

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu komoditas perkebunan yang memiliki nilai strategis di Indonesia, berperan penting sebagai sumber devisa negara serta pendapatan bagi petani (Suherlina dkk., 2020). Namun, budidaya kakao terancam oleh berbagai penyakit yang merusak, terutama yang disebabkan oleh patogen seperti *Phytophthora*, *Neofusicoccum*, dan *Lasiodiplodia*, yang menyebabkan buah kakao terinfeksi (Puig et al., 2021). Dalam dekade terakhir, penyakit busuk buah yang disebabkan oleh *Lasiodiplodia* telah menjadi masalah serius di Sulawesi, Indonesia, seiring meningkatnya prevalensi penyakit layu yang disebabkan oleh patogen yang sama (Nurjannah, 2023; Asman dkk., 2024). Penyakit ini, yang disebabkan oleh *Lasiodiplodia theobromae*, ditandai oleh pembentukan lesi berwarna coklat hingga hitam yang berkembang cepat dan sering disertai pertumbuhan miselium putih dalam 11-12 hari setelah inokulasi (Huda-Shakirah et al., 2022; Nurjannah, 2023).

Sejak kemunculan dan penyebarannya yang relatif baru, penyakit busuk buah yang disebabkan oleh *Lasiodiplodia theobromae* semakin menjadi perhatian penting dalam sistem produksi tanaman perkebunan. Penelitian mengenai metode pengendalian yang efektif dan efisien menjadi sangat diperlukan, terutama karena pendekatan pengelolaannya hingga kini masih belum banyak dieksplorasi. Saat ini, fungisida kimia masih menjadi strategi utama dalam pengelolaan *L. theobromae* dan telah terbukti efektif dalam berbagai pengujian, baik *in vitro* maupun *in vivo* (Da Silva et al., 2012; Pedraza et al., 2013; Safdar et al., 2015; Asman et al., 2020). Namun, meningkatnya kekhawatiran terhadap dampak penggunaan pestisida sintetis, khususnya pada tanaman kakao, menegaskan urgensi pengembangan metode pengendalian yang lebih berkelanjutan, termasuk praktik budidaya yang baik serta pemanfaatan strategi pengendalian biologis (Swisscontact, 2017; Babin, 2018). Dalam beberapa tahun terakhir, penelitian mengenai agen pengendalian hayati berbasis mikroorganisme untuk mengatasi *L. theobromae* menunjukkan hasil yang menjanjikan. Sejumlah mikroorganisme seperti *Bacillus amyloliquefaciens* (Chukeatirote et al., 2018), *Streptomyces samsunensis* (Kamil et al., 2018), dan *Trichoderma* spp. (De Oliveira et al., 2018) diketahui memiliki kemampuan antagonistik melalui mekanisme antibiosis, parasitisme, serta peningkatan ketahanan tanaman inang (Martínez-Hidalgo et al., 2015; Saeed et al., 2017). Selain itu, studi terbaru melaporkan bahwa ekstrak tumbuhan, khususnya *Zingiber zerumbet* dan *Moringa oleifera*, juga efektif dalam menekan perkembangan *L. theobromae* (Yeo et al., 2023; Hakim et al., 2025).

Pemanfaatan agens biocontrol seperti pestisida nabati dan *Trichoderma* dalam mengendalikan patogen tanaman dapat menjadi solusi dalam pengurangan penggunaan pestisida kimia. Tanaman biduri (*Calotropis gigantea* L.) yang termasuk dalam *Family Asclepiadaceae*, berpotensi dimanfaatkan sebagai

pestisida nabati karena hampir seluruh bagian tanamannya mengandung senyawa aktif yang berguna. Daunnya diketahui memiliki kandungan senyawa seperti saponin, flavonoid, polifenol, tanin, serta kalsium oksalat (Witono, 2016). Ekstrak daun biduri terbukti mampu menghambat pertumbuhan miselium dan tabung kecambah konidia, serta menurunkan intensitas bercak yang disebabkan oleh cendawan *Colletotrichum capsici* pada konsentrasi 1,0% (Sulaksono *et al.*, 2002). Namun, penggunaan pestisida nabati masih terbatas karena efektivitasnya rendah dan memerlukan aplikasi berulang. Untuk meningkatkan efektivitas, pestisida nabati dapat dikombinasikan dengan agen hayati seperti cendawan *Trichoderma* (Wu *et al.*, 2017).

