

BAB I

PENDAHULUAN UMUM

1.1 Latar Belakang

Kebutuhan jagung dalam negeri, terutama untuk bahan baku pakan ternak menunjukkan tren yang terus meningkat setiap tahunnya, hal ini sejalan dengan semakin berkembangnya industri peternakan di Indonesia. Untuk mengantisipasi keadaan tersebut, perlu dilakukan usaha peningkatan produksi jagung dalam negeri, sehingga dapat mengurangi ketergantungan terhadap jagung impor (Fahmi & Sujitno, 2015). Jumlah produksi jagung yang cenderung menurun tidak terlepas dari permasalahan dalam budidaya yang ada. Penurunan jumlah produksi jagung salah satunya disebabkan oleh serangan hama dan penyakit. Penyakit bulai, hawar daun dan karat daun merupakan penyakit utama jagung yang dapat menghambat peningkatan produksi jagung. Namun penyakit bulai menjadi kendala paling serius akhir-akhir ini karena dilaporkan menginfeksi varietas-varietas unggul baru sehingga berpotensi secara nyata menurunkan hasil jagung dalam skala nasional (Hendrayana et al., 2020). Menurut Hoerussalam et al. (2013) penyakit bulai dapat menyebabkan penurunan hasil jagung mencapai 90%, terutama apabila infeksi patogen terjadi sejak awal periode pertumbuhan vegetatif.

Patogen bulai berasal dari inang graminicolous (*Poaceae*) adalah anggota dari delapan genera yang berbeda secara morfologis dan filogenetik dalam keluarga Peronosporaceae (*Oomycota*, *Peronosporales*) (Crouch et al., 2022). Spesies *Peronosclerospora* spp. telah mengakibatkan kerugian yang signifikan akibat epidemi bulai di seluruh dunia (Salcedo et al., 2021). Patogen ini tergolong obligat parasit sehingga gaya hidupnya bersifat biotrofik yakni bergantung pada tanaman inang untuk nutrisi, air, dan mineral (L. Guo et al., 2016) dan beberapa parasit bersifat fakultatif. Namun, menurut M. Junaid & Guest (2021) parasit obligat dapat disubkultur dengan teknik peleburan agar untuk menghindari risiko kontaminasi DNA. Di Indonesia, penyakit bulai pada awalnya hanya terjadi pada beberapa sentra pertanaman jagung, tetapi seiring dengan semakin meluasnya areal pertanaman maka penyakit ini telah menyebar hampir di seluruh pulau atau wilayah yang luas di Indonesia. Berdasarkan karakteristik morfologi konidia 76 isolat *Peronosclerospora* spp. yang dikoleksi dari tujuh provinsi sentra produksi jagung di Indonesia, diperoleh tiga spesies, yaitu *P. maydis* yang ditemukan di Jawa Timur, Lampung, dan Kalimantan Barat, *P. sorghi* di Sumatera Utara dan Jawa Barat, dan *P. philippinensis* ditemukan di Sulawesi Selatan (Muis et al., 2013; 2016). Survei teranyar penyakit bulai pada jagung di Indonesia oleh Muis et al. (2023) menemukan spesies baru *Peronosclerospora* sebagai *Peronosclerospora neglecta* yang tersebar luas di Asia Tenggara dari Thailand hingga Indonesia bagian timur.

Gejala penyakit bulai pada tanaman jagung mulai tampak pada umur 10-14 hari, kemudian meningkat dan mencapai puncaknya pada 4-5 minggu setelah tanam. Pada varietas yang tergolong rentan, makin awal tanaman terinfeksi, makin besar kehilangan hasil yang dapat mencapai 90% (Pakki, 2014). Pakki (2017) melaporkan individu tanaman yang terinfeksi lebih awal, sebagian menghasilkan tongkol yang tidak normal atau jumlah biji per tongkol rendah, dan ukurannya lebih kecil.

Penyakit bulai dapat dikendalikan menggunakan varietas tahan, sanitasi lingkungan, pergiliran tanaman atau rotasi tanaman, pengaturan waktu tanam agar serempak, dan perlakuan benih dengan fungisida sintetik yang salah satunya berbahan aktif metalaksil (Pakki et al., 2022). Pengelolaan penyakit tanaman dengan pendekatan terpadu dapat secara substansial mengurangi jumlah aplikasi insektisida/fungisida di lapangan (Nasruddin et al., 2020). Penggunaan metalaksil secara terus menerus dalam jangka waktu lama telah menimbulkan resistensi pada penyebab penyakit bulai (Pakki & Burhanuddin, 2013). Alternatif pengendalian yang dapat dipilih adalah agensia pengendali hayati yang ramah lingkungan seperti bakteri dan cendawan endofit yang dapat digunakan meningkatkan resistensi tanaman terhadap patogen dengan menginduksi ketahanan tanaman jagung (Djaenuddin, Azrai, et al., 2021) (Djaenuddin, Hary, et al., 2021). Juga dengan terbatasnya kultivar jagung tahan penyakit bulai, pengendalian hayati menggunakan mikroorganisme antagonis pasti akan mengurangi pencemaran lingkungan dan biaya tindakan perlindungan tanaman. Pemanfaatan agen biologi dapat dipertimbangkan sebagai alternatif yang menjanjikan dalam pengelolaan penyakit bulai pada jagung dalam kerangka sistem manajemen penyakit terpadu (Djaenuddin et al., 2018). Agens hayati menyajikan keragaman mekanisme yang terlibat dalam biokontrol fitopatogen, meliputi persaingan ruang dan nutrisi, antibiosis, produksi enzim litik, dan menginduksi resistensi (J. M. Junaid et al., 2013).

Pengetahuan tentang mekanisme agens hayati dalam melindungi tanaman sangat menentukan, baik jaminan efeknya pada tanaman maupun untuk pengembangan formulasi komersial, yang keberhasilannya terletak pada penciptaan lingkungan mikro dengan meningkatkan aktivitas biologisnya tanpa merangsang pertumbuhan patogen. Spesies agens hayati yang digunakan pada penelitian ini yaitu *Trichoderma asperellum*. Spesies ini memiliki karakteristik yang menarik, karena memungkinkan untuk hidup dalam kondisi stres abiotik (Yusnawan et al., 2021), sehingga membuat produksi dan penyimpanan jangka panjangnya lebih mudah. Di sisi lain, setelah inokulasi biopestisida, dimungkinkan untuk mengamati efek ganda pada tanaman karena tindakan agen biokontrol *T. asperellum*, mitigasi fitopatogen dan secara tidak langsung mendorong pertumbuhan tanaman (Rosmana et al., 2016) dengan peningkatan kesehatan tanaman. Endofit cocok digunakan untuk inokulasi karena mencerminkan kemampuan organisme ini untuk mengkolonisasi tanaman, dan beberapa penelitian telah menunjukkan komunikasi spesifik dan intrinsik antara bakteri dan tanaman inang dari spesies dan genotipe yang berbeda (Souza et al., 2015).

Istilah resistensi yang diinduksi adalah istilah umum untuk keadaan resistensi yang diinduksi pada tanaman yang dipicu oleh penginduksi biologis atau kimia, yang melindungi bagian tanaman yang tidak terpapar terhadap infeksi mikroba patogen dan/atau serangan serangga herbivora. Keadaan resistensi yang diinduksi ditandai dengan aktivasi mekanisme pertahanan laten yang diekspresikan pada proses selanjutnya dari patogen atau serangga herbivora (Pieterse et al., 2014). Tanaman mengembangkan mekanisme pertahanan untuk melawan tekanan biotik yang meliputi patogen (mikroorganisme penyebab penyakit), virus (Liu et al., 2017), herbivora perusak jaringan (Harun-Or-Rashid & Chung, 2017);(Singh et al., 2021), nematoda (Poveda et al., 2020);(TariqJaveed et al., 2021), dan tanaman parasit (Kaiser et al., 2015), serta melawan bahan kimia alel yang diproduksi oleh tanaman lain. Jaringan tanaman yang diinduksi menjadi lebih tahan daripada yang tidak diinduksi (normal). Induksi yang terjadi secara sistemik digambarkan sebagai induksi pertahanan pada bagian lokasi terjadinya infeksi ke seluruh bagian tanaman (Leiwakabessy, 2016). Namun, jika patogen mampu menghasilkan molekul efektor yang tidak dikenali oleh mekanisme pertahanan yang dimediasi oleh gen ketahanan tanaman, maka patogen akan mampu menginfeksi dan mengeksploitasi tanaman sehingga menimbulkan gejala penyakit. SAR (*Systemic Acquired Resistance*) dan ISR (*Induced Systemic Resistance*) adalah dua jenis mekanisme resistensi yang dipersiapkan tanaman untuk melawan infeksi patogen (A. Lal et al., 2018).

Kekebalan tanaman adalah proses kompleks dan sistem pertahanan dasar yang melindungi tanaman inang untuk bersaing dengan patogen (Ding et al., 2022). Kekebalan bawaan tanaman terutama mencakup dua jalur sistem pertahanan, yang disebut pola molekuler terkait patogen yang memicu kekebalan (*PTI Pattern Triggered-Immunity*) dan kekebalan yang dipicu oleh efektor (*ETI Effector Triggered-Immunity*). Ada pertukaran dan pengenalan sinyal yang luas dalam proses memicu jaringan pensinyalan kekebalan tanaman. Respons yang diinduksi dapat bersifat lokal atau sistemik tergantung dari penghalang fisik dan beberapa jalur pensinyalan, yang terlibat dalam pengenalan patogen melalui transduksi sinyal yang merespons secara defensif melalui ekspresi beberapa gen dan produknya (Andersen et al., 2018); (Sharma et al., 2020)). Menurut Pieterse et al. (2014) aktivasi jaringan transduksi sinyal imunitas tanaman terdiri dari asam salisilat (SA), asam jasmonik (JA), dan/atau etilen (E).

Ketahanan tanaman jagung terhadap penyakit bulai dikaitkan dengan aktivasi berbagai respon pertahanan yang memperlambat atau menghentikan infeksi pada tahap tertentu dari interaksi inang-patogen. Induksi ketahanan pada tanaman jagung terhadap penyakit bulai telah dilakukan (Djaenuddin et al., 2020) yang menunjukkan ekspresi gen pada tanaman yang diinduksi bakteri rizosfer memiliki pola pita protein yang relatif lebih tebal dibandingkan perlakuan tanpa induksi bakteri. Lanjut dikemukakan bahwa aplikasi bakteri rizosfer *B. paramycoides* Ga3 efektif menginduksi ketahanan tanaman jagung terhadap penyakit bulai dengan akumulasi kadar asam salisilat sebesar 9,6 ppm (Djaenuddin, Azrai, et al., 2021). Mekanisme pertahanan termasuk diantaranya penghalang fisik dan kimia yang sudah ada yang

mengganggu pembentukan patogen. Menurut Tambaru (2016) ketahanan setiap jenis tanaman dapat dipengaruhi oleh morfologi daun, permukaan daun, anatomi daun, kerapatan stomata, dan letak stomata pada permukaan daun.

Selama dua dekade terakhir, studi tentang resistensi terinduksi yang ditimbulkan secara fisiologis, biokimia, dan genetik telah mengungkapkan mekanisme yang sebelumnya tidak diketahui dari respon pertahanan tanaman termasuk priming pertahanan (pertahanan awal) yang dapat mengurangi keparahan dan kejadian penyakit tanaman, serta meningkatkan pertumbuhan dan hasil tanaman di bawah kondisi rumah kaca dan lapangan. Dalam hal mekanisme induksi ketahanan tanaman, mikroorganisme dapat mengaktifkan beberapa mekanisme perlindungan. Dalam penelitian ini kami akan mempelajari efek agen biotik *Trichoderma asperellum* AC.3 untuk mengendalikan penyakit bulai pada jagung serta memacu pertumbuhan tanaman dan efek mikroba endofit ini dalam menginduksi beberapa respon ketahanan tanaman yaitu secara biokimia, fisiologis, dan genetik.

1.2 Review of Evidence/Gap of Knowledge

Beberapa penelitian terkait perlakuan induksi agen biotik pada tanaman dengan perubahan biokimia, molekuler, dan struktural, sebagai respons resistensi pertahanan tanaman telah dilakukan. Cendawan berfilamen seperti *Trichoderma*, mikoriza, dan cendawan endofit lainnya mampu menginduksi resistensi terhadap nematoda dengan mengaktifkan hormon yang dimediasi mekanisme pertahanan tanaman (asam salisilat dan jasmonat, strigolakton antara lain) (Poveda et al., 2020). Aplikasi *T. asperelloides* pada tanah meningkatkan kandungan total fenol; kitinase, β -1,3-glukanase, polifenol oksidase dan aktivitas peroksidase serta mengurangi keparahan penyakit embun tepung sekitar 30% pada tanaman Anggur dibandingkan dengan kontrol fungisida (Sawant et al., 2020). Selain secara tunggal, induksi oleh agen biotik juga bisa dilakukan secara konsorsium. Kombinasi mikroba bakteri *B. amyloliquefaciens* 1841 dan cendawan *T. asperellum* GDFS1009, merangsang jalur pensinyalan yang berbeda dan meningkatkan produksi enzim terkait antagonis dan mikoparasitisme, metabolit sekunder, dan senyawa pemacu pertumbuhan tanaman (Karuppiah et al., 2019). Induksi menggunakan spesies *Trichoderma* lebih diunggulkan karena selain diketahui mampu mereduksi penyakit juga mampu mendorong pertumbuhan tanaman. Seperti yang dilaporkan (R. Guo et al., 2018) galur mutan *T. asperellum* T45 merangsang pertumbuhan semai dan perkembangan akar dan batang, serta mengurangi kejadian penyakit pada tanaman Poplar.

Fokus komunitas ilmiah terhadap pengendalian biologis fitopatogen sedang meningkat karena meningkatnya masalah lingkungan di seluruh dunia dan masalah kesehatan manusia. Pestisida, di sisi lain, berpotensi beracun bagi lingkungan dan berbagai ekosistem. Meskipun banyak dari bahan sintetik yang efisien dalam program pengendalian penyakit, namun paparan jangka panjang dan efek residualnya menjadi perhatian publik yang paling penting. Di antara agen pengendalian hayati, beberapa cendawan biokontrol telah menunjukkan kemampuan untuk mengurangi populasi beberapa patogen tanaman penting secara

ekonomi. *Trichoderma* spp. merupakan agen biokontrol penting terhadap fitopatogen. Mekanisme yang berbeda telah dilaporkan untuk menjelaskan sifat dari interaksi ini. Namun, diperkirakan bahwa terdapat tindakan multi-mekanisme yang melibatkan sinergi antara berbagai bentuk antagonisme. Dalam ranah pertanian saat ini, dengan penggunaan bahan kimia yang dibatasi dan kebutuhan akan pertanian berkelanjutan, pilihan *Trichoderma* spp. sebagai agen biokontrol terhadap patogen tanaman akan membantu mendorong program pengendalian penyakit yang efektif. Terakhir, perhatian khusus diberikan pada kesenjangan yang diamati yaitu faktor-faktor yang menghambat perkembangannya, khususnya dalam hal efektivitas dan prosedur legislasi.

