

KAJIAN FORMULASI MUTAN TRICHODERMA SEBAGAI KANDIDAT AGENS PENGENDALI HAYATI HAWAR BELUDRU SEPTOBASIDIUM PADA LADA

STUDY OF TRICODERMA MUTAN FORMULATION AS BIOLOGICAL CONTROL AGENS CANDIDATE FOR SEPTOBASIDIUM VELVET BLIGHT ON PEPPER

Iman Suswanto

Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Tanjungpura
Jl. Jenderal Ahmad Yani Pontianak 78124 Telp. (0561) 740191
email: hayoountan@yahoo.co.id

ABSTRAK

Hawar beludru *Septobasidium* adalah penyakit utama di sentra lada Kalimantan Barat. Upaya pengendalian penyakit dengan *Trichoderma* spp. memberikan harapan besar. *Trichoderma* spp. memiliki keragaman yang tinggi, adaptif terhadap lingkungan ekstrim, mekanisme antagonis bekerja simultan antara antibiosis, hiperparasit dan kompetisi untuk beragam patogen. Media propagasi *Trichoderma* spp. juga mudah diperoleh dari lingkungan setempat. Penelitian ini bertujuan mengkaji isolat mutan *T. harzinum* sebagai bahan aktif biofungisida, pembuatan formulasi granuler, kemampuan bertahan dan efektifitas biofungisida di lapangan. Kegiatan meliputi perbanyakan mutan unggul *Trichoderma* spp isolat Th-E1002, serangkaian uji untuk konfirmasi kemampuan antagonis, degradasi kitin, sporulasi dan pertumbuhan miselium. Pembuatan formulasi granular dengan bahan pembawa seperti tepung beras ketan, bawang putih dan lengkuas. Pengujian kualitas biofungisida melalui aplikasi di lapangan dan kelayakan selama masa penyimpanan. Hasil penelien menunjukkan agens hayati yang baik dapat diperoleh melalui seleksi yang mempertimbangkan berbagai cara kerja agens hayati baik berupa antibiosis, kompetisi maupun hiperparasit. Formulasi biofungisida granuler berbentuk keping berbahan aktif isolat mutan *T. harzianum* Th-1002 memiliki berat 5 gr, kepadatan konidia $3,5 \times 10^6$ /keping dan viabilitas konidia mencapai 80%. Masa pakai terbaik dari biofungisida granuler dalam kantong plastik hanya mencapai 1 bulan. Dosis aplikasi 1 tablet/liter digunakan 2-3 kali mampu menghambat *Septobasidium* spp mencapai 70-80%. Kata kunci: hormon organik, pupuk cair organik, stum mata tidur karet.

Kata kunci: biofungisida, hawar beludru, lada.

ABSTRACT

Septobasidium velvet blight is a major disease of pepper in West Kalimantan. Efforts to control the disease with Trichoderma spp. gives great expectation. Trichoderma spp. has a high diversity, adapted to extreme environmental conditions, and has an antagonistic mechanism that works simultaneously among antibiosis, hiperparasit and competition to diverse pathogens. Propagation medium for Trichoderma spp. also easily obtained from the local environment. This study aims to assess the mutant isolates of T. harzinum as an active ingredient of biofungicide, production of granular formulations for foliar spray application, survivability of biofungicide, and its effectiveness in the field application. The research include the multiplication of superior mutant of Trichoderma spp isolates Th-E1002 through the ability on antagonistic function, chitin degradation, sporulation and mycelia growth. The granular formulation were made with carrier materials such as glutinous rice flour, garlic and galangal. Biofungicidal quality assessment conducted with field application and its viability in storage. The results showed that superior biological control agents can be obtained through selection based on various mode of action such as antibiosis, competition, and hiperparasit. Granular biofungicide formulations are made in tablet shape with 5 grams weight, contain active ingredient of

mutant isolates of *T. harzianum* Th-1002 with density of 3.5×10^6 conidia/granule and conidial viability reached 80 %. The granular biofungicide stored in a plastic bag can stand for only 1 month. The use of biofungicide 1 tablet / liter 2-3 times application can inhibit development of *Septobasidium* spp 70-80 % .

