

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kakao (*Theobromae cacao* L.) merupakan salah satu komoditas penting di Indonesia dalam hal perekonomian. Hal ini karena kakao adalah salah satu penyumbang devisa terbesar negara di bidang perkebunan setelah kelapa sawit dan karet (Putro et al., 2023). Selain itu, kakao juga merupakan sumber pendapatan petani serta penyedia lapangan pekerjaan. Pada komoditas kakao, biji merupakan produk utamanya yang dapat diolah menjadi berbagai makanan dan minuman. Kakao sendiri merupakan tanaman yang diminati oleh banyak orang, baik dalam maupun luar negeri. Selain itu, karena memiliki banyak peminat, banyak perusahaan yang mengolah produk berbahan dasar cokelat sehingga kakao dapat dikatakan sebagai komoditas yang dapat bersaing khususnya di dunia bisnis (Alim dan Lestari, 2020). Kakao diketahui mengalami perkembangan yang dapat dilihat dari perannya terhadap negara sebagai komoditas ekspor maupun dari segi luas arealnya (Aulia et al., 2018).

Pada tanaman kakao terdapat beberapa penyakit, yaitu penyakit pembuluh *Vascular Streak Dieback* (VSD) yang disebabkan oleh cendawan *Ceratobasidium theobromae* (McMahon dan Purwantara 2016), penyakit antraknosa buah yang disebabkan oleh cendawan *Colletotrichum gloesporioides*, penyakit busuk buah beku yang disebabkan oleh cendawan *Moniliophthora roreri*, dan penyakit busuk buah kakao yang dapat disebabkan oleh *Phytophthora palmivora* dan cendawan *Lasiodiplodia theobromae*. Penyakit-penyakit tersebut termasuk penyakit paling merugikan bagi pertanaman kakao karena terdapat hampir di seluruh areal pertanaman kakao, di mana dapat menurunkan produksi kakao hingga 50% (Manurung et al., 2022).

Saat ini pada perkebunan kakao, cendawan *L. theobromae* sedang menjadi ancaman baru di Indonesia, khususnya pada kakao di Sulawesi (Asman et al., 2020). Hal ini karena patogen ini diketahui dapat menyebabkan penyakit pada tanaman (Puig et al., 2021), seperti busuk batang, busuk pucuk, busuk buah, dan hawar daun yang menyebabkan patogen ini dianggap penting dan unik (Adu-Acheampong et al., 2012). Dampak yang disebabkan oleh cendawan ini diketahui semakin lama semakin meningkat yang dinilai berhubungan dengan tekanan abiotik maupun biotik yang diterima oleh tanaman (Atkinson dan Uwin, 2012). Selain itu, cendawan ini juga dapat menyebabkan kehilangan hasil yang cukup besar hingga kematian karena dapat membunuh jaringan yang berada di organ vital kakao, buah, dan bahkan batangnya (Huda-Shakirah et al., 2022). Perkembangan penyakit terkait cendawan ini pun sudah tampak mengkhawatirkan, di mana hal ini dibuktikan dengan pemantauan yang dilakukan di salah satu perkebunan kakao di Luwu Timur, Sulawesi Selatan, terhadap penyakit busuk buah kakao oleh *L. theobromae* yang mana tingkat insiden penyakitnya telah mencapai 30% pada bulan Agustus 2019. Hal ini juga didukung oleh pemantauan lain yang

dilakukan pada tahun 2022 dan 2023 di daerah kakao lainnya seperti Soppeng, Pinrang, dan Enrekang (Asman et al., 2024).

Terkait dengan permasalahan di atas, maka penelitian mengenai pengendalian terhadap penyakit pada tanaman kakao, khususnya *L. theobromae* terus dilakukan, mulai dari pengaplikasian fungisida, hingga penggunaan agens pengendali hayati. Hingga saat ini, telah banyak penelitian yang dilakukan mengenai agens pengendali hayati sebagai solusi pengendalian cendawan patogen, khususnya *L. theobromae*. Salah satu contohnya cendawan yang berasosiasi dengan tanaman kakao. Menurut Asman et al (2020) cendawan yang berasosiasi dengan tanaman, khususnya pada kakao dapat meningkatkan kesehatan tanaman terhadap serangan penyakit yang menginfeksi.

