

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sektor perkebunan Indonesia adalah salah satu sektor yang paling penting bagi perekonomian nasional. Salah satu komoditas perkebunan unggulan yang menunjang perekonomian Indonesia adalah kakao (*Theobroma cacao* L.). Komoditas kakao berperan penting dalam perekonomian global karena harga kakao melonjak drastis mencapai lebih dari USD 11.500 perton pada akhir tahun 2024. Adapun Indonesia yang berperan besar sebagai penghasil kakao terbesar kedua di dunia serta berperan dalam eksportir produk olahan kakao dengan pangsa pasar global yang mencapai lebih dari 9%. Kondisi ini dapat membuka lapangan kerja dan menjadi peluang bagi petani kakao untuk meningkatkan pendapatannya (Olarde-Libreros et al., 2025). Pada tahun 2021 luas area budidaya kakao mengalami penurunan dari 1.460.396 Ha menjadi 1.421.009 Ha pada tahun 2022. Sehingga mempengaruhi penurunan produksi kakao dari 688.210 ton pada tahun 2021 menjadi 650.612 ton pada tahun 2022 (BPS, 2023). Penurunan produksi kakao juga dapat disebabkan oleh beberapa faktor di antaranya karena luas areal tanaman tidak menghasilkan karena sudah tua/rusak/mandul sedangkan tidak dilakukan peremajaan ulang, penyediaan bahan tanam unggul atau benih yang bermutu, lahan yang sesuai, faktor lingkungan dan penggunaan bahan organik (Ariningsih et al., 2021) (Baharuddin dan Rubiyo, 2013). Faktor lain yang dapat mempengaruhi penurunan produksi kakao juga dipengaruhi karena adanya Organisme Pengganggu Tanaman (OPT) kakao. OPT yaitu organisme yang mampu menyebabkan kerugian pada tanaman yang dapat dilihat dari kerusakan fisik, gangguan biokimia dan fisiologi, atau kompetisi hara pada tanaman sehingga menjadi tantangan yang paling sering dihadapi oleh petani pada praktik budidaya pertanian. Kelompok organisme ini dapat berupa hama, gulma, dan penyakit tanaman (Pakpahan et al., 2019).

Penyakit tanaman menurut Mustafa (2017) adalah kondisi tumbuhan dimana terjadinya perubahan fungsi-fungsi sel dan jaringan inang sebagai akibat gangguan yang terus menerus oleh agen-agen patogen atau faktor lingkungan dan menyebabkan berkembangnya gejala. Adapun definisi patogenitas yaitu kemampuan patogen dalam mengganggu satu fungsi penting tumbuhan atau lebih karena patogen seringkali memainkan peranan penting yang mengakibatkan timbulnya penyakit. Salah satu penyakit yang sering menyerang tanaman kakao yaitu penyakit mati ranting yang disebabkan oleh cendawan *Lasiodiplodia theobromae* yang selalu ada pada setiap musim dan menyerang tanaman kakao berumur muda sampai tua. Gejala yang terlihat pada ranting yang terinfeksi dapat dilihat pada bagian tengah kayu berwarna cokelat kehitaman (Alvandia et al., 2017).

Spesies *Lasiodiplodia* yang berasal dari famili Botryosphaeriaceae adalah genus patogen yang tersebar luas dan menyebabkan penyakit pada berbagai tanaman (Netto et al., 2014). Diketahui pada tahun 2004–2017, 43 spesies *Lasiodiplodia* telah dideskripsikan namun baru-baru ini lima spesies *Lasiodiplodia*

yang menyerang tanaman blueberry telah ditemukan di Cina hingga menjadikan genus *Lasiodiplodia* menjadi 48 spesies (Wang et al., 2021). Diantara banyaknya spesies *Lasiodiplodia*, salah satunya *L. theobromae* adalah patogen paling terkenal yang dapat menyerang hingga 500 inang (Punithalingam, 1980). *L. theobromae* (Sinonim: *Botryodiplodia theobromae*) merupakan patogen ekonomis yang merugikan pada berbagai tanaman perkebunan, hortikultura, dan pangan. Patogen ini bersifat oportunistik dan menyerang melalui luka atau jaringan nekrotik (Picos-Muñoz 2015).