Keyword: biofungicide, pepper, *Septobasidium*, UV ray, velvet blight

PENDAHULUAN

Lada merupakan komoditas andalan penghasil devisa negara. Dalam satu dekade terakhir, Vietnam menjadi negara pengekspor lada terbesar disusul oleh Indonesia, Brazil, India, Malaysia, Srilanka dan Cina. Volume perdagangan lada internasional mencapai 400 ribu ton/tahun merupakan peluang pasar besar bagi lada nasional. Di lain pihak, produksi lada nasional cenderung mengalami penurunan. Saat ini produksi nasional berkisar 80-90 ribu ton/tahun dan sebagian besar produksi ditujukan untuk mengisi kebutuhan ekspor (Ginting, 2014).

Salah satu kendala produksi lada, khususnya di sentra lada Kalimantan Barat adalah penyakit hawar beludru oleh *Septobasidium* spp. Cendawan masuk dalam anggota Basidiomycetes memiliki ciri lapisan miselium membentuk jalinan tebal dan kuat yang menyelimuti permukaan tanaman mulai dari batang, cabang, ranting maupun buah. Sampai saat ini belum diperoleh teknik pengendalian yang memuaskan (Suswanto, 2009).

Salah satu agens pengendali yang memberi harapan besar adalah penggunaan *Trichoderma* spp. Selama ini cendawan ini banyak digunakan untuk pengendalian patogen yang menginfeksi bagian akar/tanah. *Trichoderma* spp. sebagai agens pengendali hayati telah banyak dilaporkan, baik pada patogen tular udara (*airborne*) maupun tular tanah (*soilborne*). Lebih dari 80% produk biofungisida yang dipasarkan memiliki bahan aktif cendawan ini (Kucuk & Kivanc, 2008).

Mekanisme antagonis *Trichoderma* spp. mulai dari pertumbuhan buluh kecambah, pengenalan diperantarai lektin dan pembentukan struktur hifa perangkap atau hifa penetrasi melibatkan berbagai proses enzimatis seperti chitinase, β glucanase dan proteinase serta metabolit sekunder lainnya yang dapat

mematikan patogen (Kucuk & Kivanc, 2008 dan Zivkovic *et al.*, 2010).

Berdasarkan mekanisme antagonis tersebut maka efektifitas penggunaan cendawan ini akan meningkat apabila agens pengendali berada di tempat infeksi *Septobasidium* spp. Oleh karena itu perlu dikembangkan formulasi biofungisida yang tepat sehingga dapat meningkatkan efektifitas kinerja agens pengendali, memudahkan dalam aplikasi dan distribusi.

Penelitian ini bertujuan mengkaji isolat mutan *T. harzianum* sebagai bahan aktif biofungisida, pembuatan formulasi granuler, kemampuan bertahan dan efektifitas biofungisida di lapangan.

BAHAN DAN METODE

Persiapan Isolat Mutan

Mutasi *T. harzianum* menggunakan metoda Hamad *et al.* (2001). Isolat *T. harzianum* pada media PDA berumur 1 minggu setelah inkubasi (MSI) dibuat suspensi dengan konsentrasi 5×10^3 /ml. Banyaknya konidia dihitung dengan haemositometer. Sebanyak 10 ml suspensi konidia dimasukkan dalam cawan petri diameter 9 cm, di tempatkan 20 cm dibawah lampu UV-C 15 watt dalam enkas mutasi. Selama pemaparan, cawan petri dalam keadaan terbuka. Lama waktu pemaparan 8 menit sesuai dengan (Patil & Lunge, 2012). Perbanyakkan inokulan sesuai dengan Wahyudi & Suwahyono (1997). Mutan *T. harzianum* sebanyak 50 ml suspensi konidia ditambahkan per 1 liter media cair, kemudian dimasukkan fermentor kapasitas 10 L diinkubasi pada 25°C, kecepatan pengaduk 30 rpm selama 1 MSI. Suspensi inokulan mutan dihitung kembali dengan haemositometer untuk mengetahui kepadatan konidia yang terbentuk.