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka penelitian ini akan menguji agresifitas dan antagonistik beberapa cendawan yang berasosiasi dengan kakao sehat terhadap cendawan *L. theobromae*.

1.2 Landasan Teori

1.2.1 Kakao (*Theobromae cacao* L.)

Tanaman kakao berasal dari Amerika Selatan, tepatnya di Amazon (Bartley, 2005). Kakao telah dikenal sejak abad ke-15 di Indonesia, di mana tanaman ini dibawa masuk dan diperkenalkan oleh orang-orang Spanyol, tepatnya di Minahasa, Sulawesi Utara (Wijaya et al., 2024). Berdasarkan data International Cocoa Organization (ICCO), Indonesia berada di peringkat ketiga sebagai produsen terbesar kakao dunia dengan memproduksi sekitar 15% (ICCO, 2020). Pada 2021/2022, produksi kakao Indonesia turun, sehingga Indonesia berada di peringkat ketujuh sebagai produsen kakao terbesar di dunia (BPS, 2023). Kakao merupakan bahan baku utama dalam pembuatan cokelat (Aprotosoai, 2016). Meskipun begitu, kakao tidak hanya dapat dimanfaatkan menjadi cokelat saja, tetapi kakao dapat juga diolah menjadi produk sampingan lainnya seperti mentega, susu, biskuit, dan lain sebagainya (Oddoye et al., 2013).

Tanaman yang dibudidayakan untuk diambil bijinya (N'zi et al., 2023) ini merupakan salah satu tanaman perkebunan yang mempunyai prospek pasar yang lebih baik dibanding tanaman perkebunan lainnya (Sugiharti, 2023). Hal ini karena komoditas ini telah memberikan pemasukan sebagai devisa negara pada tahun 2010 sebesar 1,6 Miliar (BPS, 2018). Selain itu, kakao juga memiliki peran penting dalam perekonomian Indonesia karena berpeluang dan cukup diperhitungkan dalam pasar global sebagai produsen kakao utama dunia (Saputra et al., 2024). Hal ini dapat dilihat dari produksi biji kakao pada tahun 2022 yang mencapai 650.612 ton (BPS, 2023).

Adapun klasifikasi tanaman kakao menurut United States Department of Agriculture (USDA) Plants adalah sebagai berikut.

Divisi : Spermatophyta
Kelas : Dicotyledoneae
Ordo : Malvales

Famili : Sterculiaceae

Genus : *Theobroma*

Spesies : *Theobroma cacao* L.

Kakao sendiri secara garis besar terbagi menjadi dua bagian yaitu bagian generatif dan vegetatif. Bagian generatif sendiri meliputi atas buah, biji, dan bunga, sedangkan bagian vegetatif meliputi atas batang, daun, dan akar (Mantep, 2018). Tanaman ini memiliki syarat tumbuh untuk dapat tumbuh dengan baik, yaitu memerlukan sistem drainase yang baik serta tanah dengan kondisi yang gembur. Selain itu, kakao dapat tumbuh dengan baik pada suhu 25–27 °C, pH 6–7, dan ketinggian 0–600 meter di atas permukaan laut (Ilham et al., 2018).

Perbanyakan kakao dapat dilakukan secara generatif dan vegetatif. Perbanyakan kakao secara generatif dilakukan dengan cara perbanyakan bibit dengan terlebih dahulu benih dikecambahkan lalu selanjutnya benih yang telah tumbuh tadi dibibitkan selama enam bulan untuk selanjutnya dapat ditanam di lapangan. Sedangkan perbanyakan kakao secara vegetatif dapat dilakukan dengan cara sambung pucuk, sambung samping, okulasi, dan stek. Perbanyakan secara vegetatif ini sering juga disebut sebagai klonalisasi. Hal ini karena perbanyakan ini dilakukan dengan menggunakan entres sebagai bahan tanam klonal yang berasal dari klon unggul (Limbongan dan Djufry, 2013).