L. theobromae pada tanaman kakao dapat menyebabkan penyakit, salah satunya mati ranting (*dieback*) yang ditemukan hampir di seluruh bagian tanaman seperti ranting, batang, jaringan vaskular, hingga buah. Tanaman kakao yang terinfeksi akan menunjukkan gejala penyakit yang khas, yaitu daun menguning dari ujung hingga pangkal ranting dan daun yang menempel pada batang. Jika ranting dan batang dibelah, akan terlihat berkas kecokelatan pada jaringan vaskular. Eksudat putih atau kekuningan akan muncul dari batang tanaman (Syam, 2022).

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dilakukan penelitian mengenai isolasi dan uji patogenisitas cendawan *Lasiodiplodia* spp. yang berasosiasi dengan mati ranting pada tanaman kakao muda asal Enrekang agar dapat memudahkan cara mengidentifikasi gejala nekrosis, klorosis, dan *dieback* pada berbagai metode yang akan dilakukan dalam penelitian ini.

1.2 Landasan Teori

1.2.1 Kakao

Berdasarkan informasi dari USDA Plants, tanaman kakao dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Ordo : Malvales
Famili : Sterculiaceae
Genus : *Theobroma*
Spesies : *Theobroma cacao* L.

Tanaman kakao berasal dari hutan tropis Amerika Tengah dan Amerika Selatan bagian utara. Kelompok pertama yang mengembangkan tanaman kakao dan memanfaatkannya sebagai bahan makanan dan minuman adalah suku Indian Maya dan Aztec. Kakao diperkenalkan ke Indonesia oleh bangsa Spanyol sekitar tahun 1560 di Minahasa dan Sulawesi. Di Indonesia, industri kakao mulai mengalami perkembangan pesat pada masa Hindia Belanda, sekitar tahun 1880-an. Pada saat itu, Belanda berfokus pada budidaya kakao setelah tanaman kopi dan teh mereka rusak karena hama dan penyakit. Pada tahun 1938, terdapat 29 perkebunan kakao di Hindia Belanda. Kemudian perkebunan itu kemudian dinasionalisasi sebagai milik Indonesia setelah kemerdekaan (Pusat Penelitian Kopi dan Kakao, 2010).

Kakao merupakan komoditas yang mempunyai nilai ekonomi tinggi. Menurut BPS (2023) produksi kakao Indonesia mencapai 650.612 ton, dengan ekspor

385.421 ton pada tahun 2022. Dengan demikian jika dilakukan proses diversifikasi pada kakao metah maka nilai tambah yang didapat dari produksi kakao akan tinggi, maka penting dilakukan proses pengolahan biji kakao. Proses pengolahan dapat memiliki dampak besar pada tingkat polifenol yang dipertahankan dalam biji kakao dan produk turunannya. Produk turunan kakao sangat beragam sebagai makanan (*food*), minuman (*beverages*), farmasi, dan kosmetik serta produk lainnya. Hasil berbagai penelitian telah dilaporkan terkait kontribusi kakao polifenol bagi kesehatan manusia, namun pemahaman penuh masih diperlukan dalam aspek bioavailabilitas polifenol kakao berkaitan dengan penyerapan yang tepat, distribusi, metabolisme dan ekskresi polifenol dalam tubuh manusia (Hii et al., 2010). Beberapa efek kesehatan dari kandungan biji kakao telah banyak dipertimbangkan, termasuk meningkatkan fungsi jantung, meningkatkan rangsangan dari sistem saraf, memfasilitasi proses pencernaan, dan meningkatkan fungsi ginjal dan usus (Corti et al., 2009).

Adapun cara perbanyak tanaman kakao yang dapat dilakukan adalah perbanyakan secara generatif dan vegetatif. Perbanyakan secara generatif yaitu dengan menggunakan biji kakao yang kemudian ditanam langsung di tanah setelah dikedambahkan. Selain menggunakan perbanyakan secara generatif cara terbaik dalam budidaya tanaman kakao adalah menggunakan bibit sambung pucuk dan sambung samping, karena lebih cepat dalam masa berbuah (Kristanto, 2015). Klonalisasi adalah teknik perbanyakan tanaman secara vegetatif yang menggunakan sambung pucuk, sambung samping, dan stek. Batang atau cabang yang disebut cabang entres atau kayu pada okulasi adalah bagian tanaman kakao yang banyak digunakan untuk menanam. Tanaman kakao yang diperbanyak secara vegetatif akan memiliki jumlah tanaman yang sama dalam sifat genetik tanaman induknya. Perbanyakan ini sangat populer karena dapat meningkatkan hasil secara kuantitas dan kualitas, menekan biaya operasional kebun, dan meningkatkan prekositasi berbuah lebih cepat (± 1 tahun). Sementara itu, kelemahannya adalah memerlukan keterampilan yang tinggi, biaya pembibitan yang lebih tinggi, dan sulit untuk mengirimkan entres ke lokasi pengembangan karena daya simpannya terbatas pada 3 hingga 4 hari (Tyasmoro et al., 2021).