Beberapa karakter isolat mutan.

Beberapa pengujian dilakukan untuk memastikan bahwa sifat isolat mutan layak digunakan sebagai agens pengendali. a) Pertumbuhan isolat diukur diameter miselium dengan mistar. b) Kemampuan sporulasi diketahui dengan mengukur proporsi bagian koloni yang telah mengalami sporulasi. c) Daya antagonis diukur daya hambat isolat mutan terhadap perkembangan *Septobasidium* spp. sesuai metoda Royse & Ries (1977) sebagai berikut:

$$PP = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

Keterangan:

PP: penghambatan pertumbuhan (%), R1: pertumbuhan jejari patogen pada media tanpa agens hayati; R2: pertumbuhan jejari patogen pada media dual kultur dengan agens hayati.

d) Daya degradasi kitin agar untuk mengetahui kemampuan isolat mutan *T. harzianum* dalam memanfaatkan kitin sebagai sumber karbon. Kemampuan isolat mutan diukur diameter zone terang yang merupakan tanda terjadi degradasi kitin. Pengujian sesuai dengan metoda Agrawal & Kotasthane (2009). Semua pengujian diamati pada hari ke 3 setelah inkubasi.

Pembuatan Formulasi Granuler.

Proses pembuatan sesuai dengan metoda Kumalaningsih & Hidayat (1995) yang telah dimodifikasi. Tepung beras ketan putih 1 kg gram dicampur tepung bawang putih 1 ons dan perasan 1 ons lengkuas dan konsentrasi mutan *T. harzianum* 1×10^9 konidia/ml sebanyak 600 ml/kg tepung. Semua bahan diaduk sampai homogen. Adonan dibuat kepingan berdiameter 2 cm dengan berat 5 gr/keping. Selanjutnya kepingan dikeringanginkan selama 3 hari dan dikemas dalam kantung plastik tertutup rapat.

Viabilitas Konidia selama Penyimpanan.

Pengukuran viabilitas dilakukan untuk mengetahui daya kecambah konidia selama penyimpanan. Persentase viabilitas diketahui dari proporsi antara konidia yang membentuk koloni pada media PDA dengan kepadatan suspensi konidia. Penukuran viabilitas dilakukan sampai 2 bulan setelah penyimpanan, sedangkan viabilitas kontrol dilakukan sebelum

penyimpanan. Satu gram kepingan biofungisida dihaluskan dengan mortar, dilarutkan dalam 1 liter akuades steril dan dibuat pengenceran berseri 10^{-1} sampai 10^{-5} . Masing-masing pengenceran dihitung kepadatan konidianya menggunakan haemocytometer dan viabilitas konidia diketahui dengan menghitung koloni yang tumbuh pada media PDA.

Efektifitas Biofungisida Di Lapangan.

Kegiatan ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas biofungisida berbahan aktif Th-E1002 di kebun lada masyarakat. Perlakuan berupa frekuensi penyemprotan (S) terdiri atas kontrol (tanpa disemprot), 1 x penyemprotan (1S), 2 x penyemprotan (2S) dan 3 x penyemprotan (3S) dengan interval antar penyemprotan 1 minggu. Perlakuan disusun berdasarkan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 3 ulangan. Dosis semprot menggunakan 15 keping/volume semprot (15 L). Cara pemakaian biofungisida disemprotkan ke seluruh permukaan tanaman. Reisolasi dilakukan untuk konfirmasi bahwa pengaruh perlakuan disebabkan oleh kinerja agens hayati. Reisolasi ditujukan untuk pengecekan kembali viabilitas *T. harzianum*, sifat antagonisme dan kemampuan degradasi kitin. Pengamatan uji efikasi biofungisida dilakukan dengan mengukur panjang miselium *Septobasidium* spp. 2 minggu setelah penyemprotan terakhir.

Analisis Data

Analisis data berupa standar deviasi, uji anova atau perbandingan berganda LSD pada taraf nyata 0,05.