Saat ini, untuk tanaman kakao terdapat beberapa klon unggul yang sedang banyak dikembangkan, yaitu klon MCC 01, MCC 02, Sulawesi 01, dan Sulawesi 02 (Mutmainnah et al., 2022). Klon memiliki peran yang penting dalam budidaya kakao (Widiyani et al., 2022) karena merupakan bahan tanam yang diperbanyak secara vegetatif (Koryati, 2022). Untuk klon MCC 01 dan MCC 02 merupakan klon yang memiliki produktivitas yang tinggi karena dapat menghasilkan sebanyak 3,672 dan 3,132 ton/ha secara berurutan. Klon ini diketahui tahan terhadap penyakit busuk buah dan VSD. Selain tahan terhadap kedua penyakit tersebut, klon ini juga diketahui tahan terhadap hama penggerek buah kakao (PBK). Sedangkan untuk klon Sulawesi 01 dan Sulawesi 02 potensi produktivitas yang dihasilkan oleh kedua klon ini adalah 1,8–2,5 dan 1,8–2,75 secara berurutan. Klon ini juga diketahui tahan terhadap penyakit VSD (Susilo et al., 2015).

1.2.2 Cendawan *Lasiodiplodia theobromae*

Cendawan *L. theobromae* merupakan cendawan yang memiliki nilai ekonomi yang penting di dunia karena dapat menyebabkan kerusakan yang parah pada tanaman (Salvatore et al., 2020) dan kematian tanaman karena dianggap sebagai patogen berbahaya (Dwiastuti dan Aji, 2021). Cendawan ini, diketahui dapat menyebabkan beberapa penyakit pada tanaman kakao seperti penyakit mati ranting, mati pucuk, kanker batang, dan busuk buah (Asman et al., 2020).

Adapun klasifikasi dari cendawan *L. theobromae* merujuk dari informasi di NCBI adalah sebagai berikut.

Kingdom : Fungi

Divisi : Ascomycota

Kelas : Dothideomycetes

Ordo : Botryosphaerales
Famili : Botryosphaeriaceae
Genus : *Lasiodiplodia*
Spesies : *Lasiodiplodia theobromae*

Cendawan ini tersebar dengan luas terkhusus pada daerah tropis dan subtropis (Rodríguez-Galvez et al., 2017). Saat ini, diketahui bahwa *L. theobromae* memiliki inang dengan kisaran lebih dari 500 spesies (Farr dan Rossman, 2021), di mana hal ini tentunya sangat berpengaruh terhadap penyebarannya sehingga cendawan ini dianggap penting dan berbahaya bagi pertanian kakao. *L. theobromae* sendiri diperkenalkan pertama kali di Kamerun sebagai penyebab penyakit busuk buah kakao pada tahun 1895 (Mbenoun, 2008) hingga akhirnya menyebar dengan luas seperti saat ini.

L. theobromae pada umumnya merupakan patogen laten, di mana biasanya cendawan ini ditemukan pada jaringan tanaman yang sehat sebagai endofit (Asman, 2018). Akan tetapi, *L. theobromae* akan menjadi patogen virulen ketika menginfeksi dalam keadaan rentan dan stres atau tertekan oleh faktor abiotik dan biotik lainnya (Pereira et al., 2006). Stres abiotik juga diketahui dapat memengaruhi interaksi antara cendawan *L. theobromae* yang berperan sebagai patogen dengan tanaman inangnya sehingga dapat menimbulkan penyakit (Sturrock, 2011), salah satunya adalah faktor kekeringan (Asman et al., 2024). Didasari hal tersebutlah, saat ini *L. theobromae* telah menjadi ancaman yang penting bagi budidaya tanaman kakao (Ali et al., 2019). *L. theobromae* adalah nama lain dari *Botryodiplodia theobromae* yang merupakan fase reproduksi aseksual (anamorph) cendawan ini. Selain itu, *L. theobromae* juga memiliki fase reproduksi seksual (telomorph), yaitu *Botryosphaeria rhodina* (Pavlic, 2004).

Cendawan *L. theobromae* diketahui dapat menyerang inangnya melalui luka maupun jaringan nekrotik (Picos-Muñoz et al., 2015). Gejala yang dapat dilihat di lapangan akibat serangan patogen ini adalah serangan pada ranting muda (Burgess et al., 2006) yang menyebabkan ranting muda tersebut mati tanpa memengaruhi cabang utama (Moreira-Morrillo et al., 2021). Selain kematian ranting muda, gejala lain yang dapat dilihat adalah pembusukan dan mumifikasi buah kakao (Valarmathi dan Ladhakshmi, 2018), di mana buah yang terserang oleh cendawan ini akan menunjukkan keberadaan miselium yang menyelimuti biji kakao berwarna kehitaman (Moreira-Morrillo et al., 2021).