Bahan tanaman kakao unggul memegang peranan penting dalam usaha tani kakao di Indonesia. Produktivitas dan mutu hasil kakao sangat ditentukan oleh kualitas bahan tanaman. Salah satu upaya untuk meningkatkan produktivitas dan mutu kakao dapat dilakukan dengan teknik klonalisasi sambung samping. Klon-klon tersebut antara lain MCC 01, MCC 02, Sulawesi 01, Sulawesi 02 dan BB (Buntu batu). Adapun beberapa karakter morfologi dari klon yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Sulawesi 02 (S2). Klon S2 ini memiliki bentuk daun yang panjang, tekstur daun halus, batangnya berwarna merah, memiliki sepal yang berwarna putih, bentuk buahnya menjuk, warna buahnya ungu dan memiliki permukaan kulit buah yang kasar (Widiyani et al., 2022).



Gambar 1. Klon unggul buah kakao (Sumber: Widiyani et al., 2022).

1.2.2 *Lasiodiplodia* spp.

Berdasarkan informasi dari MycoBank, patogen ini dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

- Kingdom : Fungi
- Filum : Ascomycota
- Kelas : Dothideomycetes
- Ordo : Botryshaeriales
- Famili : Botryosphaeriaceae
- Genus : *Lasiodiplodia*

Lasiodiplodia spp. adalah jenis cendawan yang ditemukan di berbagai tempat di seluruh dunia, terutama di daerah tropis dan subtropis. Patogen ini menyebabkan pembusukan, hawar cabang, busuk ujung cabang, busuk buah atau akar, kanker, mati ranting, dan gumosis (El-Ganainy et al., 2022). *L. theobromae* adalah salah satu spesies yang paling umum menyebabkan penyakit dan memiliki sekitar 500 spesies tanaman inang, termasuk karet, manggis, pisang, kakao, jeruk, dan sebagainya (Febbiyanti et al., 2019). Spesies ini dikenal sebagai cendawan yang dapat hidup sebagai endofit, jenis cendawan ini dapat menginfeksi jaringan tanaman kayu yang sehat tanpa menunjukkan gejala sampai kondisi stres muncul (Salvatore et al., 2020). *L. theobromae* merupakan nama lain dari *Botryodiplodia theobromae* yang bereproduksi secara aseksual (anamorph), cendawan ini juga memiliki fase seksual (telomorph) yaitu *Botryosphaeria rhodina* (Pavlic, 2004). Patogen ini bersifat oportunistik dalam menimbulkan penyakit dengan memanfaatkan luka alami maupun luka buatan atau luka karena serangga, terutama pada organ tanaman yang berdaging atau berkayu (Rossman et al., 2017).

Karakteristik makroskopis cendawan *L. theobromae* menunjukkan miselium dengan koloni awal berwarna abu muda yang berubah menjadi hitam setelah dua minggu inkubasi. Pada minggu ketiga, bagian bawah jamur tampak lebih gelap dan miselia menutupi seluruh permukaan media serta dilengkapi dengan piknidia. Secara mikroskopis, *L. theobromae* memiliki konidia hialin yang belum matang, bersekat, oval, dan memiliki dinding sel tebal. Konidia yang matang berwarna cokelat, bersepta, dan memiliki dinding sel tipis (Norhayati et al., 2016).