1.3 Rumusan Masalah

Banyak mikroorganisme merugikan yang memiliki kemampuan untuk menyebabkan infeksi atau kerusakan tanaman, yang sebagian besar dikendalikan oleh bahan kimia beracun. Senyawa kimia ini dan turunannya juga menunjukkan efek berbahaya pada habitat dan kehidupan manusia. Oleh karena itu, ada kebutuhan untuk mengembangkan agen biokontrol baru yang lebih efektif dan aman. Berbagai mikroba seperti virus, bakteri, dan cendawan memiliki potensi besar untuk melawan fitopatogen dan karenanya dapat digunakan sebagai agen biokontrol terhadap senyawa kimia berbahaya. Agen biokontrol ini diaplikasikan pada tanaman untuk mengendalikan fitopatogen. Selain itu, pemanfaatannya dengan tepat untuk pengelolaan pertanian dapat menjadi cara menuju pendekatan berkelanjutan. Agen biokontrol/agens hayati memiliki berbagai cara kerja dalam perannya sebagai elisitor di mana mereka menginduksi sinyal untuk mengaktifkan mekanisme pertahanan tanaman terhadap berbagai patogen. Agens hayati mengontrol fitopatogen dan membantu dalam menekan penyakit melalui produksi enzim, senyawa antimikroba, aktivitas antagonis yang melibatkan hiper-parasitisme, resistensi yang diinduksi, penghambatan kompetitif, dan lain-lain. Pengenalan patogen yang efisien dan respons defensif yang cepat merupakan faktor kunci dari resistensi yang diinduksi pada tanaman. Fenomena resistensi ini berkaitan dengan pensinyalan kaskade kompleks yang melibatkan peningkatan jumlah protein pertahanan, asam salisilat (SA), atau induksi jalur pensinyalan yang bergantung pada hormon tumbuhan. Meskipun, ada kelangkaan informasi tentang mekanisme yang tepat dari resistensi yang diinduksi tanaman, penelitian ini dilakukan secara komprehensif mulai dari tingkat fisiologis, biokimia dan molekuler. Beberapa mikroorganisme alami dan rekombinan tersedia di alam sebagai agen biokontrol yang terutama mencakup strain *Bacillus*, *Pseudomonas* dan *Trichoderma*. Namun, pemahaman lengkap tentang agen biokontrol mikroba dan interaksinya pada tingkat seluler dan molekuler akan memfasilitasi penyaringan agen bio yang efektif dan ramah lingkungan, sehingga meningkatkan cakupan agen biokontrol tersebut.

Adapun tujuan penelitian ini mencakup:

Tujuan umum

Mengetahui serangkaian respon pertahanan tanaman yang dipicu oleh agen biokontrol *Trichoderma asperellum* AC.3 sebagai penginduksi dalam aktivasi mekanisme pertahanan tanaman yang dapat meningkatkan kapasitas pertahanan tanaman jagung terhadap penyakit bulai *Peronosclerospora maydis*

Tujuan khusus

1. Mengetahui efektifitas perlakuan kultur filtrat dan suspensi *T. asperellum* AC.3 dalam mengendalikan penyakit bulai di rumah kawat
2. Mengetahui kemampuan *T. asperellum* AC.3 dalam menginduksi aktifitas biokimia enzim peroksidase, polifenol-oksidadase, tirosin ammonia-lyase, serta kandungan total fenol
3. Mengidentifikasi potensi *T. asperellum* AC.3 dalam menginduksi lignifikasi dinding sel dan deteksi ROS sebagai respon awal fisiologis tanaman setelah diinokulasi patogen bulai
4. Mengidentifikasi ekspresi gen *Pathogenesis Related* protein dan enzim yang terjadi pada tanaman jagung setelah diinokulasi bulai dan diinduksi *T. asperellum* AC.3 secara molekuler
5. Mengidentifikasi kemampuan *T. asperellum* AC.3 sebagai pemacu pertumbuhan tanaman jagung melalui analisis senyawa metabolit dan fitohormon

1.4 Kegunaan Penelitian

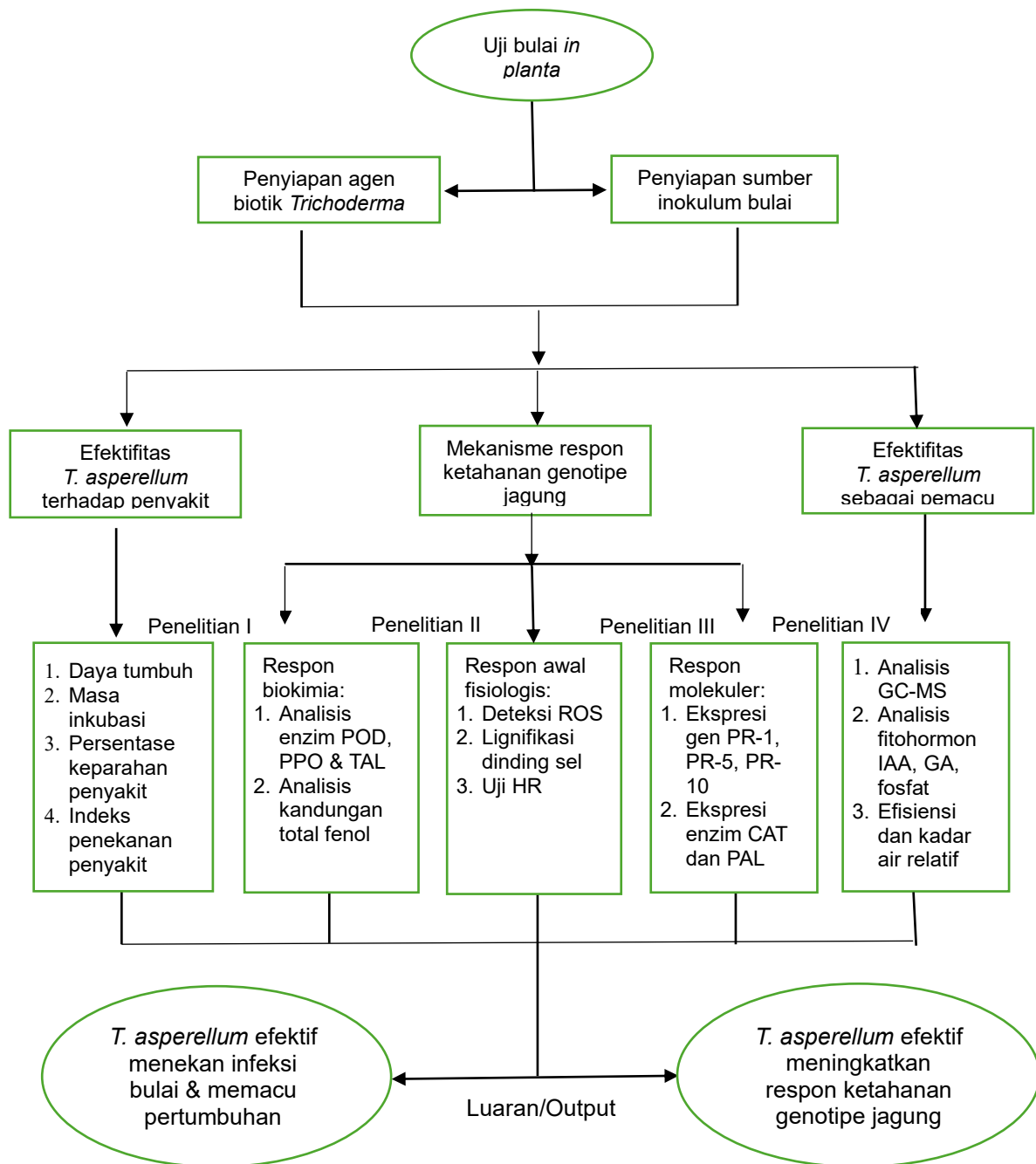
1. Secara teoritis diharapkan diketahui mekanisme ketahanan genotipe jagung melalui respon penghalang biokimia, fisiologi, dan genetik yang sudah ada pada tanaman;
2. Secara praktis diharapkan diperoleh teknologi pengendalian penyakit bulai melalui teknik ketahanan terinduksi oleh agen biotik.

1.5 Ruang Lingkup Penelitian

1. Pengujian potensi *T. asperellum* dalam menekan penyakit bulai di rumah kawat
2. Analisis aktifitas enzim (peroksidase, polifenoloksidase, tirosin ammonia-lyase) dan senyawa antioksidan (kandungan total fenol) pada tanaman jagung
3. Analisis respon fisiologis awal pada tanaman (lignifikasi dinding sel dan deteksi ROS)
4. Deteksi gen ketahanan tanaman (PR-1, PR-5, PR-10, enzim katalase dan fenilalanin ammonia-lyase)
5. Pengujian potensi *T. asperellum* dalam memacu pertumbuhan tanaman jagung *in planta* melalui identifikasi senyawa volatile dan analisis fitohormon

1.6. Kebaharuan Penelitian

Ada beberapa penelitian tentang interaksi *Trichoderma*-tanaman yang menjelaskan penggunaan dan manfaat *Trichoderma* spp. terhadap fitopatogen. Namun, penelitian komprehensif yang menggabungkan kemajuan terbaru dalam interaksi *Trichoderma*-jagung-bulai, masih kurang. Dalam hal ini, kami fokus pada kemajuan terbaru yang melibatkan kontrol tanaman-patogen bulai yang dimediasi *Trichoderma* dan menyoroti mekanisme respon yang mendasarinya. Pengembangan dari resistensi yang diinduksi oleh *T. asperellum* terhadap patogen bulai dilakukan mulai dari perlindungan yang ditimbulkan secara biokimia, perlindungan fisiologi dalam sel tumbuhan, dan karakterisasi ekspresi gen. Keseluruhan respon ketahanan tersebut akan mengkonfirmasi kemampuan *T. asperellum* sebagai agen biokontrol dan pemacu pertumbuhan pada tanaman jagung dengan terukur.



Gambar 1. 1 Diagram alir penelitian respon ketahanan terinduksi tanaman jagung terhadap bulai melalui analisis biokimia, fisiologi, dan molekuler

1.7 Daftar Pustaka

- A. Lal, M., Kathpalia, R., Sisodia, R., & Shakya, R. (2018). Biotic stresses. In *Plant Physiology, Development and Metabolism*. Springer Nature Singapore. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1_32
- Andersen, E. J., Ali, S., Byamukama, E., Yen, Y., & Nepal, M. P. (2018). Disease resistance mechanisms in plants. *Genes*, 9(339), 1–30. <https://doi.org/10.3390/genes9070339>
- Crouch, J. A., Davis, W. J., Shishkoff, N., Castroagudín, V. L., Martin, F., Michelmore, R., & Thines, M. (2022). Peronosporaceae species causing downy mildew diseases of Poaceae, including nomenclature revisions and diagnostic resources. *Fungal Systematics and Evolution*, 9(1), 43–86.
- Ding, L. N., Li, Y. T., Wu, Y. Z., Li, T., Geng, R., Cao, J., Zhang, W., & Tan, X. L. (2022). Plant Disease Resistance-Related Signaling Pathways: Recent Progress and Future Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24). <https://doi.org/10.3390/ijms232416200>
- Djaenuddin, N., Azrai, M., Kuswinanti, T., & Patandjengi, B. (2021). The effectiveness of rhizosphere bacteria in inducing resistance to downy mildew in maize, *Peronosclerospora philippinensis*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 807(2). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/807/2/022106>
- Djaenuddin, N., Hary, S., Muis, A., & Azrai, M. (2021). Antagonistic Bacteria *Bacillus subtilis* Formulation as Biopesticide to Control Corn Downy Mildew caused by *Peronosclerospora philippinensis*. *International Journal of Advanced Science Engineering Information Technology*, 11(6), 2148–2152. <https://doi.org/ISSN:2088-5334>
- Djaenuddin, N., Muis, A., & Nonci, N. (2018). Screen house test of eight biopesticide formulation *Bacillus subtilis* against downy mildew, *Peronosclerospora philippinensis* on corn plant. *Journal of Tropical Pest and Plant Disease*, 18(1), 51–56.
- Djaenuddin, N., Patandjengi, B., & Kuswinanti, T. (2020). Induksi ketahanan tanaman oleh bakteri rizosfer dan asam salisilat terhadap penyakit bulai pada jagung. Tesis. Universitas Hasanuddin. Makassar
- Fahmi, T., & Sujitno, E. (2015). Keragaan produktivitas varietas jagung pada musim hujan di lahan kering dataran tinggi Kabupaten Bandung, Jawa Barat Productivity performance of maize varieties in the wet season in upland plateau of Bandung. *Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*, 1, 1674–1677. <https://doi.org/10.13057/psnmbi/m010725>
- Fierro-corrales, D., Apodaca-sánchez, M. Á., Quintero-benítez, J. A., Leyva-mir, S. G., Flores-sánchez, J. L., & Tovar-pedraza, J. M. (2015). Morphological characterization and histopathology of. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 21(1), 81–92. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2014.02.010>
- Guo, L., Allen, K. S., Deulio, G., Zhang, Y., Madeiras, A. M., Wick, R. L., & Ma, L. J. (2016). A De Novo-assembly-based data analysis pipeline for plant obligate parasite metatranscriptomic studies. *Frontiers in Plant Science*, 7(JULY 2016), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00925>
- Guo, Q., Li, Y., Lou, Y., Shi, M., Jiang, Y., Zhou, J., Sun, Y., Xue, Q., & Lai, H. (2019). *Bacillus amyloliquefaciens* Ba13 induces plant systemic resistance and improves rhizosphere microecology against tomato yellow leaf curl virus disease. *Applied Soil Ecology*, 137(December 2018), 154–166.

- <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.01.015>
- Guo, R., Wang, Z., Zhou, C., Huang, Y., & Fan, H. (2018). Biocontrol potential of *Trichoderma asperellum* mutants T39 and T45 and their growth promotion of poplar seedlings. *Journal of Forestry Research*. <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0797-0>
- Harun-Or-Rashid, M., & Chung, Y. R. (2017). Induction of systemic resistance against insect herbivores in plants by beneficial soil microbes. *Frontiers in Plant Science*, 8(October), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01816>
- Hemati, P., Zafari, D., Mahmoodi, S. B., Hashemi, M., Gholamhoseini, M., Dolatabadian, A., & Ataei, R. (2018). Histopathology of charcoal rot disease (*Macrophomina phaseolina*) in resistant and susceptible cultivars of soybean. *Rhizosphere*, 1–29. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.06.009>
- Hendrayana, F., Lestari, N. A., Muis, A., & Azrai, M. (2020). Ketahanan Beberapa Varietas Jagung Hibrida Terhadap Beberapa Penyakit Penting Jagung Di Indonesia. *Jurnal Agriovet*, 3(1), 25. <https://doi.org/10.51158/agriovet.v3i1.419>
- Hoerussalam, Purwantoro, A., & Khaeruni, A. (2013). Induksi ketahanan tanaman jagung (*Zea mays* L.) terhadap penyakit bulai melalui seed treatment serta pewarisannya pada generasi S1. *Ilmu Pertanian*, 16(2), 42–59.
- Junaid, J. M., Dar, N. A., Bhat, T. A., Bhat, A. H., & Bhat, M. A. (2013). Commercial Biocontrol Agents and Their Mechanism of Action in the Management of Plant Pathogens. *International Journal of Modern Plant & Animal Sciences International Journal of Modern Plant & Animal Sciences Journal Homepage: Www.ModernScientificPress.Com/Journals/IJPlant.Aspx Int. J. Modern Plant & Anim. Sci*, 1(12), 39–57.
- Junaid, M., & Guest, D. (2021). Modified culture assay to obtain a diversity of hyphal structures of *Ceratobasidium theobromae*-VSD pathogen on cocoa. *Biodiversitas*, 22(4), 1879–1886. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220434>
- Kaiser, B., Vogg, G., Fürst, U. B., & Albert, M. (2015). Parasitic plants of the genus *Cuscuta* and their interaction with susceptible and resistant host plants. *Frontiers in Plant Science*, 6(FEB), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00045>
- Karuppiyah, V., Sun, J., Li, T., & Vallikkannu, M. (2019). Co-cultivation of *Trichoderma asperellum* GDFS1009 and *Bacillus amyloliquefaciens* 1841 Causes Differential Gene Expression and Improvement in the Wheat Growth and Biocontrol Activity. 10(May), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01068>
- Leiwakabessy, C. (2016). Potensi bakteri endofit dan asam salisilat sebagai penginduksi ketahanan tanaman padi terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Institut Pertanian Bogor.
- Liu, S. R., Zhou, J. J., Hu, C. G., Wei, C. L., & Zhang, J. Z. (2017). MicroRNA-mediated gene silencing in plant defense and viral counter-defense. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01801>
- Meraz-Perez, I. M., Carvalho, M. R., Sena, K. F., Lopes, Y. J. S., Junior, A. S. E., Lopes, U. V., Filho, L. P. S., Araújo, S. A., Soares, V. L. F., Pirovani, C. P., & Gramacho, K. P. (2021). The *Moniliophthora perniciosa* – cacao pod pathosystem: structural and activated defense strategies against disease establishment I.M. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 101656. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101656>
- Muis, A., Pabendon, M. B., & Nonci, N. (2016). Geographical distribution of *Peronosclerospora* spp., the causal organism of maize downy mildew, in Indonesia. *AAB Bioflux*, 8(3), 143–155.