Cendawan *Trichoderma spp.* telah dilaporkan sebagai antagonis untuk *L. theobromae* pada tanaman pamelo (Khuong *et al.*, 2023) dan cendana (Wolagole *et al.*, 2023). Hasil penelitian (Li *et al.*, 2022) juga menyatakan bahwa *Trichoderma* mampu menghambat pertumbuhan *L. theobromae* yang menyebabkan penyakit busuk pada kulit buah, kanker batang, dan nekrosis tunas pada tanaman makadamia secara *in vitro* dan *in vivo*. Efektivitas jenis *Trichoderma asprellum* sebagai agens hayati telah dibuktikan pada penelitian (Susanna *et al.*, 2018) yang melaporkan bahwa *T. asprellum* mampu menekan pertumbuhan *L. theobromae* pada tanaman pala dengan tingkat penghambatan antara 66% hingga 100%. Sementara itu, *T. pubescens* juga menunjukkan potensi antagonistik yang tinggi, sebagaimana ditunjukkan oleh (Behiry *et al.*, 2023), yang mencatat kemampuannya dalam menghambat *Rhizoctonia solani* hingga 76,39% secara *in-vitro* serta meningkatkan ketahanan tanaman tomat terhadap serangan patogen.

Dengan potensi pestisida nabati dan *Trichoderma* dalam meningkatkan ketahanan tanaman serta menekan perkembangan penyakit, penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan efektivitas keduanya melalui kombinasi pestisida nabati (Natural Plant Product) ekstrak *C. gigantea* dengan *T. asprellum* dan *T. pubescens* terhadap *Lasiodiplodia theobromae*. Pendekatan kombinitif ini memperlihatkan adanya efek sinergis antara senyawa bioaktif ekstrak tanaman dan *Trichoderma spp.* dalam menghambat pertumbuhan patogen. Khabita *et al.*, (2022) melaporkan bahwa rendaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) yang dikombinasikan dengan *Trichoderma spp.* secara *in vitro* menunjukkan interaksi sinergis dalam menekan pertumbuhan patogen, sehingga berpotensi dikembangkan sebagai biopestisida alami berbasis kombinasi. Penelitian sebelumnya juga menunjukkan hasil signifikan dari pendekatan tersebut. Kombinasi *Trichoderma spp.* dan ekstrak fungisida nabati efektif menekan *Fusarium oxysporum* f.sp. *capsici*, penyebab penyakit layu pada cabai, dengan penurunan tingkat infeksi hingga 60,05% pada uji semi *in vivo* (Hasanah *et al.*, 2016).

Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini mengkaji kombinasi ekstrak *Calotropis gigantea* dengan *T. asprellum* dan *T. pubescens* menghambat pertumbuhan *L. theobromae*. Penelitian diawali dengan uji kompatibilitas antara kedua spesies *Trichoderma* dan ekstrak *C. gigantea*, kemudian dilanjutkan dengan pengujian efektivitas kombinasi pada uji *in vitro* dan *in vivo*, serta analisis senyawa bioaktif dari *C. gigantea*.

1.2. Tujuan dan Manfaat Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menguji efektivitas *Trichoderma asperellum*, *T. pubescens*, dan kombinasinya, baik secara tunggal maupun dikombinasikan dengan ekstrak *Calotropis gigantea* pada berbagai konsentrasi, dalam menghambat pertumbuhan *Lasioidiplodia theobromae*.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai efektivitas serta potensi sinergi antara *Trichoderma* dan ekstrak *C. gigantea*, sebagai dasar pemilihan agen hayati yang paling potensial dalam pengendalian penyakit busuk buah kakao *L. theobromae*.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Ilmu Hama dan Penyakit Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin dimulai pada bulan Januari 2024.