Pada kakao, *L. theobromae* adalah patogen yang unik dan dianggap sebagai patogen penting karena patogen tersebut menyebabkan beberapa penyakit, misalnya penyakit mati ranting yang menunjukkan gejala yang dapat dilihat pada tangkai yang terinfeksi, daun-daun menunjukkan perubahan warna menjadi kuning, kemudian coklat dan kering. Daun-daun yang telah kering tersebut tetap melekat selama beberapa hari. Pada permukaan kulit kayu, terdapat kumpulan miselium berwarna putih yang berubah menjadi abu-abu muda setelah beberapa hari pascapemangkasan. Di dalam bagian kayu terdapat garis-garis berwarna gelap (Asman, 2019).

L. theobromae merupakan anggota keluarga Botryosphaeriaceae dianggap sebagai patogen terkait stress. Sehingga faktor biotik dan abiotik dapat berkontribusi pada perkembangan penyakit *L. theobromae*. Namun ekspresi penyakit lebih sering dikaitkan dengan stres abiotik, seperti kekeringan, kerusakan fisik, genangan air, embun beku, dan lingkungan tumbuh yang tidak sesuai (Bostock et al., 2014). Salah satu stres abiotik seperti kekeringan dapat mempengaruhi interaksi antara *L. theobromae* dan inang tanamannya, termasuk interaksi antara *L. theobromae* dan kakao (Asman et al., 2024). Kondisi merugikan seperti itu yang dapat menyebabkan tanaman inang menjadi stres, yang pada akhirnya akan memberi patogen laten seperti *L. theobromae* kesempatan untuk menyebabkan penyakit (Sturrock, 2011).

Adapun beberapa cara untuk mengendalikan *L. theobromae* yaitu dengan cara penggunaan cendawan antagonis, salah satunya dengan penggunaan *Trichoderma* karena cendawan tersebut memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan cendawan patogen karena menghasilkan lipase yang dapat memecahkan senyawa kitin, glukukan, dan lemak dinding sel patogen (Susanna et al., 2018). Kemudian cara lainnya yaitu mengelola penyakit dengan memahami ekobiologi patogen, inang, dan interaksi dengan lingkungan (Febbiyanti et al., 2019).

1.3 Tujuan dan Manfaat

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui *Lasiodiplodia* spp. yang berasosiasi dengan gejala mati ranting dan mengidentifikasi patogenitas dari setiap isolat cendawan-cendawan tersebut serta mengetahui suhu yang paling baik untuk pertumbuhan miseliumnya.

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi mengenai tingkat patogenitas *Lasiodiplodia* spp. pada temperatur tertentu serta dapat mengidentifikasi tingkat keparahan gejala nekrosis, klorosis, dan dieback yang ditimbulkan pada tanaman kakao.

1.4 Hipotesis Penelitian

Untuk melihat apakah isolat cendawan *Lasiodiplodia* spp. bersifat patogenik atau tidak.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hama dan Penyakit Tumbuhan Universitas Hasanuddin, di *Greenhouse* Fakultas Pertanian dan di Kab. Wajo. Penelitian ini berlangsung selama 6 bulan, yakni pada bulan Juli 2024–Februari 2025.

2.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah ranting bergejala *Lasiodiplodia* sebagai bahan sumber pembuatan inokulum, daun muda kakao yang sehat, isolat patogen, media *Potato Dextrose Agar* (PDA), aquades, alkohol 70%, dan spirtus.

Alat yang digunakan adalah *Laminar Air Flow* (LAF), oven, *autoclave*, cawan Petri, Erlenmeyer, *cork borer*, spatula, bunsen, kertas, alat tulis, tisu, label, plastik *wrapping*, dan aluminium foil.

2.3 Metode Penelitian

Adapun metode penelitian yang dapat diuraikan sebagai berikut :

2.2.1 Pengambilan Sampel

Pohon kakao yang mengalami gejala mati ranting diidentifikasi di kebun kakao di salah satu wilayah penghasil kakao di Kabupaten Enrekang, Sulawesi Selatan. Beberapa tanaman kakao muda menunjukkan gejala mati ranting pada klon S2. Sampel jaringan batang yang terinfeksi diambil dari pohon yang menunjukkan gejala mati ranting dengan garis-garis berwarna coklat hingga gelap pada jaringan vaskular.