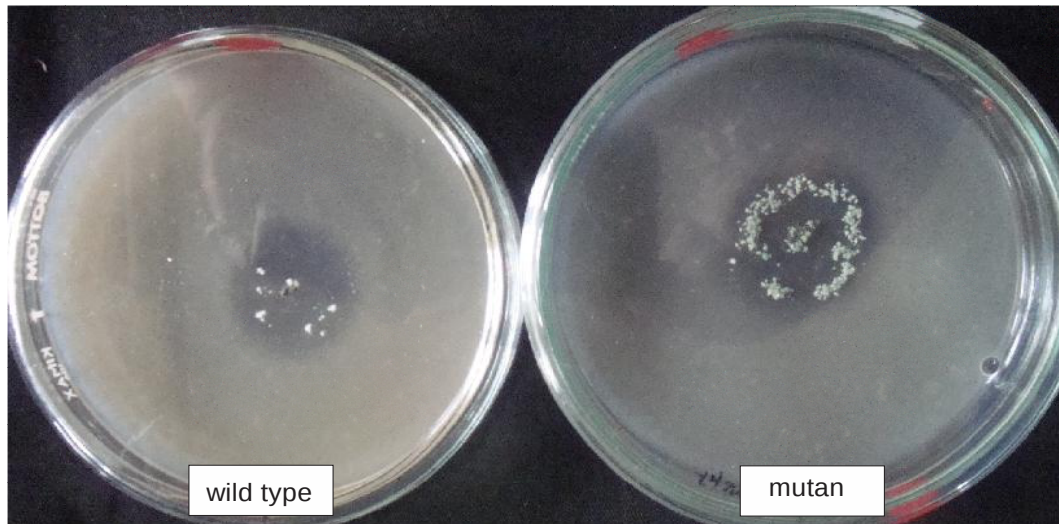
HASIL DAN PEMBAHASAN

Sifat-Sifat Agens Pengendali Hayati

Pengamatan isolat mutan *T. harzianum* dengan UV menunjukkan bahwa isolat mutan memiliki keunggulan waktu sporulasi lebih cepat, kemampuan daya degradasi kitin yang lebih tinggi (Tabel 1). Hal ini berarti penilaian agens pengendali hayati seharusnya tidak hanya terbatas pada mekanisme antibiosis, tetapi juga perlu dipertimbangkan mekanisme antagonisme lain seperti persaingan terhadap ruang dan parasitisme ditunjukkan dengan degradasi kitin agar.

Tabel 1. Beberapa perubahan sifat *T. harzianum* hasil induksi UV-C selama 8 menit yang diamati pada 3 hari setelah inokulasi (HSI)

Jenis <i>T. harzianum</i>	Diameter miselium (cm)	Proporsi miselium sporulasi (%)	Daya antagonis (cm)	Diameter degradasi kitin agar (cm)
Wild type	4,30 ± 0,10	28,3 ± 2,89	0,43 ± 0,03	1,77 ± 0,15
Mutan	4,07 ± 0,12	36,7 ± 2,89	0,40 ± 0,06	2,93 ± 0,32

Gambar 1. Pertumbuhan *T. harzianum* pada media kitin agar pada 3 HSI

Hasil pengamatan pada Gambar 1 menunjukkan bahwa pertumbuhan koloni *T. harzianum* lambat sehingga miselium pada media kitin agar hanya terlihat tipis. Hal ini berarti media kitin masih dapat dimanfaatkan sebagai sumber karbon. Menurut Samuels *et al.* (2010), media tumbuh berpengaruh terhadap morfologi *Trichoderma* spp. Pada media dengan kadar nutrisi minimum maka akan terbentuk koloni yang transparan dan sebaliknya pada media dengan nutrisi cukup koloni dapat terlihat berwarna hijau gelap.