2.2 Bahan dan Alat

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini antara lain: Bubuk tanaman Biduri (*Calatropis gigantea*), buah kakao, isolat cendawan *Trichoderma pubescent* dan *T. asperellum*, isolat *Lasiodiplodia theobromae*, media PDA (*Potato Dextrose Agar*), alkohol 70% dan air steril.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: cawan Petri, *Erlenmeyer*, *Hemositometer*, lampu bunsen, blender, *Autoclave*, *mikroskop*, mikropipet, tabung reaksi, kertas saring, tissue, plastic, sarung tangan *latex*, pisau, pinset, jarum, kamera, cork borer, gelas ukur, alat tulis dan aluminium foil.

2.3 Prosedur Kerja

2.2.1 Pembuatan Bubuk *Calatropis gigantea*

Pembuatan bubuk *C. gigantea* dengan cara mengambil bahan tanaman pada bagian daun. Proses pembuatan diawali dengan mencuci daun pada air mengalir dan dikering anginkan selama seminggu, kemudian dipotong kecil dan blender sampai berbentuk serbuk halus lalu disaring. Bubuk *C. gigantea* tersebut di oven selama 24 jam pada suhu 40° C untuk menjaga kelembapan agar terhindar dari pertumbuhan jamur dan disimpan dalam wadah tertutup.



Gambar 1. Proses pembuatan bubuk *C. gigantea*

2.2.2 Pembuatan Media PDA (Potato Dextrose Agar)

Media PDA dibuat dengan bahan kentang sebanyak 200 gr, agar 15 gr, gula 20 gr, dan 1000 ml air steril. Kentang dicuci, kemudian dipotong dadu dengan ukuran kurang lebih 1 cm. lalu direbus dengan 500 ml air steril sampai matang. Setelah matang disaring, diambil airnya. Gula dan agar direbus dengan 500 ml air steril sampai mendidih. Ekstrak kentang dan larutan agar dicampur, diaduk hingga merata. Setelah merata ditambahkan air agar volume akhir menjadi 1000 ml. Selanjutnya media dimasukkan kedalam erlenmeyer 1 L. Kemudian Erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil lalu disterilkan menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C dengan tekanan 2 ATM selama 15 menit.

2.2.3 Pemurnian dan Perbanyakan Cendawan

Cendawan diperoleh dari Laboratorium Pengamatan Hama dan Penyakit. Isolat sampel cendawan antagonis dan pathogen dimurnikan/diremajakan menggunakan media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dengan memindahkan cendawan dari isolat awal ke media baru menggunakan *cork borer*.

2.2.4 Uji Kompatibilitas Ekstrak *Calatropis gigantea* dan *Trichoderma Spp*

Dalam uji kompatibel ini dilakukan untuk melihat adanya sinergitas antara cendawan dengan ekstrak *C. Gigantea* yang di tandai dengan pertumbuhan yang normal tidak menghambat atau menghasilkan interaksi positif yang dapat menstimulasi pertumbuhan dari cendawan *Trichoderma Spp*.

Perhitungan diameter koloni diawali dengan mengukur diameter koloni secara vertikal dan horizontal dengan menggunakan penggaris yang dilakukan setiap hari hingga koloni cendawan penuh. Perhitungan diameter koloni cendawan pada cawan petri berdasarkan rumus:

$$D = \frac{d1+d2}{2}$$

Keterangan:

D = diameter cendawan

d1 = diameter vertikal koloni cendawan

d2 = diameter horizontal koloni cendawan

Uji kompatibel dilakukan dengan menumbuhkan inokulum cendawan pada media PDA yang telah tercampur dengan konsentrasi ekstrak *C. gigantea* yang berbeda-beda. Untuk menentukan konsentrasi media PDA dengan ekstrak *C. gigantea* menggunakan rumus:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

Keterangan:

M1 = Konsentrasi larutan stok yang besarnya 100%

M2 = Konsentrasi larutan yang diinginkan

V1 = Volume larutan stok yang harus dilarutkan

V2 = Volume larutan perlakuan

Untuk konsentrasi 1% komposisi medianya yaitu 19.8ml larutan PDA dan 0.2ml *C. gigantea*, untuk konsentrasi 3% dan komposisi medianya yaitu 19.4ml larutan PDA dan 0.6ml *C. gigantea*, konsentrasi 5% komposisi medianya yaitu 19ml larutan PDA dan 1ml *C. gigantea*. Masing-masing konsentrasi ekstrak dicampurkan dengan media PDA, lalu dihomogenkan hingga tercampur merata. Setelah media memadat, miselia cendawan yang diambil dari koloni cendawan biakan murni menggunakan *cork-borer* diletakkan pada bagian tengah cawan petri menggunakan jarum ose. Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial 2 faktor yang mencakup beberapa perlakuan antara lain sebagai berikut:

Faktor A (Jenis cendawan)

1. *L. theobromae*
2. *T. asperellum*
3. *T. pubescens*

Faktor B (Ekstrak *C. gigantea*)

1. 0% (kontrol ekstrak)
2. 1% ekstrak *C. gigantea*
3. 3% ekstrak *C. gigantea*
4. 5% ekstrak *C. gigantea*

Interaksi perlakuan:

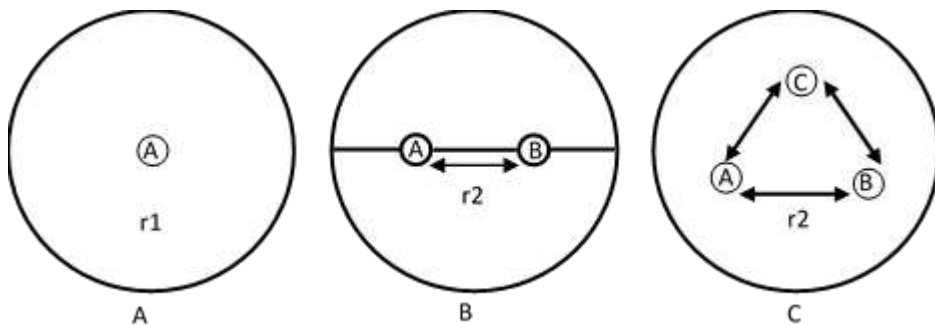
1. L = *Lasiodiplodia theobromae* (Kontrol)
2. LE1 = *Lasiodiplodia theobromae* + *Calotropis gigantea* 1%
3. LE2 = *Lasiodiplodia theobromae* + *Calotropis gigantea* 3%
4. LE3 = *Lasiodiplodia theobromae* + *Calotropis gigantea* 5%
5. T1 = *Trichoderma asperellum* (Kontrol)
6. T1E1 = *Trichoderma asperellum* + *Calotropis gigantea* 1%
7. T1E2 = *Trichoderma asperellum* + *Calotropis gigantea* 3%
8. T1E3 = *Trichoderma asperellum* + *Calotropis gigantea* 5%
9. T2 = *Trichoderma pubescens* (Kontrol)
10. T2E1 = *Trichoderma pubescens* + *Calotropis gigantea* 1%
11. T2E2 = *Trichoderma pubescens* + *Calotropis gigantea* 3%
12. T2E3 = *Trichoderma pubescens* + *Calotropis gigantea* 5%

Banyaknya perlakuan yang dicobakan yaitu 12 kombinasi perlakuan dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Data dianalisis secara statistik dengan sidik ragam dengan menggunakan program SAS 9.1.3. jika terdapat perbedaan nyata maka hasil analisis ragam dilanjutkan dengan uji lanjut Beda Nyata Jujur (BNJ) pada taraf 5 %, untuk membandingkan rata-rata antar perlakuan.