2.2.2 Pembuatan Media Biakan PDA

Pertama, kentang dikupas dan dipotong-potong menjadi potongan kecil. Setelah itu, direbus dengan aquades sebanyak 1100 mL hingga mendidih. Memasukkan 20 g gula dan 17 g agar, lalu saring kentang dan masukkan ke dalam Erlenmeyer hingga volume 1000 mL. Menutup rapat Erlenmeyer dengan kapas dan aluminium foil kemudian dieratkan dengan plastik *wrapping*. Selanjutnya, media disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C. Untuk mencegah kontaminasi bakteri, tambahkan antibiotik *chloramphenicol* lalu media siap dituangkan ke dalam cawan Petri.

2.2.3 Isolasi dan Perbanyak Cendawan pada Tanaman Kakao

Isolasi cendawan merupakan proses pemisahan cendawan dari habitat aslinya, yang kemudian ditumbuhkan pada media buatan untuk memperoleh kultur murni. Isolasi cendawan ini dimulai dengan mengambil ranting yang menunjukkan gejala mati ranting kemudian dibilas dengan air keran, kemudian memotong ranting menjadi bagian kecil sepanjang 2 cm. Setelah ranting dibersihkan dan dipotong menjadi kecil-kecil, selanjutnya potongan ranting tersebut dibelah dua pada jaringan vaskular. Potongan-potongan ranting yang telah dibelah dua disterilisasi permukaan menggunakan NaOCl (5%) selama 3 menit, dan dibilas dengan aquades sebanyak tiga kali. Kemudian potongan ranting tersebut diisolasikan pada media PDA untuk

memperoleh biakan murni. Setelah mendapatkan biakan murni selanjutnya melakukan perbanyakan untuk dijadikan isolat pada pengujian selanjutnya.

2.2.4 Identifikasi Morfologi

Isolat dibiakkan di PDA, dan diinkubasi pada suhu ruang. Identifikasi isolat cendawan dilakukan berdasarkan karakteristik koloni dan morfologi mikroskopis. Konidia dewasa dan muda dari isolat cendawan diamati menggunakan mikroskop cahaya dan gambar konidia diambil menggunakan mikroskop digital. Inokulum yang digunakan adalah isolat cendawan yang agresif dalam menimbulkan nekrosis pada uji daun. Cendawan diambil secara aseptis menggunakan jarum preparat dan diletakkan di atas permukaan kaca preparat untuk pengamatan mikroskopis.

2.2.5 Uji Patogenitas Cendawan pada Daun Muda Kakao

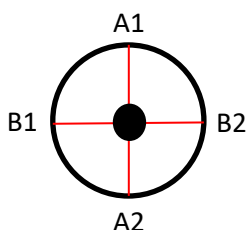
Isolat cendawan yang telah diisolasi dari ranting kakao yang memiliki gejala mati ranting diuji dengan uji daun yang dilakukan pada penelitian ini untuk mengidentifikasi isolat yang berpotensi patogenik pada kakao. Daun muda ke-3 kakao (hijau muda tetapi tidak mengeras) berdasarkan metode Bailey et al. (2005) dipanen. Kemudian daun dibilas menggunakan air keran lalu daun dipotong berbentuk lingkaran dengan diameter 27 mm dan diletakkan di atas kertas Whatman yang telah digunting berbentuk lingkaran dan telah disterilisasi menggunakan oven serta direndam aquades dalam cawan Petri. Untuk inokulasi, sebelum digunakan inokulum tersebut diremajakan selama dua sampai tiga hari dari isolat cendawan yang telah dimurnikan. Selanjutnya inokulum dicetak menggunakan *cork borer* dengan diameter 5 mm dan ditempatkan di luar bagian tengah di samping pelepah daun. Sedangkan untuk kontrol dilakukan menggunakan media PDA steril. Setelah inokulasi selesai dilakukan, cawan Petri di *wrapping* menggunakan plastik *wrapping* dan diinkubasi pada suhu ruang. Luas lesi diukur pada interval 24 jam selama 48 jam. Parameter dalam penelitian ini dapat dilihat dari perkembangan lesi pada helai daun (lamina) dan vena utama (pelepah) yang diukur secara tunggal, kemudian akan dicatat dalam bentuk persen (%). Pengujian yang dilakukan menggunakan 10 isolat cendawan dengan 4 ulangan setiap isolat.