L. theobromae, pada kondisi laboratorium memiliki ciri makroskopis berupa miselium yang pada awalnya berwarna putih lalu kemudian berubah warna menjadi abu gelap hingga akhirnya berubah warna lagi menjadi kehitaman (Moreira-Morrillo et al., 2021). Sedangkan secara mikroskopis cendawan *L. theobromae* memiliki hifa yang terpisah sepenuhnya dan membentuk konidiofor yang sederhana dan pendek. Konidiofor tadi kemudian menghasilkan konidia. Cendawan ini memiliki konidia hialin yang oval, berdinding sel tebal, dan bersekat pada saat belum matang (Norhayati et al., 2016). Sedangkan pada kondisi matang, konidia *L. theobromae* berdinding sel tipis, bersepta, dan memiliki warna cokelat tua (Hendra et al., 2019) *L. theobromae* diketahui dapat tumbuh dengan optimal pada suhu 29–30 °C (Pitt et

al., 2013) dengan kelembapan yang tinggi di tanah yang liat atau kedap air (Rodrigues, 2003). Cendawan ini dapat bertahan hidup pada sisa-sisa tanaman dan tanah (Michereff et al., 2005). Penyebaran spora dari cendawan ini dapat disebarkan melalui angin dan hujan (Vásquez-López et al., 2009), alat pertanian serta serangga (Ploetz, 2003).

1.2.3 Cendawan Antagonis

Dalam hal pengendalian cendawan patogen penyebab penyakit pada tanaman, ada banyak hal yang dapat dilakukan untuk mencegah dan mengendalikannya. Salah satu strategi pengendalian yang saat ini sedang banyak dikembangkan dalam pengendalian penyakit adalah pengendalian secara biologi. Pengendalian secara biologi ini merupakan pengendalian dengan memanfaatkan potensi dari mikroorganisme yang dijadikan sebagai agens pengendali hayati pada cendawan patogen penyakit tanaman (Sutarini et al., 2015).

Pemanfaatan agens hayati dilakukan untuk mengurangi dampak terhadap residu pestisida kimiawi. Agens hayati yang sering dikembangkan salah satunya adalah mikroba alami di mana dalam ruang dan nutrisi dapat berkompetisi dan menghambat pertumbuhan patogen yang menjadi sasaran, baik yang hidup sebagai endofit maupun saprofit dalam tanah, air, maupun bahan organik (Supriadi, 2006). Selain itu, pengendalian dengan cara ini dinilai lebih aman karena tidak mencemari lingkungan (Agustina et al., 2019). Agens hayati biasanya memiliki hubungan timbal balik berupa simbiosis mutualisme dengan inangannya, di mana inangannya memberikan tempat tinggal dan nutrisi sedangkan agens hayati memberikan perlindungan, baik itu dari faktor biotik maupun abiotik (Silva-Valenzuela et al., 2023). Di antara banyaknya mikroba alami yang ada tanah salah satunya adalah cendawan, di mana cendawan pada tanah ini dapat bertahan sebagai saprofit dalam bentuk spora atau sclerotium pada bahan-bahan organik yang sudah lapuk (Tambingsila, 2016).

Terdapat beberapa contoh cendawan tanah yang telah diteliti dapat dimanfaatkan sebagai antagonis, yaitu *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp., dan *Gliocladium* spp. yang telah dilaporkan sebagai cendawan yang bersifat antagonis terhadap patogen penyebab penyakit tanaman yang terdapat pada permukaan inang maupun patogen yang ada pada tanah (Nurhayati, 2011). Pada penelitian lainnya, *Trichoderma* sp. dan *Paecilomyces* sp. juga diketahui dapat mengendalikan *Phytophthora* spp., penyebab penyakit busuk buah kakao, di mana hasil yang didapatkan adalah tingkat kerusakan dan intensitas penyakit busuk buah kakao didapati lebih rendah setelah pengaplikasian kedua cendawan tersebut sehingga dapat mempertahankan nilai produksi biji kakao (Ridwan, 2019). Selain itu terdapat penelitian mengenai penggunaan beberapa cendawan yang berasosiasi dengan cabang sehat dari klon tahan VSD yang diketahui mampu mencegah patogen *Ceratobasidium theobromae*, penyebab penyakit VSD, menembus daun muda dan memperlambat perkembangan patogen setelah pengaplikasiannya (Asman et al., 2018).