- Muis, A., Pabendon, M. B., Nonci, N., & Waskito, W. P. (2013). Keragaman genetik *Peronosclerospora maydis* penyebab bulai pada jagung berdasarkan analisis marka SSR. *Jurnal Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*, 32(3), 139–147.
- Muis, A., Ryley, M. J., Tan, Y. P., Suharjo, R., Nonci, N., Danaatmadja, Y., Hidayat, I., Widiastuti, A., Widinugraheni, S., Shivas, R. G., & Thines, M. (2023). *Peronosclerospora neglecta* sp. nov.—a widespread and overlooked threat to corn (maize) production in the tropics. *Mycological Progress*, 22(12), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s11557-022-01862-5>
- Nasruddin, A., Agus, N., Saubil, A., Jumardi, J., Rasyid, B., Siriniang, A., Nasruddin, A. D., Firdaus, F., & Said, A. E. (2020). Effects of Mulch Type, Plant Cultivar, and Insecticide Use on Sweet Potato Whitefly Population in Chili Pepper. *Scientifica*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6428426>
- Pakki, S. (2014). Epidemiologi dan strategi pengendalian penyakit bulai (*Peronosclerospora* sp.) pada tanaman jagung. *Jurnal Penelitian Dan Pengembangan Pertanian*, 33(2), 47–52.
- Pakki, S. (2017). Kelestarian Ketahanan Varietas Unggul Jagung Terhadap Penyakit Bulai *Peronosclerospora maydis*. *Jurnal Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*, 1(1), 37–44.
- Pakki, S., & Burhanuddin. (2013). Peranan varietas dan fungisida dalam dinamika penularan patogen obligat parasit dan saprofit pada tanaman jagung. *Seminar Nasional Serealia 2013*, 443–454.
- Pakki, S., Djaenuddin, N., Saenong, S., & Aminah. (2022). Kombinasi Varietas dan Bahan Aktif Sintetik Secara Penyelubungan Benih (seed coating) dalam Pengendalian Penyakit Bulai (*Peronosclerospora philippinensis*). *Buletin Penelitian Tanaman Serealia*, 6(1), 49–57.
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Poveda, J., Abril-Urias, P., & Escobar, C. (2020). Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes by Filamentous Fungi Inducers of Resistance: Trichoderma, Mycorrhizal and Endophytic Fungi. *Frontiers in Microbiology*, 11(May), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00992>
- Rosmana, A., Nasaruddin, N., Hendarto, H., Hakkar, A. A., & Agriansyah, N. (2016). Endophytic association of *Trichoderma asperellum* within *Theobroma cacao* suppresses vascular streak dieback incidence and promotes side graft growth. *Mycobiology*, 44(3), 180–186. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2016.44.3.180>
- Salcedo, A. F., Purayannur, S., Standish, J. R., Miles, T., Thiessen, L., & Quesada-Ocampo, L. M. (2021). Fantastic downy mildew pathogens and how to find them: Advances in detection and diagnostics. *Plants*, 10(435), 1–24. <https://doi.org/10.3390/plants10030435>
- Sawant, I. S., Wadkar, P. N., Ghule, S. B., Salunkhe, V. P., Chavan, V., & Sawant, S. D. (2020). Induction of systemic resistance in grapevines against powdery mildew by *Trichoderma asperelloides* strains. *Australasian Plant Pathology*, 49(2), 107–117. <https://doi.org/10.1007/s13313-020-00679-8>
- Sharma, V., Sharma, A., Malannavar, A. B., & Salwan, R. (2020). Molecular aspects of biocontrol species of *Streptomyces* in agricultural crops. In *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture*. INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818469-1.00008-0>
- Siddaiah, C. N., Prasanth, K. V. H., Satyanarayana, N. R., Mudili, V., Gupta, V. K.,

- Kalagatur, N. K., Satyavati, T., Dai, X. F., Chen, J. Y., Mocan, A., Singh, B. P., & Srivastava, R. K. (2018). Chitosan nanoparticles having a higher degree of acetylation induce resistance against pearl millet downy mildew through nitric oxide generation. *Scientific Reports*, 8(2485), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19016-z>
- Singh, S., Kaur, I., & Kariyat, R. (2021). The multifunctional roles of polyphenols in plant-herbivore interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms22031442>
- Souza, R. De, Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), 401–419.
- Tahir, H. A. S., Gu, Q., Wu, H., Niu, Y., Huo, R., & Gao, X. (2017). Bacillus volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. *Scientific Reports*, 7(August 2016), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep40481>
- Tambaru, E. (2016). Identifikasi Karakteristik Morfologi dan anatomi stomata Flacourtia inermis Roxb. Di kawasan Kampus UNHAS Tamalanrea Makassar. *Jurnal Alam Dan Lingkungan*, 6(11), 37–41. <https://core.ac.uk/download/pdf/196255896.pdf>
- TariqJaveed, M., Farooq, T., Al-Hazmi, A. S., Hussain, M. D., & Rehman, A. U. (2021). Role of *Trichoderma* as a biocontrol agent (BCA) of phytoparasitic nematodes and plant growth inducer. *Journal of Invertebrate Pathology*, 183(January), 107626. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107626>
- Yusnawan, E., Taufiq, A., Wijanarko, A., Susilowati, D. N., Praptana, R. H., Chandrahioe, M. V., Supriyo, A., & Inayati, A. (2021). Changes in volatile organic compounds from salt-tolerant *Trichoderma* and the biochemical response and growth performance in saline-stressed groundnut. *Sustainability (Switzerland)*, 13(23). <https://doi.org/10.3390/su132313226>

BAB II

RESPON AKTIFITAS ENZIM YANG DIHASILKAN TANAMAN JAGUNG TERINDUKSI *Trichoderma asperellum* AC.3 DALAM MENSTIMULASI KETAHANAN TERHADAP PENYAKIT BULAI

2.1 Abstrak

Jagung (*Zea mays* L.) merupakan tanaman inang bagi banyak penyakit yang disebabkan oleh cendawan maupun bakteri. Salah satu penyakit utama jagung yang dilaporkan penting secara ekonomi adalah bulai. Penyakit ini menyebabkan kerusakan besar pada tanaman dan mengakibatkan kerugian ekonomi yang tinggi setiap tahunnya. Potensi spesies *Trichoderma* sebagai agen pengendali hayati pada tanaman telah diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi kemampuan *Trichoderma asperellum* isolat AC.3 didalam menginduksi resistensi pada tanaman jagung terhadap penyakit bulai yang disebabkan oleh *Peronosclerospora maydis* melalui analisis peningkatan aktivitas enzimatik terkait pertahanan yaitu peroksidase (POD), polifenol oksidase (PPO), tirosin amonia-lyase (TAL) dan kandungan total fenol. Pengujian evaluasi keparahan penyakit bulai dilakukan di rumah kawat dengan perlakuan terdiri atas kultur filtrat, suspensi *T. asperellum* AC.3, dan air steril (kontrol) yang masing-masing diujikan pada dua varietas jagung dengan tingkat ketahanan berbeda yakni JH 37 (agak tahan) dan Pulut Uri (sangat rentan). Hasil penelitian menunjukkan *T. asperellum* AC.3 dapat menginduksi ketahanan varietas jagung terhadap patogen bulai dengan tingkat penekanan penyakit pada perlakuan kultur filtrat antara 15-39% dan pada perlakuan suspensi sebesar 4-8%. Interaksi antara tanaman jagung dengan patogen bulai dan agens hayati *T. asperellum* AC.3 berpengaruh pada peningkatan aktivitas enzim POD, PPO, TAL, dan kandungan total fenol. Korelasi aktifitas biokimia tersebut dengan pertahanan tanaman jagung terhadap bulai ditunjukkan oleh kandungan total fenol yang dihasilkan sebelum adanya infeksi bulai ($R = -0.78$) dan 48 jam setelah inokulasi yang sangat mempengaruhi tingkat keparahan penyakit bulai ($R = -0.71$). Selain itu, aktifitas enzim PPO pada 24 jam setelah adanya infeksi patogen mempengaruhi perpanjangan masa inkubasi penyakit bulai ($R = 0.56^*$).

Keywords: *Peronosclerospora* spp., peroksidase, polifenol oksidase, total fenol, tirosin amonia-lyase

2.2 Pendahuluan

Produksi jagung di Asia terus meningkat beberapa tahun terakhir. Upaya swasembada jagung dalam rangka pemenuhan kebutuhan jagung sebagai bahan pangan, pakan, maupun industri telah dilakukan baik melalui intensifikasi maupun ekstensifikasi. Di Indonesia, kebutuhan jagung diperkirakan dapat terus meningkat seiring dengan bertambahnya jumlah penduduk dan berkembangnya industri pangan dan pakan. Hal ini mengakibatkan kebutuhan jagung di dalam negeri terus meningkat dari tahun ke tahun, sehingga pemenuhan kebutuhan jagung harus terus dilakukan melalui berbagai kegiatan inovasi produksi benih jagung. Salah satu faktor pembatas dalam peningkatan produksi jagung yaitu infeksi patogen pada pra panen. Beberapa penyakit utama yang dilaporkan menjadi faktor pembatas produksi benih jagung yaitu bulai *Peronosclerospora neglecta* (Muis et al., 2023), bercak daun *Curvularia* sp,

busuk batang bakteri *Dyckea zae* (Suriani et al., 2023), serta hawar daun dan pelepah *Rhizoctonia solani*. Diantara penyakit tersebut, penyakit bulai merupakan salah satu faktor terpenting yang membatasi produksi jagung khususnya di Asia Selatan dan Asia Tenggara (Sharma et al., 1993). Penyakit bulai disebabkan oleh patogen *Peronosclerospora* spp. yang tergolong dalam kelas oomycetes (Telle et al., 2011). Patogen ini menyebabkan kerugian besar pada tanaman seperti jagung, millet, sorgum, dan tebu di banyak bagian dunia, terutama yang beriklim tropis (Crouch et al., 2022). Gejala penyakit bulai antara lain bercak klorosis pada daun, daun melengkung, dan tanaman kerdil, yang dapat mengakibatkan gagal panen total (Muis et al., 2023).

Sampai saat ini, upaya pengendalian patogen bulai masih menitikberatkan pada rotasi tanaman, solarisasi tanah, dan penggunaan fungisida sintetik. Upaya pengendalian penyakit bulai pada dasarnya melalui pengendalian perkembangan patogen, memanfaatkan inang, dan lingkungan untuk memperkecil akibat yang ditimbulkan patogen sehingga mencapai suatu titik di bawah ambang ekonomi dengan kerugian yang dapat diabaikan. Salah satu teknik pengendalian penyakit bulai yang efektif, aman, dan ramah lingkungan yaitu penggunaan agens hayati. Kemajuan pengetahuan biokimia dan molekuler tentang patogen, tanaman, dan interaksinya memungkinkan pendekatan alternatif dalam penemuan agen biokontrol (Dar et al., 2019). Dalam konteks ini, *Trichoderma* merupakan salah satu agen pengendali hayati (APH) yang efektif, ramah lingkungan serta mewakili cara yang paling kompeten untuk mempertahankan sistem produksi pertanian yang ada saat ini. *Trichoderma* banyak ditemukan di akar tanaman dan tanah dan telah digunakan sebagai biokontrol pada berbagai patogen tanaman (Intana et al., 2023).

Isolat *T. asperellum* AC.3 merupakan salah satu isolat unggul hasil penelitian sebelumnya yang memiliki potensi tinggi dalam menekan penyakit bulai pada rumah kaca dengan menginduksi peningkatan konsentrasi total kandungan fenolik dan asam salisilat (Djaenuddin et al. 2024). Meskipun interaksi *Trichoderma* terhadap bulai dalam tanaman belum sepenuhnya dikaji, serta terbatasnya penelitian mengenai penyakit tanaman yang disebabkan oleh cendawan kelompok oomycetes, namun beberapa percobaan membuktikan bahwa produksi antibiotik *Trichoderma* memainkan peran penting dalam pengendalian biologis. Nandini et al. (2021) melaporkan mekanisme baru, di mana metabolit sekunder anti-mildew yang dihasilkan oleh *Trichoderma* di rizosfer diserap oleh tanaman, didistribusikan di bagian tanaman dan terlibat dalam penekanan infeksi *Sclerospora graminicola* melalui penghambatan patogen secara langsung. Qi et al. (2023) mengungkapkan bahwa mikrokapsul *T. asperellum* memiliki efisiensi sebagai biokontrol hingga 76% terhadap penyakit embun tepung tanaman mentimun. Selain itu, Nandini et al. (2017) melaporkan bahwa nanopartikel *Trichoderma* mampu menekan pertumbuhan, sporulasi, dan viabilitas zoospora *S. graminicola* dan aktivitas biologisnya pada tanaman millet. Perlakuan *Trichoderma* spp. sebagai fungisida dan penginduksi ketahanan tanaman efektif terhadap masa inkubasi dan menekan kejadian penyakit

secara signifikan pada jagung selama tahap awal (Prasetyo et al., 2019). Lebih lanjut perlakuan benih bunga matahari dengan isolat *T. harzianum* (TRIC8) menurunkan tingkat keparahan penyakit bulai (Özer et al., 2023).

Dalam beberapa tahun terakhir, induksi resistensi sistemik telah dipelajari sebagai indikator baru untuk mengendalikan penyakit tanaman di lapangan, dan sejumlah mikroorganisme telah diteliti dalam berbagai sistem patogen tanaman (Yi et al., 2013). Biosintesis enzim peroksidase (POD), polifenol oksidase (PPO) dan katalase (CAT) memainkan peran penting dalam menentukan tingkat ketahanan inang terhadap patogen dengan mikroba menguntungkan. Selain itu, aktivitas enzim POD, PPO, CAT serta kandungan prolin meningkat secara signifikan pada daun yang terinfeksi bulai dibandingkan dengan tetua yang resisten atau rentan (Ashry & Mohamed, 2012). Sejalan dengan hal itu, menurut Satrah et al. (2020) peningkatan aktivitas POD memiliki hubungan yang erat dengan laju perkembangan penyakit tanaman. Seleim (2014) melaporkan aktivitas POD dan PPO dapat digunakan sebagai penanda biokimiawi untuk mengidentifikasi efikasi agen biokontrol dalam pengendalian penyakit tanaman pada tomat. Sejalan dengan itu, menurut Nunes da Silva et al. (2021) elisitasi dengan metil jasmonat atau asam salisilat umumnya menurunkan polifenol dan konsentrasi lignin minimal 20% dan meningkatkan protein total hingga 50%.

Beberapa penelitian terkait potensi *Trichoderma* dalam menginduksi ketahanan tanaman telah banyak dilaporkan. Surekha et al. (2014) melaporkan peran *T. viride* sebagai agen biokontrol dalam memunculkan serangkaian respon pertahanan seperti akumulasi fenol, induksi enzim (POD, PPO, dan Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL)) yang terlibat dalam jalur fenilpropanoid dan akumulasi lignin terhadap patogen cendawan. Isolat *T. asperellum* mengaktifkan produksi β -1,3 glukanase, PPO, POD, dan PAL pada tomat yang terinfeksi penyakit layu (Konappa et al., 2018). Selain itu, senyawa fenol total dan aktivitas POD dan PPO meningkat karena aplikasi *T. harzianum* (Sabbagh et al., 2017). Kombinasi *T. asperellum*, *Streptomyces rochei*, dan asam shikimat menginduksi respon pertahanan tanaman, dengan memicu aktivitas enzim seperti POD, superoksida dismutase (SOD), dan CAT, akumulasi senyawa fenol, dan peningkatan asam salisilat (SA) dan kandungan asam jasmonat (JA) (Reyad et al., 2022). Filtrat cendawan saprofit dapat bertindak sebagai agen elisitor yang dikenali oleh reseptor yang ada pada tanaman tomat dengan mengaktifkan enzim pertahanannya dengan peningkatan Guaiacol peroksidase (GPOX), CAT dan PAL (Antônio et al., 2016).

Penelitian ini difokuskan pada pengendalian penyakit bulai melalui teknik induksi ketahanan tanaman menggunakan agens hayati *T. asperellum*. Dalam penelitian ini dikaji efek agens hayati tersebut untuk mengendalikan penyakit bulai jagung di bawah kondisi rumah kawat dan efeknya dalam menginduksi aktivitas biokimia pada tanaman yaitu kandungan total fenol, aktifitas enzim POD, PPO, dan Tyrosine Ammonia-Lyase (TAL). Tujuan penelitian adalah mengidentifikasi potensi *T. asperellum* AC.3 sebagai agen biokontrol penyakit bulai dan penginduksi ketahanan tanaman jagung melalui peningkatan aktifitas enzim.