Lebih lanjut Zivkovic *et al.* (2010) menyatakan bahwa *Trichoderma* spp. memiliki kemampuan antagonis terhadap patogen melalui kerja enzim kitinase dan glukonase dengan mendegradasi dinding sel patogen. Hifa *Trichoderma* spp. juga memiliki kemampuan untuk melilit, mengkait dan menusuk hifa jamur patogen. Daya bunuh *Trichoderma* spp. terhadap patogen dapat juga disebabkan oleh produksi antibiotik seperti trichodermin, trichodermol, trichotoxin, harzianum A dan harzianolide.

Biofungisida Formulasi Granuler

Hasil pengamatan formulasi biofungisida menunjukkan bahwa formulasi granula berukuran diameter 2 cm, berat 5 gr dan kandungan konidia 3.52×10^6 konidia/keping. Sumber inokulum sebagai bahan aktif biofungisida berupa suspensi konidia mutan *T. harzianum* dengan kepadatan konidia sebesar 1.2×10^9 konidia/ml. Suspensi konidia dengan kepadatan konidia yang tinggi ini dapat dihasilkan dari perbanyakan melalui media cair PDA tanpa agar yang diinkubasi selama 7 hari pada suhu 25°C dalam fermentor kapasitas 10 L. Hal ini berarti kondisi lingkungan dan media yang digunakan dalam fermentor mampu mendukung pertumbuhan *T. harzianum* dengan baik. Media cair mempermudah jamur dalam mengabsorpsi nutrisi. Media cair yang terus diputar/digojok menyebabkan sel cendawan terpisah sehingga memacu untuk terus berkecambah membentuk miselium baru.

Pertumbuhan jamur dipengaruhi oleh substrat, kadar air, derajat keasaman substrat (pH) dan senyawa kimia lingkungan. Media tumbuh yang baik bagi *T. harzianum* dapat diperoleh dari campuran kompos ela sagu dan

sekam sehingga cendawan mampu menghasilkan konidia mencapai $7,08 \times 10^9/\text{mL}$ (Uruilal *et al.*, 2012).

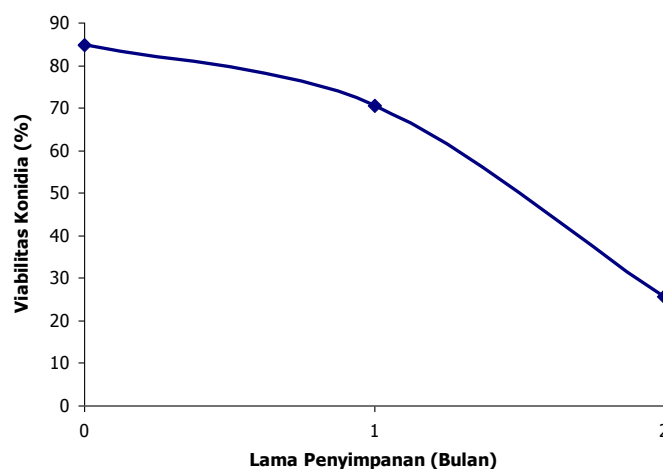
Viabilitas Formulasi Granuler

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa viabilitas konidia Th-E1002 di dalam keping biofungisida tergolong baik. Pada minggu-minggu awal viabilitas konidia mencapai 85%, viabilitas akan menurun selama penyimpanan dalam kantung plastik pada 1 dan 2 bulan berturut-turut 71 dan 26%. Penurunan yang

sangat tinggi pada bulan ke dua diduga disebabkan oleh kantung plastik yang kurang rapat. Kondisi ini menyebabkan kelembapan relatif tinggi sehingga memicu perkecambahan konidia *T. harzianum* maupun cendawan lainnya. Hal ini dapat diketahui dari perubahan warna keping biofungisida menjadi hijau atau hitam. Dengan demikian disarankan penggunaan biofungisida diusahakan sampai 1 bulan setelah pembuatan.



