁸	4.85 x10 ⁸	3.85 x10 ⁸	3.00 x10 ⁸	2.90 x10 ⁸	1.60 x10 ⁸	1.00 x10 ⁸
-7	4.05x10 ⁹	2.25 x10 ⁹	1.90 x10 ⁹	1.92 x10 ⁹	9.50 x10 ⁸	8.00 x10 ⁸	3.00 x10 ⁸
-8	2.45x10 ¹⁰	1.50 x10 ¹⁰	1.40 x10 ¹⁰	9.00 x10 ⁹	1.20 x10 ⁸	2.50 x10 ⁸	0.00
Rataan	7.30 x10 ⁹	4.45 x10 ⁹	4.08 x10 ⁹	2.82 x10 ⁹	3.49 x10 ⁸	3.09 x10 ⁸	1.05 x10 ⁸

Keterangan : ¹⁾TBUD = Terlalu Banyak Untuk Dihitung

Pengujian daya simpan dilakukan untuk mengetahui masa simpan *T. asperellum* yang diperbanyak dalam substrat beras 100%. Hasil pengujian menunjukkan bahwa sampai 105 hari setelah penyimpanan (Tabel 5), konsentrasi konidia *T. asperellum* masih berada di atas ambang batas konsentrasi konidia sebagai produk biopestisida yaitu 1×10^5 konidia g^{-1} biopestisida (Suwahyono, 2010). Penurunan jumlah konidia selama penyimpanan terjadi karena keterbatasan hara yang terdapat pada substrat untuk pertumbuhan cendawan (Waites *et al.*, 2009).



Gambar 3. Pertumbuhan *T. asperellum* dalam substrat beras 100% pada 15 hari masa inkubasi saat di dalam plastik, setelah dikeringkan dan diserbukkan

SIMPULAN

Berdasarkan hasil uji optimasi substrat, uji konsistensi dan uji *scaling up* *T. asperellum*, maka beras 100% direkomendasikan untuk digunakan sebagai substrat padat pada formulasi biopestisida *T. asperellum*. Substrat padat ini mampu mendukung pertumbuhan *T. asperellum* dengan baik dilihat dari produksi konidianya ($>10^5$ konidia/g substrat) dan bersifat stabil sampai 105 hari setelah simpan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada PT Perkebunan Nusantara XII Kediri, Jawa Timur atas bantuannya dalam pengumpulan sampel *Trichoderma*. Kegiatan ini didanai oleh program DIPA Pusat Teknologi Produksi Pertanian BPPT berjudul "Optimasi Teknik Budidaya Kakao Melalui Manajemen Pengendalian Hama Penyakit Terpadu".

DAFTAR PUSTAKA

- Arbianto, P. (1995). The microbial ecological approach in the traditional fermentation process. *Prosiding Simposium Sehari Pengembangan Industri Makanan dari Kedelai*. Jakarta, 23 September 1995.
- Atanasova, L. (2014). Ecophysiology of *Trichoderma* in genomic perspective. In Gupta *et al.* (Eds). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. pp. 25-40. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Casas-Flores, S., Herrera-Estrella, A., Mukherjee, P., Horwitz, B., & Singh, U. (2013). The influence of light on the biology of *Trichoderma*. In Mukherjee *et al.* (Eds.). *Trichoderma: Biology and Applications*. pp 43-66. CABI.
- Cumagun, C. J. R. (2014). Advances in formulation of *Trichoderma* for biocontrol. In Gupta *et al.* (Eds). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. pp. 527-531. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- de los Santos-Villalobos, S., Guzmán-Ortiz, D. A., Gómez-Lim, M. A., Délano-Frier, J. P., de-Folter, S., Sánchez-García, P., & Peña-Cabriales, J. J. (2013). Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). *Biological Control*, 64(1), 37-44.
- El_Komy, M. H., Saleh, A. A., Eranthodi, A., & Molan, Y. Y. (2015). Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against