2.2.5 Uji Antagonis

Uji antagonis dilakukan setelah pengujian kompatibilitas untuk menilai kemampuan isolat *Trichoderma* spp. yang kompatibel dengan *C. gigantea* dalam menghambat *L. theobromae*. Pengujian ini menggunakan metode *singular antagonists*, *dual antagonists*, dan *triple antagonists* secara *in vitro*. Biakan

cendawan *Trichoderma spp* dan *patogen* ditumbuhkan bersamaan pada media PDA dengan jarak 3 cm dalam cawan petri. Selanjutnya, Pengukuran diameter pertumbuhan *L. theobromae* mulai hari ke-1 setelah inokulasi sampai dengan hari ke-5. Skema peletakan isolat ditampilkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Skema penempatan cendawan dengan metode *singular culture* (A), *dual culture* (B), *triple culture* (C) (Cernava et al., 2015)

Dual Culture

$$P (\%) = \frac{r1 - r2}{r1} \times 100\%$$

Triple Culture

$$P (\%) = \frac{r1A - r2B / r1A + r1A - r2C / r1A}{2} \times 100$$

Keterangan:

P = Daya hambat (%)

r1 = jari-jari koloni patogen pada kontrol tunggal (A)

r2 = jari-jari koloni patogen yang mengarah ke agen antagonis (B)

Uji antagonis disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial 2 faktor dengan perlakuan sebagai berikut:

Faktor A (Jenis cendawan)

1. *L. theobromae* (T0)
2. *T. asperellum* (T1)
3. *T. pubescens* (T2)

Faktor B (Ekstrak *C. gigantea*)

1. 0% (kontrol ekstrak) (E0)
2. 1% ekstrak *C. gigantea* (E1)
3. 3% ekstrak *C. gigantea* (E2)
4. 5% ekstrak *C. gigantea* (E3)

Interaksi perlakuan:

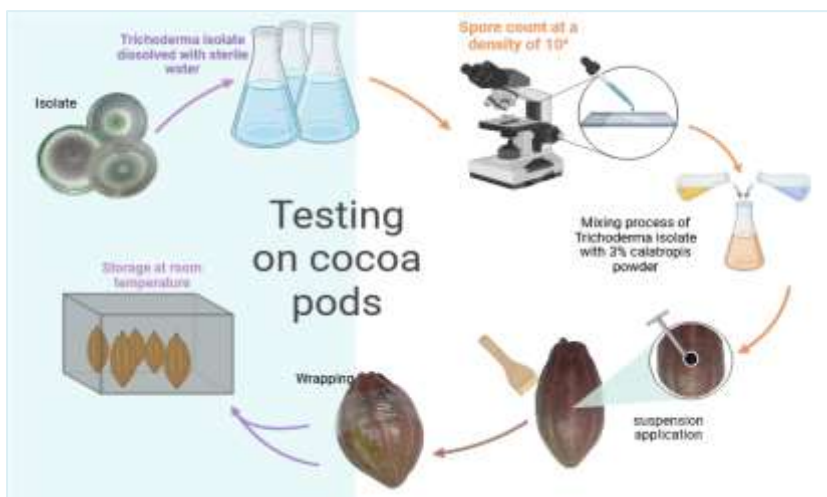
1. T0T1E0 = *L. theobromae* + *T. asperellum*
2. T0T1E1 = *L. theobromae* + *T. asperellum* + *Calotropis* 1%
3. T0T1E2 = *L. theobromae* + *T. asperellum* + *Calotropis* 3%
4. T0T1E3 = *L. theobromae* + *T. asperellum* + *Calotropis* 5%
5. T0T2E0 = *L. theobromae* + *T. pubescens*
6. T0T2E1 = *L. theobromae* + *T. pubescens* + *Calotropis* 1%

7. T0T2E2 = *L. theobromae* + *T. pubescens* + *Calotropis* 3%
8. T0T2E3 = *L. theobromae* + *T. pubescens* + *Calotropis* 5%
9. T0T1T2E0 = *L. theobromae* + *T. asperellum* + *T. pubescens*
10. T0T1T2E1 = *L. theobromae* + *T. asperellum* + *T. pubescens* + *Calotropis* 1%
11. T0T1T2E2 = *L. theobromae* + *T. asperellum* + *T. pubescens* + *Calotropis* 3%
12. T0T1T2E3 = *L. theobromae* + *T. asperellum* + *T. pubescens* + *Calotropis* 5%