Pada uji antagonistik, terdiri atas beberapa mekanisme, yaitu parasitisme (mikroparasit), antibiosis, dan kompetisi (Alfizar et al., 2013). Antagonistik cendawan melalui mekanisme parasitisme dilakukan dengan cara menembus dan masuk ke dalam sel kemudian mengambil zat-zat makanan dengan cara memarasiti miselium jamur patogen yang akan menyebabkan kematian pada jamur patogen. Adapun antagonistik cendawan melalui mekanisme antibiosis adalah dengan mengeluarkan enzim atau metabolit sekunder yang akan merusak, menghancurkan, dan melisis dinding sel cendawan patogen. Sedangkan untuk mekanisme kompetisi adalah kemampuan cendawan anatagonis untuk bersaing dalam hal ruang dan nutrisi dengan cendawan patogen sehingga akan menghambat pertumbuhan cendawan tersebut (Kuswinanti et al., 2019).

1.3 Tujuan dan Kegunaan Penelitian

Tujuan penelitian ini, yaitu untuk mengetahui patogenisitas dan kemampuan antagonistik beberapa cendawan yang berasosiasi dengan kakao sehat terhadap cendawan *L. theobromae*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai patogenisitas dan kemampuan cendawan yang berasosiasi dengan kakao sehat terhadap cendawan *L. theobromae* sehingga dapat lebih dikaji sebagai alternatif pengendali cendawan *L. theobromae* pada kakao.

1.4 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah diduga terdapat salah satu atau lebih dari beberapa cendawan yang berasosiasi dengan kakao sehat yang memiliki kemampuan antagonistik yang lebih baik dalam mengendalikan cendawan *L. theobromae*.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tanaman, Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin, Makassar. Penelitian ini akan dilakukan mulai dari bulan Agustus 2024 hingga Januari 2025.

2.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada riset ini berupa autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF), cawan Petri, Erlenmeyer, spatula, Bunsen, korek api, *cork borer*, oven, timbangan analitik, hot plate, panci, pisau, dan pengaduk.

Bahan yang digunakan adalah kentang, gula, agar, 11 isolat cendawan yang berasosiasi dengan kakao, isolate cendawan *Lasiodiplodia theobromae*, isolat *Phytophthora palmivora*, kentang, aquades, alcohol 70%, plastik wrap, aluminium foil, kertas saring, spirtus, chloramphenicol, alat tulis, dan label.

2.3. Prosedur Penelitian

2.3.1 Pembuatan Media Tumbuh Cendawan

Dalam penelitian ini, media yang digunakan yaitu media *Potato Dextrose Agar* (PDA). PDA dibuat menggunakan kentang sebanyak 200 g yang dipotong dadu kemudian direbus menggunakan aquades sebanyak 1000 mL hingga mendidih. Setelah mendidih kentang disaring dan diambil air rebusannya kemudian dilarutkan kembali menggunakan aquades sehingga menghasilkan larutan sebanyak 1000 mL pada Erlenmeyer yang telah ditambahkan gula sebanyak 20 g dan agar 17 g. Kemudian media PDA disterilisasi menggunakan autoklaf. Media PDA yang telah disterilisasi tadi kemudian ditambahkan chloramphenicol untuk mencegah terjadinya kontaminasi oleh bakteri dan siap dilakukan penuangan di dalam LAF.

2.3.2 Perbanyak Isolat Cendawan yang berasosiasi dengan Kakao Sehat

Perbanyak isolat cendawan yang berasosiasi dengan kakao sehat dilakukan menggunakan isolat yang berasal dari koleksi Laboratorium Penyakit Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin. Isolat-isolat tersebut berasal dari kakao sehat yang diisolasi dari berbagai klon kakao yang berbeda-beda, hasil penelitian dari Anugrah (2023), Chatimah (2023), Ramadhani (2023), dan Ersya (2024). Isolat cendawan yang berasosiasi dengan kakao tadi diperbanyak pada media PDA yang diambil menggunakan jarum preparat dan diinokulasikan tepat di bagian tengah media. Pertumbuhan isolat ditunggu sekitar tujuh hari hingga isolat memenuhi cawan Petri.