2.3 Metode Penelitian

2.3.1 Penyiapan Tanaman Inang dan Patogen Uji

Benih jagung yang digunakan dalam pengujian ini adalah varietas Pulut Uri dan JH37 masing-masing tergolong sangat rentan dan agak tahan terhadap penyakit bulai. Benih tersebut diperoleh dari Unit Pengelola Benih Sumber (UPBS) Balai Perakitan dan Pengujian Tanaman Serealia (BrMP Serealia) Kementerian Pertanian, Indonesia. Benih terlebih dahulu disterilisasi permukaan menggunakan natrium hipoklorit 0,1% lalu dibilas menggunakan air steril sebanyak 2 kali.

Benih jagung varietas Pulut Uri ditanam di rumah kawat BrMP Serealia (S 4°59', E 119°34', ketinggian 847 m) sebagai sumber inokulum *P. maydis*. Selanjutnya, daun yang terinfeksi dikumpulkan untuk inokulasi, dan kondisi lingkungan selama penelitian ini disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 2. 1 Kondisi lingkungan selama musim tanam (BMKG 2023)

Kondisi iklim	Maret	April	Mei	Juni	Juli
Suhu rata-rata (°C)	26.7	27.1	27.8	27.7	27.1
Kelembaban rata-rata (%)	82.3	82.5	77.7	82.3	83.2
Lama penyinaran (jam)	5.7	5.6	6.9	5.9	8.6
Kecepatan angin (m/s)	1.6	1.5	1.3	1.6	1.8

2.3.2 Penyiapan Stok Kultur Filtrat dan Suspensi *T. asperellum* AC.3

T. asperellum AC.3 yang digunakan dalam penelitian ini diperbanyak dari koleksi kultur Indonesian Cereals Research Institute, Ministry of Agriculture. Isolat ini awalnya diisolasi dari sampel akar tanaman jagung dan secara rutin disubkultur pada media agar dekstrosa kentang (PDA) (100 g ekstrak kentang segar, 20 g dekstrosa, 15 g agar dalam 1000 ml air suling), dan untuk penyimpanan jangka panjang, konidia cendawan disubkultur disimpan dalam media agar miring dalam tabung reaksi.

Kultur filtrat dibuat dengan cara membiakkan *T. asperellum* AC.3 pada media PDA dalam Petri dan diinkubasi selama 12 hari pada suhu 28 ± 2 °C. Setelah diinkubasi potongan miselia diambil sebesar ϕ 6 mm dengan menggunakan pelubang gabus dan diinokulasi ke 1 L *Potato Dextrose Broth* (PDB) (40 g ekstrak kentang segar, 4 g dekstrosa dalam 1000 ml air suling) yang dibagi ke dalam 3 buah eflask 1 L. E-flask diinkubasi pada suhu 28 ± 2 °C dalam fase diam selama 21 hari dan sesekali dishake selama 1 menit dengan kecepatan 100 rpm. Setelah inkubasi, kultur disaring melalui tiga tahap penyaringan yaitu sentrifugasi, penyaringan vakum dengan kertas saring, dan penyaringan dengan syringe filter. Kultur terlebih dahulu disentrifuse pada kecepatan 6000 rpm selama 5 menit untuk menghilangkan gumpalan miselia cendawan dengan supernatant. Supernatan selanjutnya disaring menggunakan kertas saring Whatmann no. 42 untuk menghilangkan sisa-sisa miselia kecil, dan penyaringan terakhir menggunakan syringe filter 0,45 μ m untuk

memperoleh filtrat akhir. Sebelum digunakan, filtrat yang diperoleh diberi perlakuan pemanasan pada penangas air suhu 60 °C selama 30 menit, selanjutnya kultur filtrat siap digunakan sebagai perlakuan.

Suspensi dibuat dengan mengkulturkan kembali isolat *T. asperellum* dari kultur murninya pada media PDA yang baru dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 28 °C di inkubator. Biakan dipanen menggunakan akuades steril lalu dihitung kerapatan konidianya hingga 10⁶ cfu/mL. Sebelum aplikasi, 2% tween 80 ditambahkan ke suspensi sebagai surfaktan non-ionik.

2.3.3 Pengujian Penyakit Bulai pada Kondisi Rumah Kawat

Perlakuan disusun dalam rancangan acak kelompok lengkap faktorial terdiri dari faktor varietas: JH 37 (varietas toleran bulai) dan Pulut Uri (varietas sangat rentan bulai); faktor metode aplikasi: sebelum penanaman pada media tumbuh, perlakuan benih, dan aplikasi pada daun; dan faktor *T. asperellum* AC.3: kultur filtrat, suspensi, dan air steril/kontrol (tanpa *T. asperellum* AC.3). Untuk setiap kombinasi perlakuan digunakan 2 tray (setiap tray berisi 32 tanaman) yang direplikasi tiga kali.

Benih jagung disiapkan dengan perendaman benih pada 3 perlakuan yakni kultur filtrat, suspensi *Trichoderma*, dan air steril (kontrol) selama 1 jam yang diinkubasi pada pengocok putar suhu 28 ± 2 °C dengan kecepatan 150 rpm. Sebelum tanam, campuran media tanam steril (tanah: pasir: pupuk kandang, 2:1:1) diberi perlakuan starter yang dibuat dengan menumbuhkan *Trichoderma* pada media jagung yang diinkubasi selama 14 hari kemudian diaplikasikan sebanyak 5 g/lubang tanam kecuali perlakuan kontrol. Setelah masa inkubasi selama 5 hari, benih yang telah diberi perlakuan ditanam dalam tray (diameter 10 cm). Pada umur 7 hari setelah tanam (hst) tanaman jagung masing-masing diberi perlakuan lagi dengan cara penyiraman menggunakan kultur filtrat, suspensi, dan air steril untuk kontrol.

Setelah aplikasi perlakuan, tanaman jagung berumur 10 hst diinokulasi dengan 6 × 10⁴ oospora/ml *P. maydis* dengan metode inokulasi ulir, droplet oospora *P. maydis* diteteskan ke uliran daun yang dibentuk oleh tanaman yang sudah tumbuh dan dibiarkan mengalir ke dasar. Tanaman yang diinokulasi patogen ini dipelihara dalam kondisi rumah kawat (90–95% RH, suhu 20–25 °C), dan diamati perkembangan penyakitnya. Untuk mengevaluasi kinerja perlakuan terhadap penyakit bulai, tanaman diberi skor lalu dikonversi kerumus tingkat keparahan penyakit berdasarkan skala visual yang berkisar antara 0 hingga 4 (Shekhar & Kumar, 2012) (0 = tidak ada infeksi, 1 = infeksi ringan, beberapa bercak klorosis menyebar sedikit hingga sedang pada bagian pangkal daun, 2 = infeksi sedang, banyak garis klorosis pada bagian pangkal daun dan sedikit pada bagian tengah daun, 3 = infeksi berat, banyak garis-garis klorosis pada bagian pangkal daun dan tengah daun meluas ke bagian ujung daun, 4 = infeksi sangat parah, banyak garis-garis klorosis pada semua bagian daun, tidak ada pembentukan tongkol dan tanaman dapat mati sebelum waktunya). Skoring penyakit dilakukan pada 14, 21, sampai umur 28 Hari Setelah Inokulasi (HSI).

Masa inkubasi penyakit diamati ketika tanaman sudah mulai menunjukkan gejala awal penyakit bulai yang khas seperti sporulasi pada permukaan daun abaksial dan klorosis. Selanjutnya indeks keparahan dan penekanan penyakit dihitung menurut rumus (Pandey et al. 1989) di bawah ini:

$$\text{Indeks penyakit} = \frac{\sum(n \times v)}{N \times Z} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{Penekanan penyakit} = \frac{I_0 - I_t}{I_0} \times 100\% \quad (2)$$

Keterangan:

n = jumlah tanaman terinfeksi bulai; v = nilai skala infeksi; N = jumlah tanaman yang diamati; Z = nilai skala infeksi tertinggi; I_0 = indeks penyakit pada kontrol; I_t = indeks penyakit perlakuan

2.3.4 Evaluasi Aktivitas Enzim yang Terkait dengan Pertahanan

Pengambilan sampel. Sampel akar/daun dikumpulkan dari setiap perlakuan untuk mempelajari induksi enzim pertahanan dalam merespon perlakuan agen biokontrol terhadap penyakit bulai pada kondisi rumah kawat. Pengambilan sampel dilakukan sebelum inokulasi (0 jam) dan setelah inokulasi bulai (4, 12, 24, 48 dan 96 jam) dengan 3 kali ulangan.

Kandungan total fenol. Analisis kandungan total fenol diukur menggunakan metode folin-ciocalteu dengan standar asam galad dibuat dengan konsentrasi 100 ppm yang absorbansinya diukur pada panjang gelombang 765 nm (Pourmorad et al., 2006). Pengukuran sampel dilakukan dengan cara menimbang akar tanaman jagung sebanyak 0,2 g kemudian ditambahkan 2 ml etanol 80%. Sampel yang sudah ditambah etanol diambil sebanyak 0,1 ml kemudian ditambah akuades steril 1,2 ml kemudian dihomogenkan. Setelah itu ditambah dengan 0,1 ml reagen Folin-Ciocalteu. Setelah didiamkan selama 5 menit dilakukan penambahan 0,4 ml Na_2CO_3 20% dan diinkubasikan 30 menit. Sampel yang telah melalui proses inkubasi siap dianalisis kandungan total fenolnya.

Evaluasi aktifitas enzim POD. Aktivitas POD diukur berdasarkan metode pengukuran absorbansi langsung menggunakan spektrofotometer. Daun ditimbang sebanyak 1 g kemudian dihancurkan dengan mortar dalam buffer fosfat 0,01M, pH 6 (1:4 w/v). Ekstrak daun disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 30 menit pada suhu 4 °C selanjutnya disaring menggunakan kertas saring Whatman. Supernatan yang diperoleh digunakan sebagai sediaan enzim.

Dalam 3 mL campuran reaksi, komposisi akhir pengujian terdiri 0,32 mL buffer fosfat, 0,26 mL larutan peroksidase (0,5% H_2O_2), 0,32 mL larutan pirogalol 5%, 0,1 mL sediaan enzim, dan 2 mL air murni. Untuk kontrol, buffer fosfat digunakan sebanyak 0,42 mL dan 2,1 mL air murni, dengan volume larutan peroksidase dan pirogalol tetap. Suspensi larutan dihomogenkan selama 5-10 detik dan nilai absorbansinya dihitung pada panjang gelombang 430 nm dengan interval waktu

setiap 30 detik selama 150 detik. Aktivitas POD dihitung berdasarkan koefisien kepunahan molar $12 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ untuk pirogalol dan dinyatakan dalam $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ protein. Nilai penyerapan pada 430 nm dapat dikonversi menjadi konsentrasi aktual menggunakan hukum Beer-Lambert (Mitsch & White, 2020) dengan modifikasi pada panjang gelombang dan bahan penyerap seperti di bawah ini;

Penentuan konsentrasi (C) bahan penyerap (pirogalol, dalam penelitian ini) dihitung menggunakan rumus:

$$\frac{S}{\epsilon (l)} \times 1000 = \mu\text{M}/\text{min} \quad (3)$$

Sedangkan, total produk pirogalol yang terbentuk dalam reaksi oleh enzim dalam satu menit dihitung dengan rumus:

$$C \times 3 = \text{nmoles}/\text{min} \quad (4)$$

Sehingga penentuan aktifitas peroksidase dihitung dengan persamaan:

$$\frac{C \times 3}{\text{konsentrasi enzim} \times 0,1} = \text{nmoles}/\text{min}/\text{mg protein} \quad (5)$$

Ket:

S = absorbansi yang diukur pada 420 nm dikonversi ke slop

ϵ = koefisien kepunahan 1 mg/ml Purpurogallin pada 420 nm 19ontro $12 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
(lembar data Sigma)

l = 19ontrol jalur 19ontro (1.0 cm untuk 19ontrol19hotometer Safas®)

1000 = perubahan satuan dari mM ke μM

3 = volume pengujian (dalam mL)

0,1 = volume enzim yang digunakan (dalam mL)

Evaluasi aktifitas enzim PPO. Sampel akar 0,25 g dihancurkan dengan mortar dalam 6 mL buffer natrium fosfat dingin (0.2 M, pH 6.0). Ekstrak tersebut di sentrifugasi pada 3000 rpm selama 20 menit suhu 6°C .

Analisis PPO dilakukan menurut Simões et al. (2015), dengan menambahkan volume ekstrak enzim sebanyak 10 μL supernatant ke media reaksi yang mengandung 1490 μL buffer fosfat 0,2 M (pH 6,0) dan 1500 μL katekol 0,2 M. Pembacaan diambil menggunakan spektrofotometer pada 425 nm selama 2 menit dengan interval 30 detik antara pembacaan. Aktivitas PPO dihitung berdasarkan koefisien kepunahan molar $3400 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ untuk katekol dan dinyatakan dalam $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ protein. Untuk 19ontrol, katekol diganti dengan buffer fosfat (Almeida et al., 2019).

Penentuan konsentrasi © bahan penyerap (pirogalol, dalam penelitian ini) dihitung menggunakan rumus:

$$\frac{S}{\epsilon (l)} \times 1000 = \mu\text{M}/\text{min} \quad (6)$$

Sedangkan, total produk pirogalol yang terbentuk dalam reaksi oleh enzim dalam satu menit dihitung dengan rumus:

$$C \times 4.49 = \text{nmoles}/\text{min} \quad (7)$$

Sehingga, penentuan aktifitas polifenol oksidase dihitung menggunakan persamaan:

$$\frac{C \times 3}{\text{konsentrasi enzim} \times 0,01} = \text{nmoles}/\text{min}/\text{mg protein} \quad (8)$$

Ket:

S = absorbansi yang diukur pada 425 nm dikonversi ke slop

ϵ = koefisien kepunahan 1 mg/ml Purpurogallin pada 425 nm adalah $3400 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (lembar data Sigma)

l = panjang jalur cahaya (1.0 cm untuk spektrofotometer Labtron®)

1000 = perubahan satuan dari mM ke μM

4.49 = volume pengujian (dalam mL)

0,01 = volume enzim yang digunakan (dalam mL)

Evaluasi aktifitas enzim TAL. Penyiapan ekstrak enzim untuk penentuan aktivitas enzim TAL dilakukan menggunakan metode dari Dogbo et al., (2012). Ekstraksi enzim dilakukan dengan melarutkan 0,5 g daun yang sudah dihaluskan dengan 5 mL buffer sodium borat 0,1 M, dilanjutkan sonikasi 10 menit lalu disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm, suhu 4 °C selama 10 menit.

Uji aktifitas TAL dilakukan dengan mereaksikan 300 μL ekstrak enzim + 2,5 mL L-tyrosine 30 μM + akuades sampai volume totalnya menjadi 3 mL. Larutan diinkubasi 30 °C, selama 60 menit lalu absorbansi dibaca pada λ 333 nm. Nilai absorbansi yang terbaca pada sampel dibandingkan dengan kurva standar yang dibuat menggunakan coumaric acid dengan konsentrasi bertingkat mulai dari 0,1 mmol/mL sampai 1 mmol/mL. Aktivitas enzim TAL dinyatakan dalam mmol coumaric acid yang diproduksi oleh tanaman per menit per gram berat basah tanaman.