Setiap cendawan yang telah ditumbuhkan pada media PDA diamati pertumbuhannya. Pertumbuhan cendawan diukur menggunakan penggaris untuk melihat pertumbuhan ketiga cendawan tersebut. Banyaknya perlakuan yang dicobakan yaitu 12 kombinasi perlakuan dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Data dianalisis secara statistik dengan sidik ragam dengan menggunakan program SAS 9.1.3. jika terdapat perbedaan nyata maka hasil analisis ragam dilanjutkan dengan uji lanjut Beda Nyata Jujur (BNJ) pada taraf 5 %, untuk membandingkan rata-rata antar perlakuan.

2.2.6 Uji Daya Hambat Ekstrak *Calotropis gigantea* dan *Trichoderma* Spp Terhadap Pertumbuhan *Lasiodiplodia theobromae* Pada Buah Kakao

Pengujian pada buah kakao di Laboratrium dimulai dengan menyiapkan buah kakao sehat klon 45 yang telah di sterilkan. Menyiapkan suspensi *Trichoderma* 10^6 dan bubuk *C. gigantea* konsentrasi 3%, selanjutnya masing-masing perlakuan tunggal dan kombinasi diolesi ke buah kakao hingga merata dan dibiarkan selama 2 jam hingga suspensi pada permukaan buah tampak mengering. Inokulum *L. theobromae* dari biakan murni medium PDA diambil menggunakan *cork-borer* berdiameter 5 mm dan ditempelkan pada bagian buah kakao. Buah yang telah diinokulasi *L. theobromae* kemudian disusun dalam kotak plastik yang telah diberi alas kertas saring steril yang dilembabkan dengan aquades steril. Kotak kemudian ditutup dan disusun di dalam ruangan pada suhu kamar berdasarkan perlakuan.



Gambar 3. Proses Uji *In vivo* pada buah kakao

Pengamatan pada buah kakao dimulai saat munculnya gejala awal penyakit busuk buah (hari) pada buah kakao, yaitu timbulnya bercak cokelat kehitaman pada permukaan kulit buah. Parameter yang diamati meliputi panjang bercak, lebar bercak, serta luas bercak hasil infeksi (Musa *et al.*, 2022). Untuk menghitung luas bercak gejala busuk buah kakao, dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$L = 3,14 \times \left(\frac{p+l}{4}\right)^2$$

Keterangan:

L = luas bercak (cm²)

p = panjang bercak (cm)

l = lebar bercak (cm)

Rumus tersebut digunakan untuk memperkirakan luas bercak penyakit dengan mengasumsikan bentuk bercak menyerupai elips. Nilai yang diperoleh dari hasil pengukuran panjang dan lebar bercak kemudian dimasukkan ke dalam persamaan untuk memperoleh estimasi luas area yang terinfeksi oleh *L. theobromae*.

3.2.1 Analisis Senyawa Bioaktif *Calotropis gigantea*

Analisis senyawa bioaktif pada *C. gigantea* dilakukan melalui tahapan persiapan dengan menyiapkan bubuk *Calotropis* yang akan dianalisis menggunakan instrumen *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS QP2010) untuk mengidentifikasi senyawa kimia yang terkandung di dalamnya. Satu mililiter konsentrat yang dihasilkan dari ekstraksi disuntikkan ke dalam tabung kapiler GC. Tekanan kolom kapiler dijaga pada 42,3 kP dengan laju 0,74 per menit. Suhu awalnya dipertahankan pada 80 °C selama satu menit, kemudian dinaikkan menjadi 250 °C dengan laju 280 °C/menit, 300 °C dengan laju 270 °C/menit, dan akhirnya 320 °C dengan laju 260 °C/menit, dan dipertahankan selama 24 menit. Data kromatografi yang diperoleh dianalisis menggunakan NIST 17 and Wiley 9 libraries.