Gambar 2. Biofungisida formulasi granula dengan bahan aktif mutan *T. harzianum* yang disimpan dalam kantung plastik



Gambar 3. Viabilitas konidia *T. harzianum* selama masa penyimpanan dalam kantung plastik selama 2 bulan

Labuza (1979) menyatakan bahwa nilai a_w (water activity) menggambarkan tingkat keterikatan air pada bahan pangan yang dapat digunakan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhan. Nilai a_w terbentang antara 0,1 - 1,0. Aktifitas dan pertumbuhan cendawan berada pada nilai a_w minimal 0.60. Peningkatan kelembapan bahan makanan dalam penyimpanan akan diikuti pula oleh peningkatan nilai a_w .

Ketan putih banyak dipilih sebagai sumber karbon *Trichoderma* spp. Ketan putih memiliki kandungan protein cukup tinggi (10,59%) dibandingkan dengan kandungan protein jagung manis yakni sebesar 9,2% maupun beras IR66 sebesar 6,8%. Penggunaan tepung ketan putih sebagai bahan pembawa mampu mempertahankan daya simpan *Trichoderma* spp sampai 2 bulan masih tumbuh baik ketika ditumbuhkan pada media PDA dan mampu memproduksi konidia dengan kerapatan tertinggi (Salamiah *et al.*, 2011).

Efektifitas Biofungisida Di Lapangan

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa frekuensi penyemprotan biofungisida berpengaruh terhadap perkembangan miselium patogen (Gambar 4). Kemampuan daya hambat biofungisida meningkat seiring dengan frekuensi aplikasi penyemprotan. Perkembangan miselium *Septobasidium* spp. pada tanaman kontrol dan aplikasi penyemprotan 1, 2 dan 3 kali berturut-turut sebesar 11, 5,5, 3,3 dan 1,8 cm atau sebesar 50, 70 dan 83% pada pengamatan 2 minggu setelah penyemprotan terakhir.

Hasil terbaik penggunaan biofungisida ini dapat dicapai minimal penyemprotan 2 kali dengan interval 1 minggu. Dampak penggunaan biofungisida pada awalnya menghambat pertumbuhan miselium dan akhirnya menyebabkan terkelupasnya lapisan miselium *Septobasidium* spp. dari cabang dan ranting tanaman.

Keberhasilan biofungisida dalam menekan perkembangan miselium patogen memberi harapan besar pengembangan Th-E1002 sebagai komponen pengendali. Kelebihan penggunaan biofungisida selain mampu menekan penyakit juga bahan aktif Th-E1002 mampu bertahan di lapangan.

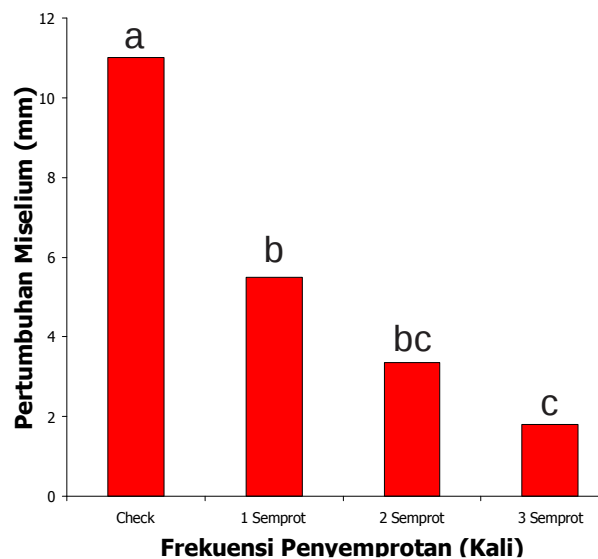
Menurut Couch (1930), jamur tumbuh dan menyelimuti hampir sebagian besar permukaan tanaman. Pengamatan irisan jaringan terinfeksi dengan mikrotom tidak pernah dijumpai adanya penetrasi jamur ke dalam jaringan tanaman, bahkan pada jaringan yang paling luar sekalipun. Lebih lanjut dikatakan pengerokan bagian tanaman yang diselimuti miselium jamur akan mengembalikan warna normal cabang lada setelah 4 minggu kemudian.