2.3.5 Analisis Statistik

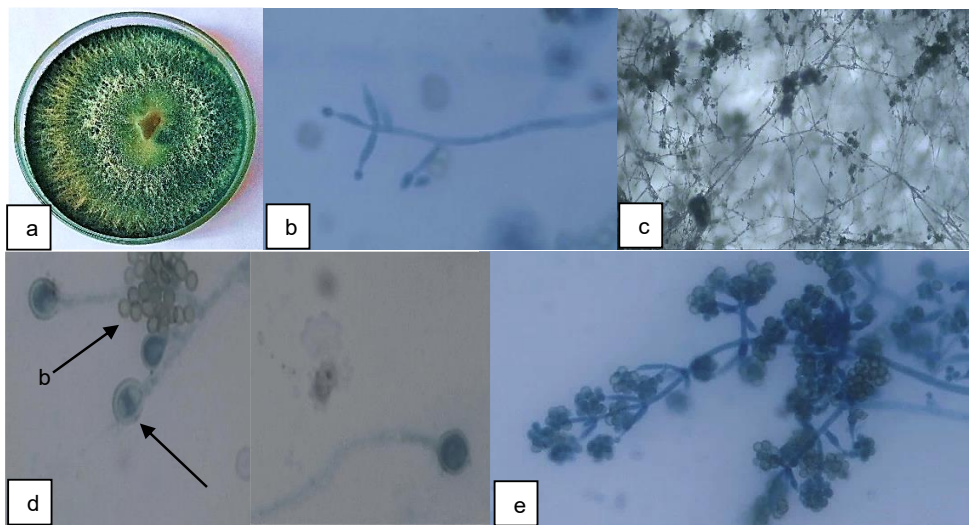
Analisis varian dari data-data hasil uji in planta dan aktivitas enzim dihitung menggunakan software Microsoft Excel. Data yang diberikan adalah rata-rata dari tiga kali ulangan, dan rata-rata tersebut dibandingkan menggunakan uji Duncan pada p 0,05. Data korelasi dianalisis menggunakan software R-studio versi 3.5.3.

2.4 Hasil dan Pembahasan

2.4.1 Intensitas Penyakit Bulai pada Tanaman Jagung

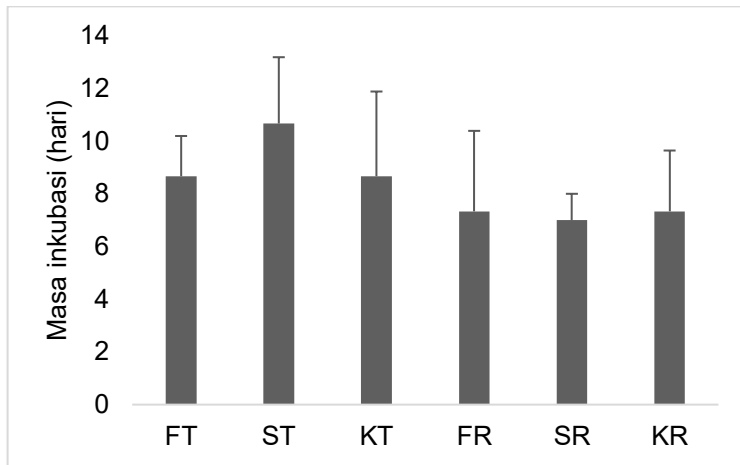
Karakter morfologi *Trichoderma asperellum* AC.3. Karakter morfologi dari cendawan *Trichoderma* dipengaruhi oleh kondisi lingkungan sehingga kurang baik untuk digunakan dalam pengenalan spesies. Namun, strain yang digunakan pada penelitian ini telah diidentifikasi secara molekuler dan memiliki tingkat kemiripan 99,83% dengan *Trichoderma asperellum* sehingga dinamai *T. asperellum* AC.3. Isolat *T. asperellum* AC.3 ini diisolasi dari akar tanaman jagung di Bone, Sulawesi Selatan. Adapun warna koloni, struktur konidia dan konidiofor dari *T. asperellum* AC.3 disajikan pada Gambar 2.1

Koloni *Trichoderma* pada media sintetik tumbuh dengan cepat, dengan permukaan halus, warna bening, kemudian menjadi berkelompok dan berwarna keputihan lalu berubah menjadi hijau seiring bertambahnya umur biakan. Ukuran konidia diameternya kurang dari 15 μm . Konidia dapat membentuk rantai pendek atau kepala konidia dapat menyatu satu sama lain. Percabangan konidiofor sangat banyak sehingga percabangan yang muncul awal selanjutnya dapat menghasilkan cabang sekunder dan tersier. Percabangan bisa tunggal atau sering sampai tiga. Spesies *Trichoderma* dapat diidentifikasi berdasarkan karakter morfologi khas termasuk pertumbuhan yang cepat, pigmentasi konidia, dan pola percabangan konidiofor (Jain & Das, 2020).



Gambar 2. 1 Karakteristik morfologi koloni pada media PDA 7 hsi (a) dan mikroskopis konidia (b & c), klamidospora (d) dan konidiofor (e) *T. asperellum* AC.3

Masa inkubasi bulai. Terdapat pengaruh perlakuan *T. asperellum* AC.3 terhadap masa inkubasi patogen ditunjukkan oleh perlakuan suspensi pada varietas JH 37 yang secara statistik berbeda nyata dengan perlakuan varietas Pulut Uri (Gambar 2.2).



Gambar 2.2 Masa inkubasi dari infeksi *P. maydis* setelah aplikasi *T. asperellum* AC.3

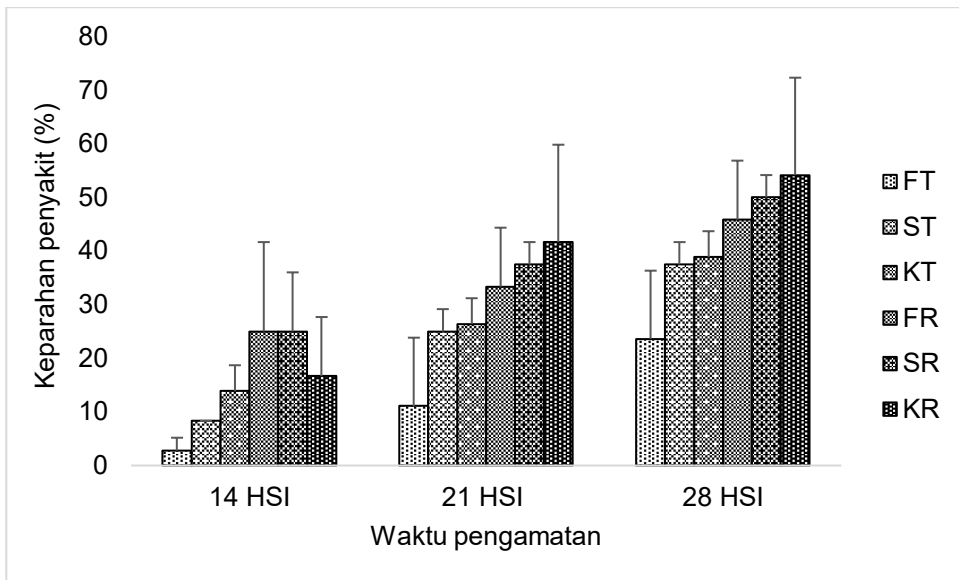
Ket: FT= filtrat varietas JH 37, ST= suspensi varietas JH 37, KT= kontrol varietas JH 37, FR= filtrat varietas Pulut Uri, SR= suspensi varietas Pulut Uri, KR= kontrol varietas Pulut Uri

Keparahan dan penekanan penyakit bulai. Pengamatan tingkat keparahan penyakit diperkirakan berdasarkan kerusakan daun menurut skala yang ditunjukkan pada Gambar 2.3 untuk tanaman berumur 14, 21, dan 28 HSI. Meskipun tanaman yang terinfeksi *P. maydis* umumnya menunjukkan gejala paling parah setelah 2 minggu, namun tanaman yang diberi perlakuan *T. asperellum* AC.3 dan terinfeksi *P. maydis* rata-rata menunjukkan tingkat keparahan penyakit pada skala satu dalam kondisi perlakuan kontrol pada skala dua dan tiga. Hasil ini mendukung peran *T. asperellum* sebagai agen biokontrol yang berhasil melawan penyakit bulai *Peronosclerospora* spp.



Gambar 2.3 Tingkat keparahan penyakit bulai *P. maydis* berdasarkan skala infeksi, skala 0 (a), skala 1 (b), skala 2 (c), skala 3 (d), dan skala 4 (e)

Hasil penelitian menunjukkan pengaruh perlakuan *T. asperellum* AC.3 terhadap tingkat keparahan penyakit bulai bervariasi untuk setiap varietas (Gambar 2.4). Pengamatan pada umur 14 HSI semua perlakuan pada varietas JH 37 diamati telah terinfeksi bulai dengan perlakuan kultur filtrat menunjukkan keparahan penyakit berbeda nyata lebih rendah dari kontrol namun berbeda tidak nyata dengan perlakuan suspensi. Infeksi bulai diamati semakin meningkat dengan keparahan penyakit pada perlakuan filtrat sebesar 11,1 % berbeda nyata lebih rendah dibanding perlakuan lainnya pada 21 HSI. Perlakuan kultur filtrat relatif konsisten memperlihatkan tingkat keparahan penyakit nyata lebih rendah sebesar 23,6 % sampai pengamatan terakhir umur 28 HSI. Pengamatan keparahan penyakit pada varietas Pulut Uri, diamati pada perlakuan kultur filtrat maupun suspensi *T. asperellum* AC.3 umur 14, 21, dan 28 HSI lebih rendah dari kontrol namun demikian secara statistik nilai tersebut menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan. Hal ini mengindikasikan bahwa tidak ada perlakuan yang dominan dalam menekan tingkat keparahan penyakit untuk varietas tersebut.

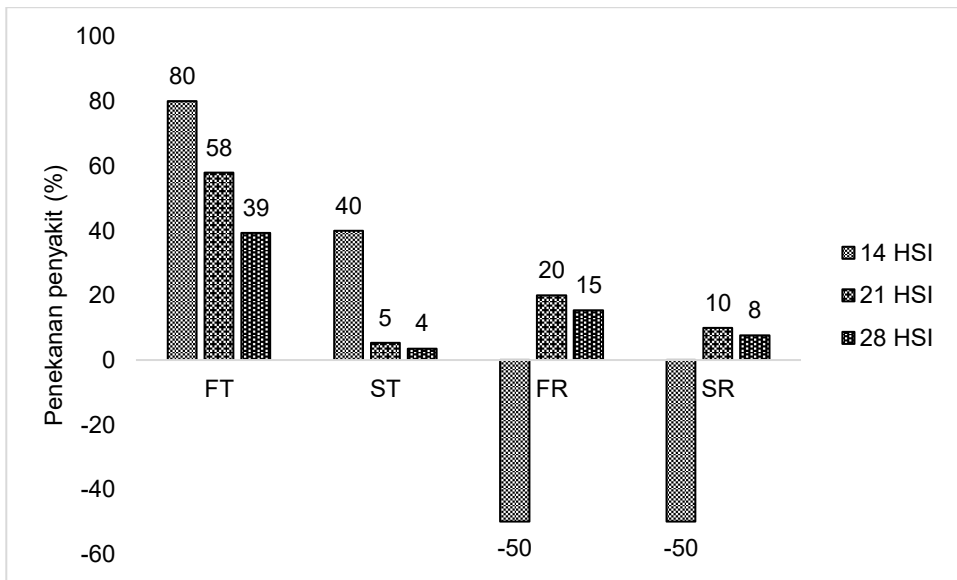


Gambar 2.4 Keparahan penyakit bulai pada perlakuan yang diinokulasi *P. maydis* dalam tiga waktu pengamatan

Ket: FT= filtrat varietas JH 37, ST= suspensi varietas JH 37, KT= kontrol varietas JH 37, FR= filtrat varietas Pulut Uri, SR= suspensi varietas Pulut Uri, KR= kontrol varietas Pulut Uri

Penelitian ini juga mengkaji peran *T. asperellum* AC.3 dalam menekan patogen bulai pada tanaman jagung (Gambar 2.5). Perlakuan kultur filtrat dan suspensi *T. asperellum* AC.3 cenderung mampu mengurangi perkembangan gejala penyakit setelah infeksi *P. maydis* pada varietas JH37 maupun Pulut Uri. Pada pengamatan 14 HSI diamati perlakuan filtrat dan suspensi *T. asperellum* AC.3 pada varietas JH 37 mampu memberikan penekanan terhadap infeksi bulai sementara varietas Pulut Uri belum menunjukkan adanya penekanan penyakit. Penekanan penyakit bulai mulai ditunjukkan oleh varietas Pulut Uri pada 21 HSI dan diamati lebih tinggi dari perlakuan suspensi pada varietas JH 37. Namun respon ketahanan terhadap penyakit bulai yang diamati pada 28 HSI untuk semua perlakuan menunjukkan penurunan penekanan infeksi dengan penekanan infeksi tertinggi pada perlakuan kultur filtrat varietas JH 37 menyusul perlakuan filtrat varietas Pulut Uri.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan suspensi *T. asperellum* AC.3 pada varietas JH 37 menunjukkan efek memperpanjang masa inkubasi penyakit bulai. Lebih jauh, pengurangan keparahan dan penekanan penyakit bulai lebih efektif pada perlakuan kultur filtrat *T. asperellum* AC.3

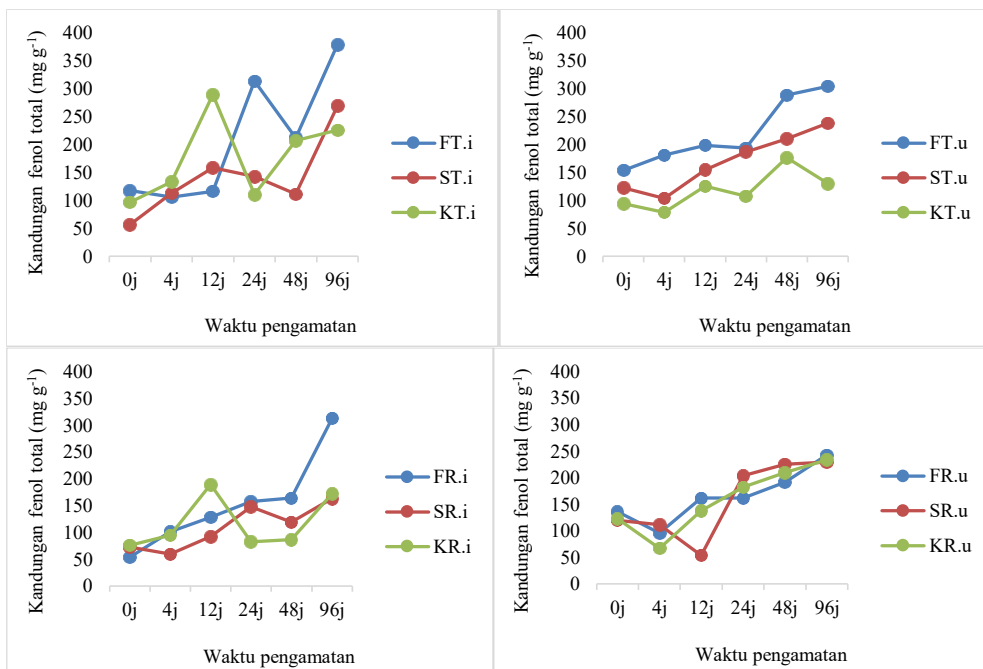


Gambar 2. 5 Tingkat penekanan penyakit bulai pada perlakuan yang diinokulasi *P. maydis* dalam tiga waktu pengamatan

Ket: FT= filtrat varietas JH 37, ST= suspensi varietas JH 37, FR= filtrat varietas Pulut Uri, SR= suspensi varietas Pulut Uri