2.2.6 Uji Suhu Isolat Cendawan pada Media PDA

Uji suhu dilakukan untuk mengamati perkembangan diameter koloni dari isolat cendawan pada berbagai suhu. Inokulum yang berusia dua sampai tiga hari setelah peremajaan dicetak dengan *cork borer*, lalu dipindahkan ke cawan baru yang berisi media PDA menggunakan spatula dan diletakkan tepat di tengah cawan Petri. Prosedur yang sama diterapkan pada isolat lainnya dengan empat ulangan untuk setiap isolat. Selanjutnya, ditempatkan dalam oven dengan suhu yang telah ditentukan yaitu 25 °C, 30 °C, 35 °C, dan 40 °C. Rentang suhu ini ditentukan berdasarkan suhu rata-rata di Kabupaten Enrekang, Sulawesi Selatan, yang merupakan suhu dari zona asal isolat diperoleh kecuali suhu 40 °C.

Parameter dalam pengujian ini yaitu dengan mengukur jari-jari koloni secara horizontal dan vertikal pada interval 24 jam sampai miselium memenuhi satu cawan Petri. Pengujian ini menggunakan 9 isolat cendawan dengan 4 ulangan. Menurut

Roberts dan Punja (2022), perkembangan diameter koloni maksimum dapat dihitung dengan rumus:



Perkembangan diameter koloni:

$$A = \frac{(A1+A2)}{2}$$

$$B = \frac{(B1+B2)}{2}$$

$$\text{Diameter koloni} = \frac{(A+B)}{2}$$

Keterangan :

A = Pertumbuhan miselium secara horizontal

B = Pertumbuhan miselium secara vertikal

2.2.7 Uji Patogenitas Cendawan pada Bibit Tanaman Kakao

Uji patogenitas jaringan batang dilakukan dengan menggunakan bibit kakao. Isolat cendawan yang dikategorikan sangat rentan pada uji daun serta beberapa isolat sebagai pembanding digunakan untuk uji patogenitas batang bibit. Benih yang digunakan dipanen dari buah kakao klon S2, kemudian dicuci, dibuang jaringan plasentanya, dan direndam dalam air kran selama \pm 3 jam. Benih kemudian dikecambahkan selama beberapa hari dengan ditutupi kapas yang telah dilembapkan. Bibit yang dihasilkan dipelihara di *greenhouse* dengan atap plastik UV dan diberi pupuk. Isolat cendawan diinokulasikan pada bibit batang bawah berumur dua bulan. Proses inkubasi buatan digunakan untuk melakukan inokulasi. Potongan cendawan sebesar 8 mm diambil dan ditempelkan pada luka bibit kakao yang telah dilukai sebelumnya, yang ukuran lukanya sama dengan potongan cendawan yang akan diinkubasikan. Selanjutnya, luka yang telah diisi dengan cendawan patogen tersebut ditutupi dengan *wrapping* untuk mencegah pengeringan dan kontaminasi. Perlakuan yang digunakan dalam pengujian ini berjumlah 4 isolat (R1(2), R1(3), R1(4), & R1(7)) dan setiap perlakuan diaplikasikan pada empat bibit secara independen. Setelah itu, pengamatan dilakukan setiap minggu untuk melihat perkembangan gejala yang ditimbulkan.

Parameter yang diamati adalah insidensi penyakit dan intensitas serangan (Ruliyanti & Majid 2020). Rumus luas serangan (I):

$$I = n/N \times 100\%$$

Keterangan:

I = Insidensi penyakit/(persentase kejadian penyakit)

n = Jumlah tanaman yang sakit

N = Jumlah semua tanaman yang diamati

2.2.8 Reisolasi

Isolasi ulang isolat yang diuji dilakukan dengan membedah lesi nekrotik dari bibit yang diinokulasi dan menempatkannya pada media PDA. Batang bibit dicuci dengan air keran, disterilisasi permukaannya menggunakan larutan NaOCl (5%) selama 3

menit, dan kemudian dibilas dengan aquades sebanyak tiga kali. Potongan batang dengan diameter 2 cm diletakkan pada media PDA yang mengandung *chlorampenicol* dan diinkubasi pada suhu ruangan. Cendawan diidentifikasi hanya melalui penilaian visual terhadap koloni yang muncul.

2.2.9 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan analisis ragam ANOVA dengan tingkat kesalahan 5%, disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL), dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dan dianalisis dengan IBM SPSS versi 21.0. Rancangan ini melibatkan tujuh perlakuan. Setiap kombinasi perlakuan diulang empat kali.