Pengamatan menunjukkan bahwa hasil reisolasi Th-E1002 pada 5 minggu setelah penyemprotan pertama masih dapat diperoleh *T. harzianum*. Hal ini menunjukkan agens hayati dapat bertahan di lingkungan. Penggunaan pengendalian hayati secara teratur di masa yang akan datang diharapkan mampu menekan perkembangan patogen secara alami. Keberhasilan yang lebih tinggi dicapai apabila penggunaan agens hayati digunakan berulang-ulang.

Menurut Untung (2006) pengendalian hayati memiliki keuntungan antara lain : 1) Aman artinya tidak menimbulkan pencemaran lingkungan dan keracunan pada manusia dan ternak, 2). tidak menyebabkan resistensi hama, 3). Musuh alami bekerja secara selektif terhadap inangnya atau mangsanya, dan 4). Bersifat permanen untuk jangka waktu panjang lebih murah, apabila keadaan lingkungan telah setabil atau telah terjadi keseimbangan antara hama dan musuh alaminya.

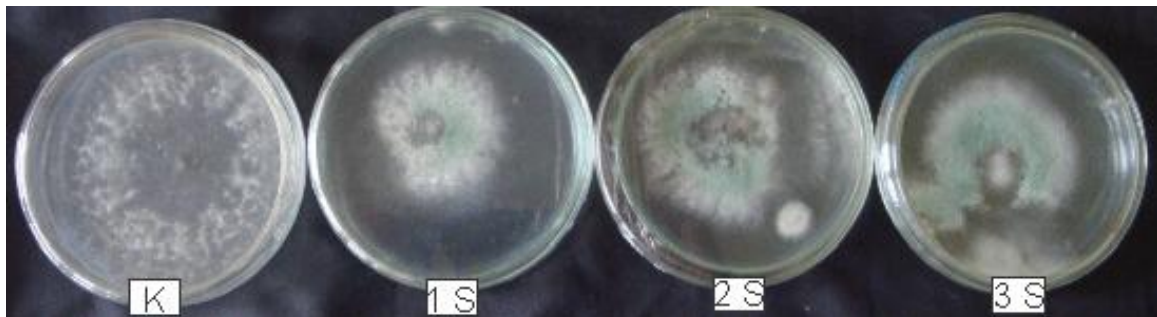
Lebih lanjut Gnanamanickam *et al.* (2002) menyatakan bahwa keberhasilan pengendalian hayati dapat dicapai antara lain dengan menjaga aktifitas populasi asli yang ditingkatkan melalui biakan massal, pelepasan secara periodik dan kolonisasi untuk menekan patogen atau dengan strategi augmentasi.

Hasil pengamatan pada Gambar 4 juga didukung dengan reisolasi pada tanaman uji (Gambar 5). Reisolasi miselium *Septobasidium* spp. dari lada sakit tanpa perlakuan memperlihatkan pertumbuhan miselium cendawan dan koloni *T. harzianum* berwarna kehijauan. Pertumbuhan miselium patogen pada tanaman kontrol lebih besar dibandingkan dengan tanaman dengan perlakuan. Hal ini membuktikan bahwa keberadaan *T. harzianum* mampu menekan pertumbuhan patogen, ditandai dengan miselium *Septobasidium* spp yang lebih kecil.



Gambar 4. Kemampuan biofungisida mutan *T. harzianum* dalam menghambat pertumbuhan miselium *Septobasidium* spp. pada tanaman lada

Keterangan: grafik batang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata dengan uji LSD taraf 0,05



Gambar 5. Reisolasi miselium *Septobasidium* spp. dari lada sakit pada 2 minggu setelah aplikasi biofungisida terakhir

Dengan demikian penggunaan biofungisida memberi harapan besar dapat menekan penyakit. Biofungisida dapat bersifat pengobatan (*curative*) dan di masa yang lebih panjang dapat berperan dalam menekan penyebaran dan infeksi patogen (*protectant*).