2.4.2 Evaluasi aktifitas enzim yang terkait dengan pertahanan

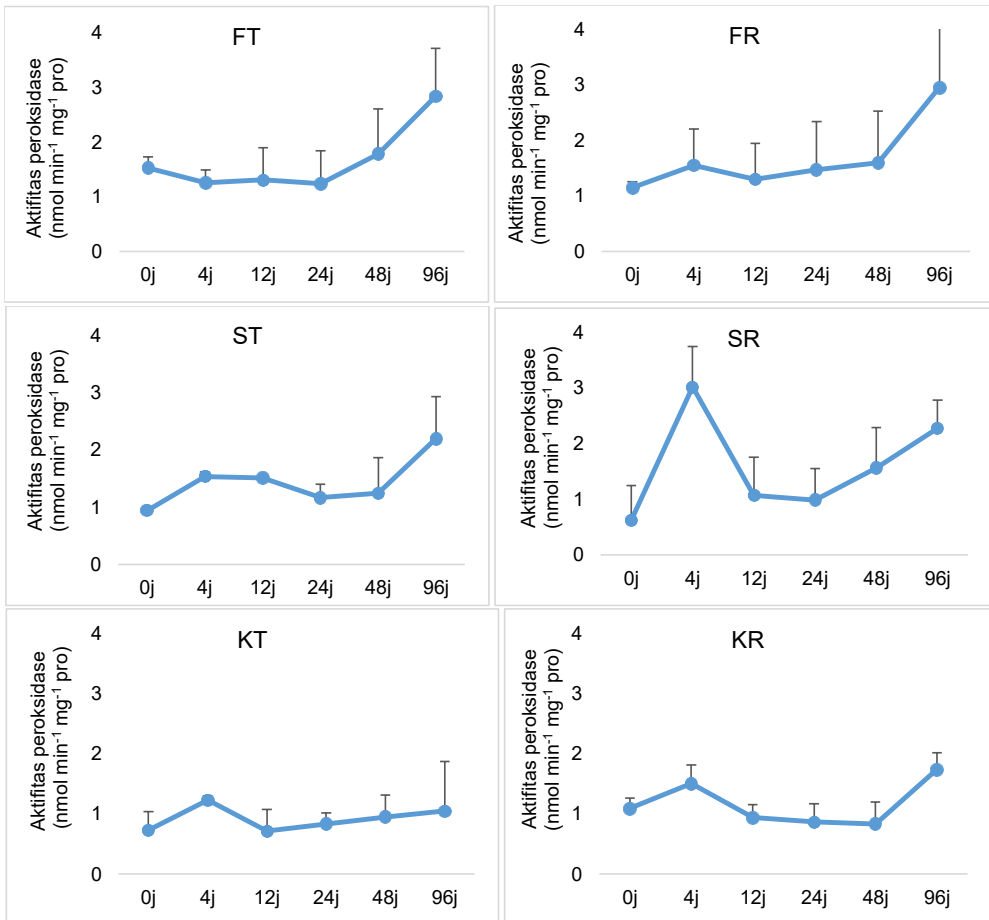
Kandungan fenol. Perlakuan perendaman benih menggunakan filtrat maupun suspensi *T. asperellum* AC.3 terhadap kandungan total fenol tanaman jagung menunjukkan hasil yang bervariasi. Kandungan total fenol yang diukur dengan pereaksi *Folin Ciocalteu* dalam persamaan asam galat (persamaan kurva standar: $y = 0.004x - 0.0198$, $r^2 = 0.9892$). Hasil analisis menunjukkan bahwa total fenol bervariasi dari 53 hingga 379 mg g^{-1} dalam ekstrak. Sebelum inokulasi (0 jsi) semua perlakuan uji telah mengandung fenol. Pengamatan 4 jam setelah inokulasi (4 jsi) menunjukkan beberapa perlakuan cenderung mengalami penurunan kandungan fenol terutama perlakuan filtrat pada varietas JH 37 dan perlakuan suspensi pada varietas Pulut Uri yang diinokulasi. Selanjutnya pada pengamatan 12 jam setelah inokulasi (12 jsi) semua perlakuan mengalami peningkatan senyawa fenol kecuali perlakuan suspensi pada varietas Pulut Uri yang tidak diinokulasi. Pengamatan 48 jsi menunjukkan perlakuan tanaman yang diinokulasi yaitu perlakuan filtrat dan suspensi pada varietas JH 37, dan juga perlakuan suspensi pada varietas Pulut Uri teramati kembali mengalami penurunan. Pada pengamatan 96 jsi semua perlakuan uji relatif mengalami peningkatan akumulasi senyawa total fenol kecuali kontrol varietas Pulut Uri (tanpa inokulasi bulai) (Gambar 2.6).



Gambar 2. 6 Kandungan total fenol pada tanaman jagung sebelum (0 jsi) dan setelah (4, 12, 24, 48, dan 96 jsi) diinokulasi *P. maydis*

Ket: FT.i= filtrat varietas JH 37 diinokulasi, ST.i= suspensi varietas JH 37 diinokulasi, KT.i= kontrol varietas JH 37 diinokulasi, FR.i= filtrat varietas Pulut Uri diinokulasi, SR.i= suspensi varietas Pulut Uri diinokulasi, KR.i= kontrol varietas Pulut Uri diinokulasi, FT.u= filtrat varietas JH 37 tidak diinokulasi, ST.u= suspensi varietas JH 37 tidak diinokulasi, KT.u= kontrol varietas JH 37 tidak diinokulasi, FR.u= filtrat varietas Pulut Uri tidak diinokulasi, SR.u= suspensi varietas Pulut Uri tidak diinokulasi, KR.u= kontrol varietas Pulut Uri tidak diinokulasi

Aktifitas Peroksidase (POD). Rerata konsentrasi enzim POD tertinggi sebelum diinokulasi patogen bulai diamati pada perlakuan kultur filtrat varietas JH 37 yang secara statistik berbeda nyata dengan kontrol (Gambar 2.7). Aktifitas enzim POD pada perlakuan uji secara umum diamati mengalami peningkatan setelah diinokulasi patogen (4 jsi) kecuali perlakuan filtrat varietas JH 37 yang sedikit mengalami penurunan. Namun aktifitas enzim POD diamati rata-rata menurun pada pengamatan 12 jsi kecuali perlakuan filtrat varietas JH 37. Sementara pada pengamatan 24 jsi hanya perlakuan filtrat varietas Pulut Uri yang mengalami peningkatan enzim dengan konsentrasi enzim tertinggi dibanding perlakuan lainnya. Pengamatan 48 jsi semua perlakuan diamati menunjukkan kenaikan aktifitas enzim POD namun secara statistik berbeda tidak nyata antar perlakuan. Konsentrasi enzim POD tertinggi ditunjukkan oleh perlakuan kultur filtrat *T. asperellum* AC.3 pada varietas JH 37 dan Pulut Uri pengamatan 96 jsi, yang secara statistik perlakuan filtrat varietas JH 37

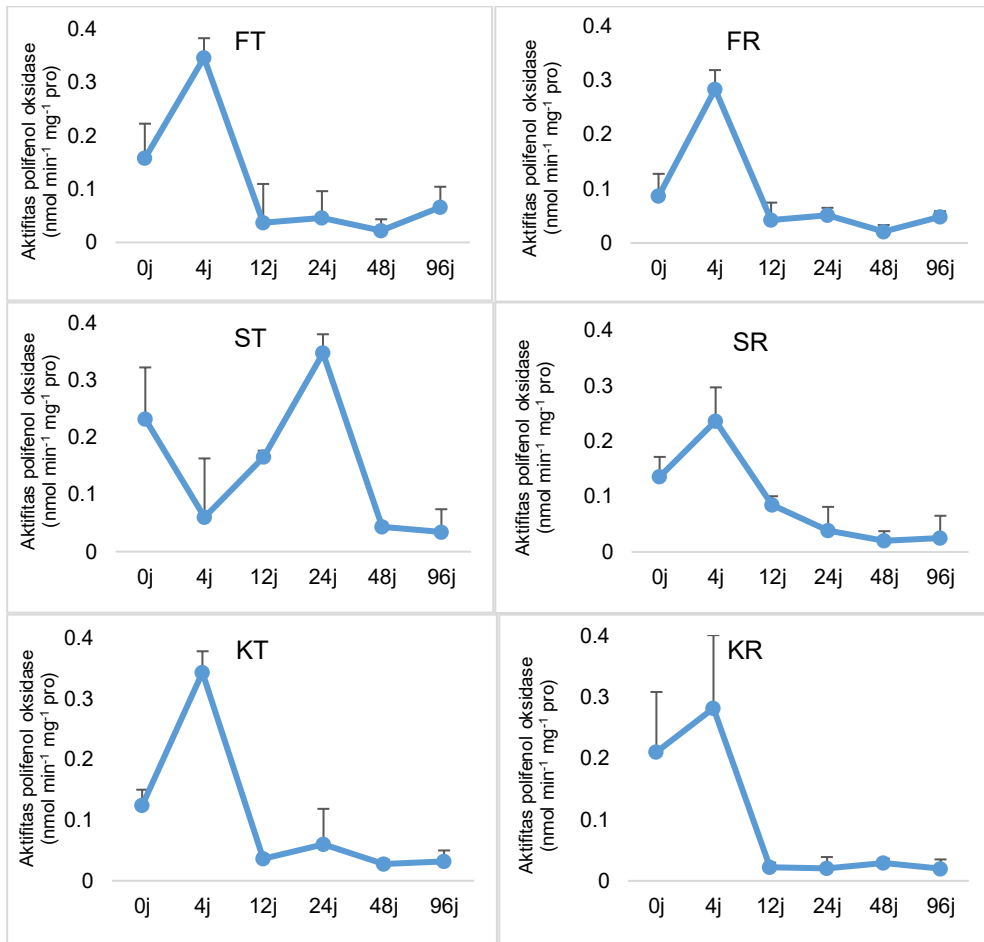


Gambar 2. 7 Aktifitas enzim peroksidase pada tanaman jagung sebelum (0 jsi) dan setelah (4, 12, 24, 48, dan 96 jsi) diinokulasi *P. maydis*

Ket: FT= filtrat varietas JH 37, ST= suspensi varietas JH 37, KT= kontrol varietas JH 37, FR= filtrat varietas Pulut Uri, SR= suspensi varietas Pulut Uri, KR= kontrol varietas Pulut Uri

Aktifitas Polifenol oksidase (PPO). Secara umum aktifitas enzim PPO dari perlakuan uji meningkat pada 4 jam setelah inokulasi patogen bulai, kecuali perlakuan suspensi *T. asperellum* AC.3 varietas JH 37 menunjukkan konsentrasi enzim PPO tertinggi sebelum perlakuan inokulasi pathogen bulai yang berbeda nyata dengan perlakuan kontrol namun konsentrasi PPOnya menurun pada 4 jsi (Gambar 2.8). Pengamatan pada 12 jsi menunjukkan rerata perlakuan uji mengalami penurunan konsentrasi enzim PPO, akan tetapi perlakuan suspensi pada varietas JH 37 maupun Pulut Uri diamati menunjukkan aktifitas enzim PPO nyata lebih tinggi daripada perlakuan kontrol. Berbeda halnya pada pengamatan 24 jsi beberapa perlakuan diamati mengalami peningkatan aktifitas enzim PPO dan perlakuan suspensi varietas JH 37 kembali menunjukkan aktifitas enzim tertinggi berbeda nyata

dari perlakuan kontrol. Pengamatan aktifitas enzim pada 48 jsi menurun pada semua perlakuan. Pengamatan 96 jsi memperlihatkan rerata aktifitas PPO sedikit meningkat namun perlakuan suspensi pada JH 37 dan kontrol varietas Pulut Uri semakin menurun.

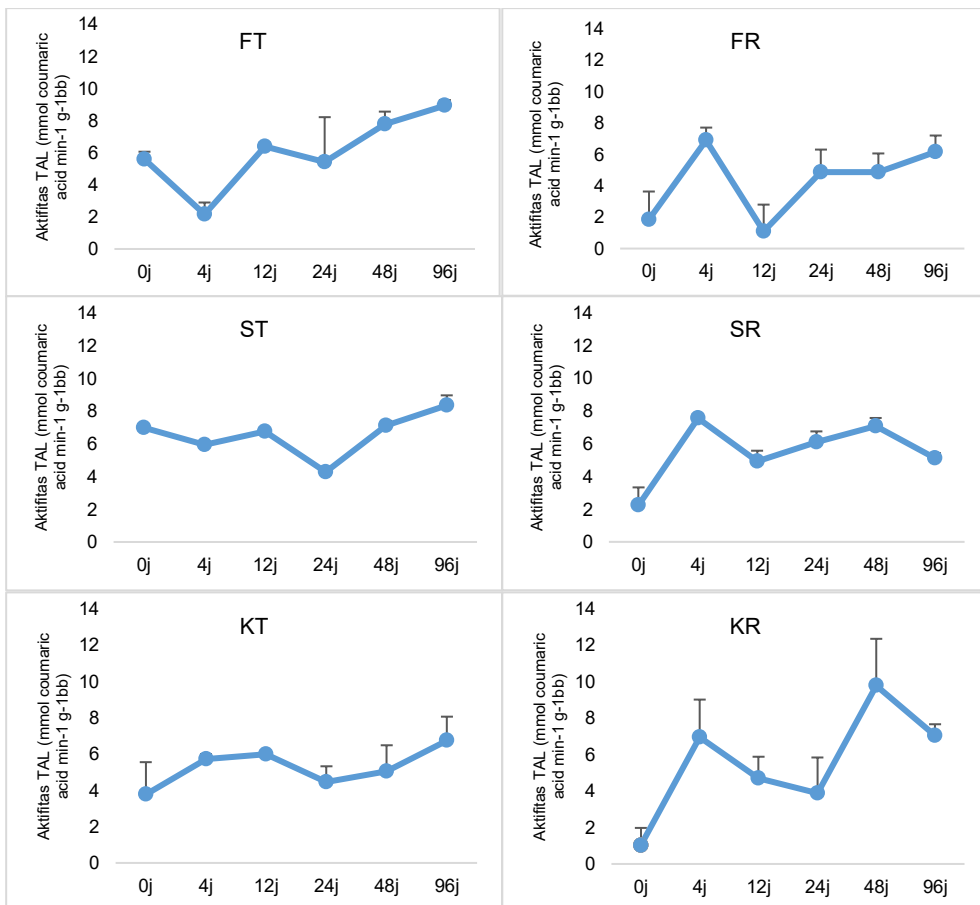


Gambar 2. 8 Aktifitas enzim polifenol oksidase pada tanaman jagung sebelum (0 jsi) dan setelah (4, 12, 24, 48, dan 96 jsi) diinokulasi *P. maydis*

Ket: FT= filtrat varietas JH 37, ST= suspensi varietas JH 37, KT= kontrol varietas JH 37, FR= filtrat varietas Pulut Uri, SR= suspensi varietas Pulut Uri, KR= kontrol varietas Pulut Uri

Aktifitas enzim Tirosin Ammonia-Lyase (TAL). Senyawa enzim TAL sudah ada pada tanaman sebelum inokulasi patogen bulai dengan jumlah terbesar pada perlakuan suspensi *T. asperellum* AC.3 varietas JH 37 yang diamati berbeda tidak nyata dengan perlakuan kultur filtrat varietas yang sama namun berbeda nyata dengan perlakuan lainnya (Gambar 2.9). Rerata aktifitas enzim TAL setelah

diinokulasi bulai mengalami peningkatan, kecuali perlakuan suspensi varietas JH 37 yang mengalami sedikit penurunan namun berbeda tidak nyata dengan perlakuan suspensi varietas Pulut Uri yang memiliki konsentrasi enzim tertinggi pada 4 jsi. Pada pengamatan 12 jsi, beberapa perlakuan mengalami kenaikan aktifitas enzim terutama varietas JH 37 pada perlakuan filtrat maupun suspensi. Rata-rata perlakuan diamati menunjukkan penurunan aktifitas enzim TAL pada 24 jsi, kecuali perlakuan kultur filtrat dan suspensi pada varietas Pulut Uri yang mengalami peningkatan enzim TAL. Sementara itu, pengamatan 48 jsi menunjukkan bahwa semua perlakuan mengalami kenaikan aktifitas enzim TAL, hingga 96 jsi. Pengamatan pada 96 jsi menunjukkan bahwa hanya perlakuan suspensi dan kontrol pada varietas Pulut Uri yang tidak mengalami peningkatan aktifitas enzim TAL. Aktifitas enzim TAL tertinggi hingga akhir pengamatan diamati terjadi pada perlakuan filtrat *T. asperellum* AC.3 dan disusul perlakuan suspensi pada varietas JH 37 yang secara statistik berbeda tidak nyata.



Gambar 2. 9 Aktifitas enzim TAL pada tanaman jagung sebelum (0 jsi) dan setelah (4, 12, 24, 48, dan 96 jsi) diinokulasi *P. maydis*

Ket: FT= filtrat varietas JH 37, ST= suspensi varietas JH 37, KT= kontrol varietas JH 37, FR= filtrat varietas Pulut Uri, SR= suspensi varietas Pulut Uri, KR= kontrol varietas Pulut Uri

2.4.3 Korelasi antara Aktifitas Enzim dengan Respon Pertahanan Tanaman

Analisis korelasi dengan metode Pearson dilakukan untuk mengetahui keeratan hubungan antara aktifitas enzim dengan respon ketahanan jagung terhadap *P. maydis*. Hasil analisis korelasi antara kandungan total fenol dan keparahan penyakit secara umum menunjukkan tingkat keeratan hubungan antara variabel relatif tinggi dan berbeda nyata (Tabel 2.2). Kandungan senyawa fenol sebelum inokulasi bulai (0 jsi) menunjukkan korelasi negatif dengan persentase peningkatan total fenol ($r = -0.67$) dan keparahan penyakit bulai pada umur 14 HSI ($r = -0,68$), 21 HSI ($r = -0,76$), dan 28 HSI ($r = -0.78$). Begitupun dengan kandungan total fenol pada 48 jsi menunjukkan korelasi negatif dengan tingkat keparahan penyakit bulai pada umur 14 HSI ($r = -0,55$), 21 HSI ($r = -0,71$), dan 28 HSI ($r = -0.71$). Hal ini mengindikasikan bahwa kandungan total fenol pada tanaman jagung sebelum adanya infeksi bulai (0 jsi) dan 48 jsi sangat mempengaruhi tingkat keparahan penyakit yang dihasilkan dibandingkan dengan waktu lainnya (4, 12, 24, dan 96 jsi).