- tomato Fusarium wilt. *The Plant Pathology Journal*, 31(1), 50.
- Griffin, D. H. (1996). *Fungal physiology*. John New York, USA: Wiley & Sons.
- Jin, X., & Custis, D. (2011). Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures. *Biological Control*, 56(2), 202-208.
- Kakvan N., Heydari A., Zamanizadeh H.R., Rezaee S., Nraghi L. (2013). Development of new bioformulations using *Trichoderma* and *Talaromyces* fungal antagonists for biological control of sugar beet damping-off disease. *Crop Protection*, 53 (1), 80-84.
- Kumar, G., & Sarma, B.K. (2016). Ecofriendly management of soil-borne plant pathogens through plant growth promoting rhizobacteria. *SATSA Mukhapatra-Annual Technical Issue*, (20), 167-171.
- Li, Y., Sun, R., Yu, J., Saravanakumar, K., & Chen, J. (2016). Antagonistic and biocontrol potential of *Trichoderma asperellum* ZJSX5003 against the maize stalk rot pathogen *Fusarium graminearum*. *Indian journal of microbiology*, 56(3), 318-327.
- Mahdizadehnaraghi, R., Heydari, A., Zamanzadeh, H. R., Rezaee, S., & Nikan, J. (2015). Biological control of garlic (*Allium*) white rot disease using antagonistic fungi-based bioformulations. *Journal of Plant Protection Research*, 55(2), 136-141.
- Mbarga, J. B., Ten Hoopen, G. M., Kuate, J., Adio, A., Ngonkeu, M. E. L., Ambang, Z., ... & Begoude, B. A. D. (2012). *Trichoderma asperellum*: A potential biocontrol agent for *Pythium myriotylum*, causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. *Crop Protection*, 36, 18-22.
- Muslim, A. (2019). *Pengendalian hayati patogen tanaman dengan mikroorganisme antagonis*. Palembang, Indonesia: Unsri Press.
- Natalia, A. G., Aeny, T. N., & Prasetyo, J. (2014). Uji keefektifan *Trichoderma* Spp. dengan bahan campuran yang berbeda dalam menghambat pertumbuhan *Sclerotium Rolfsii* penyebab penyakit rebah kacang pada kacang tanah. *Jurnal Agrotek Tropika*, 2(3).
- Oliveira, D. G. P., Pauli, G., Mascarin, G. M., & Delalibera, I. (2015). A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. *Journal of microbiological methods*, 119, 44-52.
- Rivera-Méndez, W., Obregón, M., Morán-Diez, M. E., Hermosa, R., & Monte, E. (2020). *Trichoderma asperellum* biocontrol activity and induction of systemic defenses against *Sclerotium cepivorum* in onion plants under tropical climate conditions. *Biological Control*, 141, 104145.
- Rosmana, A., Kuswinanti, T., Asman, A., Mandy, Y. I., Muhayang, M. T., & Kesia, A. M. (2018). Composted plant residues improve control capability of *Trichoderma asperellum* against vascular streak dieback disease on cacao. *Int. J. Agric. Biol*, 20, 1795-1800.
- Samavat S., Heydari A., Zamanizadeh H.R., Rezaee S., Alizadeh Aliabadi A. (2014). A comparison between *Pseudomonas aureofaciens* (*chlororaphis*) and *P. fluorescens* in biological control of cotton seedling damping-off disease. *Journal of Plant Protection Research*, 54 (2), 115-121.
- Singh, A., Sarma, B. K., Singh, H. B., & Upadhyay, R. S. (2014). *Trichoderma*: a silent worker of plant rhizosphere. In Gupta et al. (Eds). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. pp. 533-542. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Singh, A., Srivastava, S., & Singh, H. B. (2007). Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. *Bioresource technology*, 98(2), 470-473.
- Singh, B. N., Singh, A., Singh, S. P., & Singh, H. B. (2011). Reprogramming of oxidant and antioxidant metabolites in root apoplast of sunflower by *Trichoderma harzianum* NBRI 1055 against *Rhizoctonia solani*. *Eur. J. Plant Pathol*, 131, 121-134.
- Soe, K. T., & De Costa, D. M. (2012). Development of a spore-based formulation of microbial pesticides for control of rice sheath blight. *Biocontrol Science and Technology*, 22(6), 633-657.
- Suwahyono, U. (2010). *Biopestisida, cara membuat dan petunjuk penggunaan*. Jakarta, Indonesia: Penebar Swadaya.

- USDA. (2016). *Nutrient data laboratory*. United States Department of Agriculture [Internet]. <https://ndb.nal.usda.gov/>
- Wahyudi, P. (2008). Enkapsulasi propagul jamur entomopatogen *Beauveria bassiana* menggunakan alginat dan pati jagung sebagai produk mikoinsektisida. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 6(2), 51-56.
- Waites, M. J., Morgan, N. L., Rockey, J. S., & Highton, G. (2009). *Industrial microbiology: an introduction*. New Jersey, USA: Wiley Blackwell.
- Wang, C., & Zhuang, W. Y. (2019). Evaluating effective *Trichoderma* isolates for biocontrol of *Rhizoctonia solani* causing root rot of *Vigna unguiculata*. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(9), 2072-2079.
- Wijaya I, Oktarina, Virdanuriza M. (2011). Pembiakan massal jamur *Trichoderma* spp. pada beberapa media tumbuh sebagai agen hayati pengendalian penyakit tanaman [Internet]. *Agritrop Jurnal Ilmu-ilmu Pertanian*, 87-92. <http://digilib.unmuhjember.ac.id> [Diakses 20 Oktober 2020]
- Wu, Q., Sun, R., Ni, M., Yu, J., Li, Y., Yu, C., ... & Chen, J. (2017). Identification of a novel fungus, *Trichoderma asperellum* GDFS1009, and comprehensive evaluation of its biocontrol efficacy. *PloS one*, 12(6), e0179957.