SIMPULAN

1. Agens hayati yang baik dapat diperoleh melalui seleksi yang mempertimbangkan berbagai cara kerja agens hayati baik berupa antibiosis, kompetisi maupun hiperparasit.
2. Formulasi biofungisida granuler berbentuk keping berbahan aktif isolat mutan *T.*

harzianum Th-E1002 memiliki berat 5 gr, kepadatan konidia $3,5 \times 10^6$ /keping dan viabilitas konidia mencapai 80%.

3. Masa pakai terbaik dari biofungisida granuler dalam kantong plastik hanya mencapai 1 bulan.
4. Dosis aplikasi 1 tablet/liter digunakan 2-3 kali mampu menghambat *Septobasidium* spp mencapai 70-80%.

SANWACANA

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional yang telah

membantu pendanaan Penelitian ini melalui penelitian Hibah Strategis Nasional (STRANAS) Tahun Anggaran 2013-2014

DAFTAR PUSTAKA

- Agrawal T. & Kotasthane A. 2009. A simple medium for screening chitinase activity of *Trichoderma* spp. Methods of molecular identifications and lab protocols. 1-7
- Couch, JF. 1930. The Biological Relationship between *Septobasidium* retiforme (B&C) Pat. and *Aspidiotus osborni* New. and Ckll. Paper presented at the International Botanical Congress, Cambridge, England, August 19, 1930
- Ginting, KH. 2014. Lada Putih Indonesia di Pasar Lada Putih Dunia. <http://ekonomi.kompasiana.com/agrobisnis/2014/06/13/lada-putih-indonesia-di-pasar-lada-putih-dunia-658417.html>. Diakses 14 Desember 2014
- Gnanamanickam, S.S., P. Vasudevan, M.S. Reddy, J.W. Kloepper & G. Defago, 2002. Principles of Biological Control. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Hamad, A., I. Haq, M.A. Qadeer & I. Javed, 2001. Screening of *Bacillus licheniformis* mutants for improved production of alpha-amylase. Pak. Jour. Bot. 33: 517-525.
- Küçük, Ç. & M. Kıvanç, 2008. Mycoparasitism in the biological control of *Gibberella zeae* and *Aspergillus ustus* by *Trichoderma harzianum* Strains. Journal of Agricultural Technology 4(2): 49-55
- Kumalaningsih, S & Hidayat N. 1995. Mikrobiologi Hasil Pertanian. IKIP Malang. Malang
- Labuza, TP. 1979. Open shelf life dating of food. OTA publishing, USA.
- Patil, AS & Lunge AG. 2012. Strain improvement of *Trichoderma harzianum* by UV mutagenesis for enhancing its biocontrol potential against aflatoxigenic *Aspergillus* species. The Experiment 4(2): 228-242
- Salamiah, EN Fikri & Asmarabia, 2011. Viabilitas *Trichoderma harzianum* yang disimpan pada beberapa bahan pembawa dan lama penyimpanan yang berbeda. Posted on 12 Januari 2011. Diakses 14 Desember 2014
- Samuels GJ, Chaverri P, Farr DF & McCray E. 2010. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA
- Royse, DJ & Ries SM. 1977. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of Cytosporacina. Phytopathol. 63: 603-607
- Suswanto, I., 2009. Kajian *Septobasidium* sp sebagai penyebab penyakit busuk cabang lada (*Piper nigrum* L.). Buletin Agro Industri 26: 14-25
- Untung, KS. 2006. Pengantar Pengelolaan Hama Terpadu. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Wahyudi, P & Suwahyono U. 1997. Proses produksi biofungisida *Trichoderma harzianum* bentuk padat dengan memanfaatkan bahan baku lokal. Analisis Sistem. 10 (4): 129-136
- Uruilal, C, Kalay AM, Kaya E & Siregar A. 2012. Pemanfaatan kompos ela sagu, sekam dan dedak sebagai media perbanyakan agens hayati *Trichoderma harzianum* Rifai. Agrologia, 1 (1): 21-30
- Živković, S, Stojanović S, Ivanović V, Gavrilović V, Popović T & Balaž J. 2010. Screening of Antagonistic Activity of Microorganisms Against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. Arch. Biol. Sci. Belgrade. 62 (3): 611-623