Tabel 2. 2 Korelasi antara aktifitas senyawa fenol dengan respon ketahanan tanaman

	0 j	4 j	12 j	24 j	48 j	96 j	%fenol	14 HSI	21 HSI	28 HSI	PP 14	PP 21	PP 28
0 j	1	0.40	0.07	0.48	0.84	0.22	-0.67	-0.68	-0.76	-0.78	0.26	0.04	0.01
4 j		1	0.50	0.17	0.59	0.49	0.07	-0.21	-0.17	-0.15	0.26	0.06	0.03
12 j			1	-0.41	0.09	0.02	-0.05	0.07	0.18	0.19	0.15	-0.09	-0.11
24 j				1	0.54	0.77	0.08	-0.35	-0.41	-0.34	0.26	0.45	0.44
48 j					1	0.43	-0.34	-0.55	-0.71	-0.71	0.21	0.11	0.08
96 j						1	0.53	-0.11	-0.12	-0.04	0.30	0.45	0.44
%fenol							1	0.47	0.48	0.54	-0.04	0.21	0.24
14 HSI								1	0.88	0.86	0.37	0.00	0.05
21 HSI									1	0.99	-0.32	-0.12	-0.08
28 HSI										1	-0.28	-0.04	0.00
PP 14											1	0.72	0.69
PP 21												1	1
PP 28													1

Keterangan: 0j=total fenol 0 jam, 4j=total fenol 4 jsi, 12j=total fenol 12 jsi, 24j=total fenol 24 jsi, 48j=total fenol 48 jsi, 96j=total fenol 96 jsi, %fenol=peningkatan fenol, 14 HSI=% keparahan penyakit pada 14 HSI, 21 HSI=% keparahan penyakit pada 21 HSI, 28 HSI=% keparahan penyakit pada 28 HSI, PP14=% penekanan penyakit pada 14 HSI, PP21=% penekanan penyakit pada 21 HSI, PP28=% penekanan penyakit pada 28 HSI

Namun demikian, diantara aktifitas senyawa fenol juga memiliki hubungan positif yang sangat erat. Total fenol yang dihasilkan pada 48 jsi berkorelasi positif dengan kandungan fenol sebelum inokulasi 0 jsi ($r = 0.84$), 4 jsi ($r = 0.59$), dan 24 jsi ($r = 0.54$). Adapun kandungan fenol pada 96 jsi berkorelasi positif dengan senyawa fenol yang dihasilkan pada 24 jsi ($r = 0.77$) dan peningkatan fenol ($r = 0.53$). Hal ini menunjukkan bahwa dalam interaksi tiga arah antara tanaman jagung dengan *P. maydis* dan *T.*

asperellum AC.3 terjadi sinergisme antara kandungan fenol yang dihasilkan pada rentang waktu tertentu sebagai respons untuk menghadapi cekaman yang ditimbulkan oleh patogen dan kolonisasi *T. asperellum*.

Koefisien korelasi antara daya tumbuh tanaman, masa inkubasi dengan aktifitas senyawa enzim-enzim pertahanan disajikan pada Gambar 2.10. Daya tumbuh tanaman pada 10 HST rata-rata berkorelasi positif dengan aktifitas senyawa enzim terkait pertahanan yaitu enzim POD (0 dan 96 jsi), PPO (0, 12, 24 jsi), dan TAL (48 dan 96 jsi). Disamping itu, masa inkubasi penyakit bulai juga memiliki korelasi positif dengan aktifitas-aktifitas enzim pertahanan terutama menunjukkan korelasi yang signifikan dengan aktifitas enzim PPO 24 jsi ($r = 0,56$). Di sisi lain, antar aktifitas enzim juga saling berkorelasi diantaranya aktifitas enzim TAL 0 jsi berkorelasi sedang hingga sangat kuat dengan sebagian besar aktifitas enzim lainnya yaitu TAL 4 jsi ($r = 0,56$), TAL 12 jsi ($r = 0,65$), TAL 96 jsi ($r = 0,55$), PPO 12 jsi ($r = 0,52$), dan PPO 24 jsi ($r = 0,71$). Begitupula antar aktifitas enzim TAL saling berkorelasi positif, seperti antara aktifitas enzim TAL 12 jsi dengan aktifitas enzim TAL 4 jsi ($r = 0,85$) dan 96 jsi ($r = 0,52$). Selain korelasi antar enzim TAL, aktifitas senyawa enzim TAL 96 jsi juga ditemukan berkorelasi yang cukup signifikan dengan aktifitas enzim POD 0 jsi ($r = 0,53$). Sementara itu aktifitas enzim PPO 12 jsi diamati berkorelasi positif yang kuat dan sangat signifikan dengan aktifitas enzim PPO 24 jsi ($r = 0,79$). Hal ini menunjukkan respon aktifitas enzim pertahanan berhubungan erat satu dengan lainnya, dan aktifitas senyawa enzim ini dapat digunakan sebagai indikator untuk meningkatkan ketahanan tanaman jagung terhadap bulai.

Interaksi antara jagung-patogen bulai *P. maydis*-agen hayati *T. asperellum* AC.3 mempengaruhi akumulasi dan aktivitas enzim yang berhubungan dengan pertahanan pada jagung. Aktivitas enzim pertahanan seperti POD, PPO, TAL, dan total kandungan fenolik secara umum meningkat setelah inokulasi *P. maydis*. Perlakuan dengan kultur filtrat *T. asperellum* AC.3 secara umum meningkatkan aktivitas enzim POD, TAL, dan total kandungan fenolik, tetapi akumulasi PPO meningkat karena perlakuan suspensi *T. asperellum* AC.3. Kombinasi perlakuan kultur filtrat *T. asperellum* AC.3 dengan varietas JH 37 meningkatkan aktivitas dan akumulasi POD, TAL, dan total kandungan fenolik pada tanaman, tetapi tidak meningkatkan aktivitas PPO secara signifikan. Respons pertahanan jagung terhadap infeksi *P. maydis* melibatkan aktivitas enzim pertahanan yang kompleks.

Pengaruh kultur filtrat dan suspensi *T. asperellum* AC.3 pada tanaman tidak menimbulkan dampak toksik terhadap benih jagung sehingga tidak menghambat pertumbuhan. Bahkan perlakuan suspensi mampu merangsang pertumbuhan tanaman pada varietas JH 37 yang diamati memiliki daya tumbuh mencapai 96%, berbeda nyata dengan perlakuan kontrol sebesar 79%. Yu et al. (2021) melaporkan suspensi spora *T. asperellum* TaspHu1 dengan konsentrasi tinggi dapat mendorong pertumbuhan dan meningkatkan ketahanan bibit tomat terhadap patogen. Begitupun dengan perlakuan benih menggunakan kultur filtrat *Trichoderma* mampu meningkatkan parameter pertumbuhan tanaman pada millet (Nandini et al., 2017). Selama musim tanam, sumber infeksi awal dan utama terjadi melalui oospora yang dihasilkan saat kelembapan rata-rata kurang dari 90% dan suhu sedang (26-27 °C). Di daerah yang lebih lembap, infeksi sekunder juga terjadi melalui sporangia (Gilijamse & Jeger, 2016). Kondisi yang menguntungkan untuk berkembangnya penyakit adalah air bebas dengan suhu yang sedikit rendah di malam hari (19-26 °C) dan kelembapan relatif melebihi 95% (Shekhar & Kumar, 2012).

Aplikasi *T. asperellum* AC.3 pada varietas JH 37 mampu menginduksi respon ketahanan tanaman jagung terhadap penyakit bulai dengan memperpanjang masa inkubasi penyakit. Hal ini mengindikasikan bahwa aplikasi *T. asperellum* mampu menekan keparahan awal penyakit bulai. Berdasarkan laporan Samlikamnoed et al. (2023) aplikasi *T. asperellum* T76-14 menginduksi respon ketahanan pada bibit kelapa sawit dengan membatasi kolonisasi patogen pada jaringan inang, dan menghambat distribusi *Ganoderma boninense* di dalam tanah.

Perlakuan perendaman benih menggunakan kultur filtrat nampaknya lebih berperan dalam menekan infeksi penyakit bulai daripada perlakuan benih dengan suspensi *T. asperellum* AC.3. Hal ini mengasumsikan bahwa senyawa metabolit sekunder dalam filtrat lebih muda terserap oleh benih karena memiliki fluida yang lebih halus sehingga metabolit sekunder dapat bekerja secara cepat dan optimal. Kultur filtrat *T. asperellum* AC.3 diduga mengandung senyawa-senyawa metabolit yang mampu menginduksi sumber metabolisme berbeda yang terlibat dalam jalur pertahanan tanaman selama kolonisasi *T. asperellum* AC.3, yang pada akhirnya dapat menekan tingkat infeksi. Menurut Wonglom et al. (2020) senyawa antifungi yang terdeteksi dalam ekstrak kultur *T. asperellum* T1 adalah anggota kelas senyawa alkohol, aldehida, piran, dan asam lemak. Penekanan penyakit bulai yang diamati bukan disebabkan oleh antibiosis yang dihasilkan *T. asperellum* AC.3 terhadap patogen, namun diduga oleh kemungkinan timbulnya respons tanaman terhadap perlakuan filtrat *T. asperellum* AC.3.

Penerapan kultur filtrat *T. asperellum* AC.3 juga menyebabkan perubahan biokimia inang, yang dapat berkontribusi pada penekanan penyakit bulai pada jagung dalam kondisi rumah kawat. Strain cendawan tertentu dari *Trichoderma* menjajah dan menembus jaringan akar tanaman, memulai serangkaian perubahan morfologi dan biokimia pada tanaman, yang dianggap sebagai bagian dari respons pertahanan tanaman dan akhirnya menyebabkan ketahanan sistemik terinduksi (*Induced Systemic Resistance, ISR*) di seluruh tanaman (Leelavathi et al., 2014).

Tanaman merespons serangan patogen dengan memulai perubahan metabolisme sel, yang mengarah pada sintesis protein antifungi, produksi fitoaleksin dan/atau akumulasi senyawa fenol, yaitu lignin dan salisilat (Dogbo et al., 2012). Aplikasi perlakuan perendaman benih dengan filtrat dan suspensi *T. asperellum* AC.3 mengasumsikan bahwa adanya senyawa total fenol pada 0 jsi akibat perlakuan benih yang diberikan sebelum tanam pada kedua varietas tersebut sehingga mampu memberikan perlindungan terhadap infeksi patogen bulai. Peningkatan aktivitas dan akumulasi fenol juga bergantung pada varietas tanaman, kondisi fisiologis dan jenis patogen. Perlindungan dengan menginduksi resistensi didasarkan pada aktivasi langsung pertahanan oleh agen pemicu resistensi (Wang et al., 2014).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara endogen kandungan enzim PPO pada tanaman jagung sudah tersedia sehingga diduga ketika patogen menginfeksi inang, maka terjadi manipulasi terhadap hormon pada tanaman yang memicu peningkatan aktifitas enzim PPO yang dapat berdampak positif maupun negatif baik melalui peningkatan ketahanan tanaman maupun pengaruhnya terhadap pertumbuhan tanaman. Leiwakabessy et al. (2017) melaporkan bahwa ketika patogen menginfeksi, tanaman dapat mengubah keseimbangan hormon sehingga memicu pengaktifan senyawa-senyawa pertahanan tanaman seperti peroksidase, polifenol oksidase, dan β -glukanase. Aktivitas enzim pertahanan (fenilalanin amonialyase, peroksidase, dan polifenol oksidase) meningkat secara signifikan ke tingkat yang lebih tinggi setelah inokulasi patogen bulai (Siddaiah et al., 2018).

Trichoderma spp. dapat menghasilkan metabolit sekunder dengan beberapa aktivitas biologis untuk mempengaruhi metabolisme tanaman, khususnya protein intraseluler yang diekspresikan berlebih terutama terkait dengan metabolisme sikimat (L-triptofan, L-fenilalanin, dan L-tirosin), biosintesis auksin, dan metabolisme nitrogen (Liu et al., 2021). TAL bersinergi dengan PAL masing-masing mengubah tirosin dan fenilalanin menjadi asam p-kumarat dan asam f-sinamat dan asam-asam ini selanjutnya dimodifikasi dalam metabolisme menjadi prekursor fenilpropanoid yang digunakan dalam jalur sekunder yang memproduksi lignin, flavonoid dan antosianin, fitoaleksin, dan tannin (Morrison & Buxton, 1993). Selain itu, *Trichoderma* spp. juga diketahui dapat mengeluarkan enzim untuk berinteraksi dengan akar tanaman, yang mungkin mewakili strategi untuk menjaga stabilitas Spesies Oksigen Reaktif (*Reactive oxygen species, ROS*) dalam mempengaruhi respon imun tanaman lebih lanjut (Liu et al., 2021).

Aktivitas korelasi antar senyawa antioksidan yang berhubungan dengan pertahanan dapat memperkuat resistensi inang terhadap patogen tanaman. Hubungan antar aktifitas enzim pernah dilaporkan oleh Dogbo et al. (2012) yaitu enzim TAL terlibat dalam jalur biosintesis fenilpropanoid pada singkong, dimana efek kumulatif dari enzim tersebut bermanfaat untuk sintesis fenol. Namun, keterlibatan lebih lanjut senyawa enzim TAL dan POD pada respon ketahanan jagung terhadap bulai masih harus diselidiki. Aktifitas total fenol dan enzim PPO yang memiliki korelasi signifikan dengan merespons lebih cepat dan mengumpulkan tingkat hormon yang lebih tinggi terkait pertahanan dan dianalisis dari sampel organ akar tanaman. Hasil ini mendukung penelitian Balmer et al. (2013) resistensi yang ditimbulkan pada

jagung didasarkan pada respons pertahanan spesifik organ tanaman dimana akar menghasilkan resistensi yang lebih kuat dibandingkan organ daun dan dapat berfungsi sebagai senjata pertahanan.

Ketahanan tanaman terhadap stres biotik sering dikaitkan dengan pertumbuhan tanaman yang optimal, baik secara langsung maupun tidak langsung. Hubungan antara enzim pertahanan dan respons ketahanan tanaman tampak cukup kuat. Sebelum dan setelah inokulasi penyakit bulai, kadar total fenolik berkorelasi negatif dengan tingkat keparahan penyakit ($R = -0,78$; $-0,71$). Konsentrasi PPO pada 24 jam berkorelasi positif dengan waktu inkubasi penyakit bulai ($R = 0,56$). Lebih jauh, aktivitas enzim PPO, POD, dan TAL berkorelasi positif dengan pertumbuhan tanaman. Berdasarkan studi korelasi, disimpulkan bahwa salah satu strategi pertahanan jagung terhadap infeksi ini adalah penumpukan enzim pertahanan, khususnya total fenol dan PPO. Hubungan positif juga ditunjukkan antara aktivitas enzim dan mempertahankan jumlah akumulasi yang diperlukan untuk pertumbuhan tanaman yang sehat.

Respon tanaman jagung terhadap infeksi penyakit bulai yang terinduksi oleh *T. asperellum* AC.3 adalah resistensi yang diperoleh secara sistemik (*Systemic Acquired Resistance, SAR*) sebagaimana dibuktikan oleh peningkatan senyawa pertahanan terisolasi tidak hanya pada daun tempat infeksi penyakit bulai terjadi seperti TAL dan POD, tetapi juga pada akar tempat infeksi tidak terjadi, seperti PPO. Namun, resistensi sistemik yang diinduksi (ISR) *T. asperellum* AC.3 secara langsung dan tidak langsung meningkat dengan melepaskan bahan kimia fenolik di daerah daun, mengurangi pertumbuhan patogen. Respon pertahanan yang dimediasi *Trichoderma* ditemukan sebagai ISR atau SAR, kemungkinan besar karena spesies *Trichoderma* dapat tumbuh di atas dan di dalam akar (TariqJaveed et al., 2021).