2.3.3 Perbanyak Isolat *Lasiodiplodia theobromae*

Isolat cendawan *L. theobromae* diperoleh dari koleksi Laboratorium Penyakit Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin, yang telah diidentifikasi baik secara morfologi maupun molekuler. Isolat yang telah diperoleh tadi kemudian diperbanyak dengan cara melubangi isolat *L. theobromae* menggunakan *cork borer* kemudian diambil dan dipindahkan pada cawan Petri baru yang telah berisi media

PDA dengan posisi miseliumnya menghadap ke bawah menggunakan spatula. Isolat *L. theobromae* yang telah diperbanyak tadi akan digunakan dalam pengujian.

2.3.4 Identifikasi Karakteristik Morfologi 11 Isolat Cendawan yang Berasosiasi dengan Kakao Sehat

Identifikasi 11 isolat cendawan asosiasi dilakukan secara makroskopis dengan melihat bentuk dan pertumbuhan koloni isolat cendawan serta karakteristik secara mikroskopis dari isolat cendawan tersebut. Isolat yang akan diidentifikasi berasal dari koleksi Laboratorium Penyakit Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin, dari penelitian terdahulu yang diisolasi dari ranting tanaman kakao sehat. Identifikasi isolat cendawan ini menggunakan mikroskop *compound* dengan cara mengambil bagian dari isolat cendawan yang telah diremajakan menggunakan jarum preparat secara aseptis lalu diletakkan diatas kaca preparat yang sebelumnya telah ditetesi dengan aquades dan kemudian di tutup dengan *deglass*. Setelahnya dilakukan pengamatan terhadap isolat cendawan tersebut di bawah mikroskop *compound* dan pengambilan gambar menggunakan mikroskop digital. Identifikasi dilakukan dengan mengacu dari literatur penelitian-penelitian sebelumnya dan buku identifikasi berjudul *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species* edisi kedua oleh Tsuneo Watanabe (2002).

2.3.5 Uji Daun Cendawan yang berasosiasi dengan Kakao Sehat pada Daun Kakao Muda

Uji ini untuk mengetahui potensi cendawan yang digunakan dalam menyebabkan gejala penyakit. Uji ini dilakukan dengan menggunakan daun kakao klon Sulawesi 02 yang berasal dari kabupaten Enrekang. Berdasarkan metode Bailey et al. (2005), daun yang digunakan pada pengujian ini adalah daun muda kakao ketiga, di mana daun tersebut masih berwarna hijau muda dan belum mengeras. Daun kakao tersebut kemudian dicuci hingga bersih lalu selanjutnya dicetak berbentuk lingkaran dengan diameter 27 mm menggunakan cetakan yang sudah tersedia. Kertas saring diambil dan dicetak berbentuk lingkaran dengan cetakan yang sudah tersedia. Kertas saring yang telah dicetak kemudian disterilisasi menggunakan oven kemudian direndam dalam aquades yang diletakkan di cawan Petri. Selanjutnya disiapkan isolat cendawan yang telah diremajakan sebelumnya. Kertas saring yang telah direndam tadi kemudian diletakkan di cawan Petri plastik pada bagian tengah lalu ditimpa kembali dengan daun muda kakao yang telah dicetak tadi pada bagian atasnya dengan tulang daun yang menghadap ke atas. Isolat yang sudah diremajakan tadi kemudian dilubangi menggunakan *cork borer* dengan diameter 5 mm.

Hasil isolat yang telah dilubangi tadi diambil dan diangkat dengan spatula lalu diletakkan di atas daun pada bagian ujung kanan atas daun, di mana pada bagian yang ditumbuhi miselium menghadap ke bawah bersentuhan dengan daun. Setelahnya cawan Petri di *wrapping* dan diberi label. Pengamatan terhadap uji patogenisitas ini dilakukan dengan melihat gejala nekrosis pada lamina dan pertulangan daun yang diakibatkan oleh cendawan tersebut selama tiga hari pengamatan. Uji ini dilakukan untuk melihat apakah cendawan tersebut dapat

menginfeksi daun serta menimbulkan gejala nekrotik pada daun sehingga dapat berpotensi menjadi patogen pada tanaman. Pengujian ini dilakukan pada 11 isolat cendawan yang berasosiasi dengan kakao dengan menggunakan ulangan sebanyak lima kali ditambah dengan kontrol menggunakan media PDA saja serta menggunakan isolat cendawan *L. theobromae* dan *Phytophthora palmivora* untuk menjadi pembanding sehingga terdapat 14 perlakuan dengan kode sebagai berikut.