Hasil penelitian menunjukkan hubungan antara respon aktivitas enzim dengan 2 jenis kultivar jagung yang diuji. Lebih lanjut, varietas jagung yang digunakan tidak berbeda secara signifikan dalam aktivitas enzim POD, tetapi konsentrasi enzim PPO dan TAL secara signifikan lebih tinggi pada varietas JH 37 dibandingkan dengan Pulut Uri. Kemampuan varietas JH 37 (toleran) lebih responsif dibandingkan varietas Pulut Uri (rentan) dalam menanggapi aktivitas enzim PPO dan TAL dapat disebabkan oleh perbedaan kemampuan varietas tersebut dalam menginduksi enzim akibat variasi susunan genetiknya. Sejalan dengan penelitian Singh et al. (2015), aktivitas enzim antioksidan, termasuk superoksidasase, POD, dan CAT, pada tanaman yang mengalami stres lingkungan terbukti lebih tinggi pada genotipe toleran.

2.5 Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengujian yang dilakukan pada penelitian respon aktifitas enzim, dapat disimpulkan beberapa hal yaitu:

1. Perlakuan benih menggunakan kultur filtrat *T. asperellum* AC.3 lebih berperan dalam menekan infeksi patogen *P. maydis* daripada perlakuan benih dengan suspensi. Sehingga dapat dikatakan bahwa mekanisme penghambatan yang digunakan oleh *T. asperellum* untuk mencegah invasi bulai yaitu dengan memanfaatkan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh filtratnya.
2. Interaksi antara tanaman jagung-patogen bulai *P. maydis*-agens hayati *Trichoderma asperellum* AC.3 berpengaruh pada peningkatan aktivitas enzim-enzim pertahanan yang ada pada tanaman jagung. Diantaranya aktivitas enzim-enzim pertahanan peroksidase, polifenol oksidase, tirosin ammonia lyase, dan kandungan total fenol yang pada umumnya meningkat setelah perlakuan inokulasi patogen *P. maydis*.
3. Kandungan total fenol pada tanaman jagung yang dihasilkan sebelum adanya infeksi bulai dan 48 jam setelah inokulasi sangat mempengaruhi tingkat keparahan penyakit bulai.
4. Aktifitas enzim polifenol oksidase pada 24 jam setelah adanya infeksi patogen *P. maydis* mempengaruhi perpanjangan masa inkubasi penyakit bulai.

2.6 Daftar Pustaka

- Almeida, S. L. De, Morais, M. A. D. S., Albuquerque, J. R. T. De, Barros Júnior, A. P., Simões, A. D. N., & Fonseca, K. S. (2019). Polyphenol oxidase and peroxidase enzyme assays in sweet potato cultivars harvested at different times. *Revista Caatinga*, 32(2), 537–542. <https://doi.org/10.1590/1983-21252019v32n226rc>
- Antônio, J. da S. S., Kátia, R. F. S.-E., Juliana, S. B. O., Marianna, dos S. R. A., & Lilianne, M. R. (2016). Induction of defense mechanisms from filtrates of saprophytic fungi against early blight disease in tomato. *African Journal of Microbiology Research*, 10(44), 1849–1859. <https://doi.org/10.5897/ajmr2016.8106>
- Ashry, N. A., & Mohamed, H. I. (2012). Impact of secondary metabolites and related enzymes in flax resistance and/or susceptibility to powdery mildew. *African Journal of Biotechnology*, 11(5), 1073–1077. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1023>
- Balmer, D., De Papajewski, D. V., Planchamp, C., Glauser, G., & Mauch-Mani, B. (2013). Induced resistance in maize is based on organ-specific defence responses. *Plant Journal*, 74(2), 213–225. <https://doi.org/10.1111/tpj.12114>
- Crouch, J. A., Davis, W. J., Shishkoff, N., Castroagudín, V. L., Martin, F., Michelmore, R., & Thines, M. (2022). Peronosporaceae species causing downy mildew diseases of Poaceae, including nomenclature revisions and diagnostic resources. *Fungal Systematics and Evolution*, 9(1), 43–86.
- Dar, M. A., Kaushik, G., & Villarreal-Chiu, J. F. (2019). Pollution status and bioremediation of chlorpyrifos in environmental matrices by the application of bacterial communities: A review. *Journal of Environmental Management*, 239(March), 124–136. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.03.048>

- Djaenuddin, N., Djaya, E., Najamuddin, E., Yusnawan, E., Nasruddin, A., & Kuswinanti, T. (2024). Induction of Maize Resistance to Downy Mildew Disease *Peronosclerospora* spp. Using an Endophytic Consortium. *Defence Life Science Journal*, 9(3), 257–264. <https://doi.org/10.14429/dlsj.9.19295>
- Dogbo, D. O., Gogbeu, S. J., Yao, K. A., Zohouri, G. P., Mamyrbekova-Bekro, J. A., & Bekro, Y. A. (2012). Comparative Activities of Phenylalanine Ammonia-Lyase and Tyrosine Ammonia-Lyase and Phenolic Compounds Accumulated in Cassava Elicited Cell. *African Crop Science Journal*, 20(2), 85–94. [https://doi.org/ISSN 1021-9730/2012 \\$4.00](https://doi.org/ISSN%201021-9730/2012%20$4.00)
- Gilijamse, E., & Jeger, M. J. (2016). Epidemiology and control of pearl millet downy mildew, *Sclerospora graminicola*, in Southwest Niger. In P. T. N. Spencer-Philips, U. Gisi, & A. Lebeda (Eds.), *Advances in Downy Mildew Research* (Issue January 2004, pp. 189–193). Kluwer Academic Publishers.
- Intana, W., Kumla, J., Suwannarach, N., & Sunpapao, A. (2023). Biological control potential of a soil fungus, *Trichoderma asperellum* K1-02, against *Neoscytalidium dimidiatum* causing stem canker of dragon fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 128(November), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2023.102151>
- Jain, A., & Das, S. (2020). *Trichoderma*: Agricultural applications and beyond. In C. Manoharachary, H. B. Singh, & A. Varma (Eds.), *Soil Biology* (61st ed.). Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-030-54758-5_9
- Konappa, N., Krishnamurthy, S., Siddaiah, C. N., Ramachandrappa, N. S., & Chowdappa, S. (2018). Evaluation of biological efficacy of *Trichoderma asperellum* against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(63), 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s41938-018-0069-5>
- Leelavathi, M., Vani, L., & Reena, P. (2014). Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(1),96-103.<https://doi.org/ISSN:2319-7706>
- Leiwakabessy, C., Sinaga, M. S., Mutaqin, K. H., Trikoesoemaningtyas, T., & Giyanto, G. (2017). Asam Salisilat sebagai Penginduksi Ketahanan Tanaman Padi terhadap Penyakit Hawar Daun Bakteri. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*, 13(6), 207–215. <https://doi.org/10.14692/jfi.13.6.207>
- Liu, Q., Tang, S., Meng, X., Zhu, H., Zhu, Y., Liu, D., & Shen, Q. (2021). Proteomic Analysis Demonstrates a Molecular Dialog between *Trichoderma guizhouense* NJAU 4742 and Cucumber (*Cucumis sativus* L) Roots: Role in Promoting Plant Growth. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34(6), 631–644. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0240-R>
- Mirsam, H., Suriani, Kurniawati, S., Purwanto, O. D., Muis, A., Pakki, S., Tenrirawe, A., Nonci, N., Herawati, Muslimin, & Azrai, M. (2023). In vitro inhibition mechanism of *Trichoderma asperellum* isolates from corn against *Rhizoctonia solani* causing banded leaf and sheath blight disease and its role in improving the growth of corn seedlings. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 33(95), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s41938-023-00729-5>
- Mitsch, M., & White, B. (2020). A Simple, Quantitative Peroxidase Assay Demonstrating Enzyme Inhibition with L-cysteine. *Advances in Biology Laboratory Education*, 41(44), 1–10. <https://doi.org/10.37590/able.v41.art44>
- Morrison, T. A., & Buxton, D. R. (1993). Activity of phenylalanine ammonia-lyase, tyrosine ammonia-lyase, and cinnamyl alcohol dehydrogenase in the maize

- stalk. *Crop Science*, 33(6), 1264–1268. <https://doi.org/10.2135/cropsci1993.0011183X003300060030x>
- Muis, A., Ryley, M. J., Tan, Y. P., Suharjo, R., Nonci, N., Danaatmadja, Y., Hidayat, I., Widiastuti, A., Widinugraheni, S., Shivas, R. G., & Thines, M. (2023). *Peronosclerospora neglecta* sp. nov.—a widespread and overlooked threat to corn (maize) production in the tropics. *Mycological Progress*, 22(12), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s11557-022-01862-5>
- Nandini, B., Geetha, N., Prakash, H. S., & Hariprasad, P. (2021). Natural uptake of anti-oomycetes *Trichoderma* produced secondary metabolites from pearl millet seedlings – A new mechanism of biological control of downy mildew disease. *Biological Control*, 156(January), 104550. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104550>
- Nandini, B., Hariprasad, P., Prakash, H. S., Shetty, H. S., & Geetha, N. (2017). Trichogenic-selenium nanoparticles enhance the disease-suppressive ability of *Trichoderma* against downy mildew disease caused by *Sclerospora graminicola* in pearl millet. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02737-6>
- Nunes da Silva, M., Vasconcelos, M. W., Pinto, V., Balestra, G. M., Mazzaglia, A., Gomez-Cadenas, A., & Carvalho, S. M. P. (2021). Role of methyl jasmonate and salicylic acid in kiwifruit plants further submitted to Psa infection: Biochemical and genetic responses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 162(August 2020), 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.02.045>
- Özer, N., Şabudak, T., Kılıç, T. H., Evcı, G., & Yılmaz, M. İ. (2023). Evaluation of *Trichoderma harzianum* to control downy mildew disease in sunflower under field conditions based on changes in the metabolite profiles of roots. *BioControl*, 68(2), 191–206. <https://doi.org/10.1007/s10526-023-10190-w>
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S., & Shahabimajid, N. (2006). Antioxidant activity, phenol, and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(11), 1142–1145. <http://www.3gpp.org/ftp/Specs/html-info/32744.htm>
- Prasetyo, J. S., Ginting, C., & Permatasari, Y. C. (2019). The Effectiveness of *Trichoderma* spp. against Downy Mildew Disease of Corn. *Annual Research & Review in Biology*, 31(6), 1–10. <https://doi.org/10.9734/arrb/2019/v31i630068>
- Qi, Q., Fan, C., Wu, H., Sun, L., & Cao, C. (2023). Preparation of *Trichoderma asperellum* Microcapsules and Biocontrol of Cucumber Powdery Mildew. *Microbiology Spectrum*, 11(3). <https://doi.org/10.1128/spectrum.05084-22>
- Reyad, N. E. H. A., Azoz, S. N., Ali, A. M., & Sayed, E. G. (2022). Mitigation of Powdery Mildew Disease by Integrating Biocontrol Agents and Shikimic Acid with Modulation of Antioxidant Defense System, Anatomical Characterization, and Improvement of Squash Plant Productivity. *Horticulturae*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/horticulturae8121145>
- Sabbagh, S. K., Roudini, M., & Panjehkeh, N. (2017). Systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* and *Glomus mossea* on cucumber damping-off disease caused by *Phytophthora melonis*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 5408(April), 0. <https://doi.org/10.1080/03235408.2017.1317953>
- Samlikamnoed, P., Anothai, J., & Chairin, T. (2023). Defense-related enzyme production in oil palm seedlings against basal stem rot pathogen *Ganoderma bonense* and its biological control by *Trichoderma asperellum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 128(102154).

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102154>
- Satrah, V. N., Johan, E. A., Awaluddin, A., R., A. K., Sudarmo, H., Wijayanto, T., & Mariadi, M. (2020). Efektivitas pupuk hayati biofresh dan pupuk organik bokashi dalam meningkatkan ketahanan tanaman jagung terhadap penyakit *Puccinia polysora*. *Journal Agercolere*, 2(1), 11–16. <https://doi.org/10.37195/jac.v2i1.90>
- Seleim, M. A., Abo-Elyousr, K. A., Mohamed, A.-A. A., & Al-Marzoky, H. A. (2014). Peroxidase and Polyphenoloxidase Activities as Biochemical Markers for Biocontrol Efficacy in the Control of Tomato Bacterial Wilt. *Journal of Plant Physiology & Pathology*, 02(01), 1–4. <https://doi.org/10.4172/2329-955x.1000117>
- Sharma, R. C., De Leon, C., & Payak, M. M. (1993). Diseases of maize in South and South-East Asia: problems and progress. *Crop Protection*, 12(6), 414–422. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(93\)90002-Z](https://doi.org/10.1016/0261-2194(93)90002-Z)
- Shekhar, M., & Kumar, S. (2012). *Inoculation methods and disease rating scales for maize diseases* (M. Shekhar & S. Kumar (eds.) Second (Re). ICAR-Directorate of Maize Research.
- Siddaiah, C. N., Prasanth, K. V. H., Satyanarayana, N. R., Mudili, V., Gupta, V. K., Kalagatur, N. K., Satyavati, T., Dai, X. F., Chen, J. Y., Mocan, A., Singh, B. P., & Srivastava, R. K. (2018). Chitosan nanoparticles having a higher degree of acetylation induce resistance against pearl millet downy mildew through nitric oxide generation. *Scientific Reports*, 8(2485), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19016-z>
- Singh, A., Bhushan, B., Gaikwad, K., Yadav, O. P., Kumar, S., & Rai, R. D. (2015). Induced defence responses of contrasting bread wheat genotypes under differential salt stress imposition. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 52(1), 75–85.
- Surekha, C., Nelapu, N., Prasad, B. S., & Ganesh, P. S. (2014). Induction of Defense Enzymes and Phenolic Content by *Trichoderma viride* in *Vigna mungo* Infested With *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. *International Journal of Agricultural Science and Research*, 4(4), 31–40. <https://www.researchgate.net/publication/274640432>
- Suriani, Patandjengi, B., Muis, A., Junaid, M., Mirsam, H., & Azrai, M. (2023). Morpho-physiological and molecular characteristics of bacteria causing stalk rot disease on corn in Gorontalo, Indonesia. *Biodiversitas*, 24(3), 1749–1758. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240349>
- TariqJaveed, M., Farooq, T., Al-Hazmi, A. S., Hussain, M. D., & Rehman, A. U. (2021). Role of *Trichoderma* as a biocontrol agent (BCA) of phytoparasitic nematodes and plant growth inducer. *Journal of Invertebrate Pathology*, 183(January), 107626. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107626>
- Telle, S., Shivas, R. G., Ryley, M. J., & Thines, M. (2011). Molecular phylogenetic analysis of *Peronosclerospora* (Oomycetes) reveals cryptic species and genetically distinct species parasitic to maize. *European Journal of Plant Pathology*, 130(4), 521–528. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9772-8>
- Wang, X., Wang, L., Wang, J., Jin, P., Liu, H., & Zheng, Y. (2014). *Bacillus cereus* AR156-induced resistance to *Colletotrichum acutatum* is associated with priming of defense responses in loquat fruit. *PLoS ONE*, 9(11), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112494>
- Wonglom, P., Ito, S. ichi, & Sunpapao, A. (2020). Volatile organic compounds emitted from endophytic fungus *Trichoderma asperellum* T1 mediate antifungal activity, defense response, and promote plant growth in lettuce (*Lactuca sativa*). *Fungal*

- Ecology*, 43(100867), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.100867>
- Yi, H. S., Yang, J. W., & Ryu, C. M. (2013). ISR meets SAR outside: Additive action of the endophyte *Bacillus pumilus* INR7 and the chemical inducer, benzothiadiazole, on induced resistance against bacterial spot in field-grown pepper. *Frontiers in Plant Science*, 4(MAY), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00122>
- Yu, Z., Wang, Z., Zhang, Y., Wang, Y., & Liu, Z. (2021). Biocontrol and growth-promoting effect of *Trichoderma asperellum* TaspHu1 isolate from *Juglans mandshurica* rhizosphere soil. *Microbiological Research*, 242(September 2020), 126596. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126596>