- P0 : Kontrol media PDA
- P1 : Isolat MCC02(1)
- P2 : Isolat MCC02(3)
- P3 : Isolat THR1
- P4 : Isolat AP3
- P5 : Isolat AP7
- P6 : Isolat P202
- P7 : Isolat N.M0401A
- P8 : Isolat N.M05045
- P9 : Isolat N.5101
- P10 : Isolat *L. theobromae*(7)
- P11 : Isolat UA
- P12 : Isolat *Phytophthora palmivora* (PPR)
- P13 : Isolat *Lasiodiplodia theobromae* (LT)

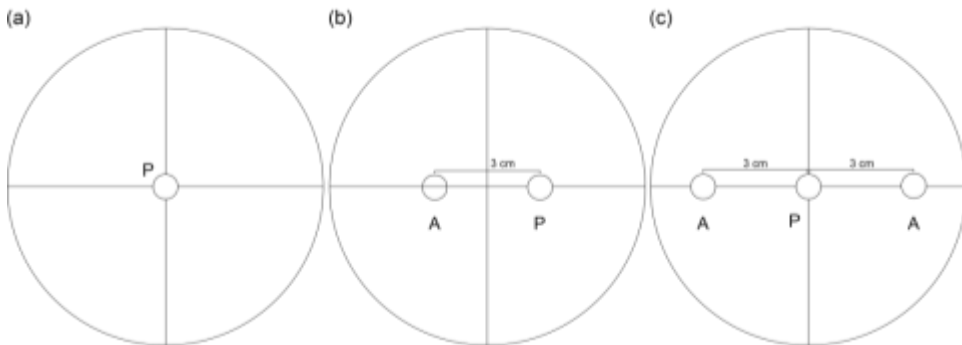
2.3.6 Uji Antagonis Isolat Cendawan yang Berasosiasi dengan Kakao Sehat Terhadap *Lasiodiplodia theobromae*

a. Dual Culture

Uji antagonis dilakukan dengan metode *dual culture* pada cawan Petri yaitu dengan menempatkan isolat cendawan yang berasosiasi dengan kakao dan isolat *L. theobromae* pada satu cawan Petri berisi media PDA. Isolat cendawan yang berasosiasi diambil dengan spatula kemudian diletakkan pada cawan Petri berisi media PDA, begitu pula dengan isolat cendawan *L. theobromae* yang diletakkan pada garis diameter yang sama, kedua isolat tersebut diletakkan pada cawan Petri berisi PDA dengan jarak antara keduanya 3 cm. Setiap isolat yang diujikan dilakukan pengulangan sebanyak lima kali ditambah dengan kontrol menggunakan cawan Petri berisi cendawan *L. theobromae* yang kemudian diinkubasi pada suhu ruang. Pengamatan pertumbuhan diameter koloni cendawan dilakukan hingga kontrol perlakuan penuh.

b. *Multiple culture*

Uji antagonis dilakukan dengan metode *multiple culture* pada cawan Petri yaitu dengan menempatkan isolat cendawan yang berasosiasi dengan kakao dan isolat *L. theobromae* pada satu cawan Petri berisi media PDA. Pada *multiple culture* isolat *L. theobromae* diletakkan di tengah cawan Petri sedangkan pada sisi kanan dan kiri dari *L. theobromae* diletakkan isolate cendawan asosiasi yang sama dengan jarak masing masing 3 cm. Setiap isolat yang diujikan dilakukan pengulangan sebanyak lima kali ditambah dengan kontrol menggunakan cawan Petri berisi cendawan *L. theobromae* yang kemudian diinkubasi pada suhu ruang. Pengamatan pertumbuhan diameter koloni cendawan dilakukan hingga kontrol perlakuan penuh.



Gambar 1. Layout uji antagonistik Isolat Cendawan yang Berasosiasi dengan Kakao Sehat Terhadap *L. theobromae*: (a) kontrol perlakuan, (b) *Dual Culture* (c) *Multiple Culture*

Keterangan :

P : Patogen

A : Antagonis

Pengujian ini dilakukan masing-masing pada 11 isolat cendawan asosiasi dengan menggunakan ulangan sebanyak lima kali ditambah dengan pengujian terhadap *Phytophthora palmivora* dengan cendawan *L. theobromae* dan salah satu cendawan asosiasi yang unggul serta kontrol masing-masing menggunakan cendawan *L. theobromae* dan *Phytophthora palmivora* untuk menjadi pembanding sehingga terdapat 15 perlakuan dengan kode sebagai berikut.

P1 : Isolat THR1

P2 : Isolat AP7

P3 : Isolat P202

P4 : Isolat N.M0401A

P5 : Isolat N.5101

P6 : Isolat UA

- P7 : Isolat AP3
- P8 : Isolat MCC02(1)
- P9 : Isolat *L. theobromae*(7)
- P10 : Isolat MCC02(3)
- P11 : Isolat N.M05045
- P12 : Isolat PPR vs LT
- P13 : Isolat PPR vs THR1
- P14 : Kontrol *Lasiodiplodia theobromae* (LT)
- P15 : Kontrol *Phytophthora palmivora* (PPR)

2.3.7 Uji Buah Isolat Cendawan yang berasosiasi dengan Kakao Sehat Terhadap *Lasiodiplodia theobromae*

Uji ini dilakukan dengan metode *Detached pod* menggunakan buah kakao pada beberapa isolat cendawan yang berasosiasi yang diketahui unggul dari pengujian di laboratorium sebelumnya. Buah yang digunakan pada pengujian ini adalah buah kakao klon Sulawesi 02 yang sebelumnya telah dibersihkan dari kotoran dan fungusida yang menempel di sekitar buah. Kemudian buah kakao yang telah dibersihkan tadi dikeringkan untuk selanjutnya dilakukan pengujian.

Berdasarkan metode Puig et al. (2021), pengujian ini dilakukan dengan terlebih dahulu membersihkan buah dengan menyemprotkan alkohol 70% pada bagian buah yang akan dilubangi lalu melubangi buah kakao menggunakan *cork borer* yang telah disterilisasi pijar sebelumnya pada bagian tengah dari buah tersebut. Kemudian bagian buah yang telah dilubangi tadi diambil dan dibersihkan menggunakan spatula yang juga telah disterilisasi sebelumnya. Selanjutnya isolat cendawan *L. theobromae* dilubangi pula dengan *cork borer* yang telah di sterilisasi pijar sebelumnya lalu isolat tadi diambil menggunakan spatula untuk kemudian diinokulasikan pada buah kakao yang telah dilubangi sebelumnya tadi dengan posisi bagian miseliumnya menghadap ke arah bawah yaitu buah pengujian yang digunakan. Buah kakao yang telah diinokulasikan cendawan *L. theobromae* direkatkan menggunakan plastik *wrap* dan diinkubasi selama 96 jam. Pengamatan dan pengambilan data dilakukan empat hari setelah cendawan *L. theobromae* diinokulasikan pada buah. Pada hari yang sama, setelah dilakukan pengamatan terhadap buah tadi kembali dilakukan inokulasi pada buah kakao di bagian yang sama dengan menggunakan isolat cendawan yang berasosiasi dengan kakao sehat setelah sebelumnya membersihkan sisa cendawan *L. theobromae* yang masih menempel pada buah. Selanjutnya buah yang telah diinokulasikan isolat cendawan yang berasosiasi dengan kakao sehat tadi, kembali direkatkan menggunakan plastik *wrap* dan diinkubasi selama 24 jam. Pengamatan dan pengambilan data kembali dilakukan pada hari kelima dan dilanjutkan setiap hari hingga hari ketujuh. Pengujian ini dilakukan sebanyak empat ulangan dengan menggunakan enam isolat cendawan asosiasi yang diketahui unggul ditambah

perlakuan cendawan *L. theobromae* dengan *P. palmivora* sebagai pembanding serta tiga kontrol menggunakan cendawan *L. theobromae*, *P. palmivora*, dan media PDA sehingga terdapat 10 perlakuan dengan kode sebagai berikut.

- P1 : Isolat *L. theobromae* vs THR1
- P2 : Isolat *L. theobromae* vs AP3
- P3 : Isolat *L. theobromae* vs UA
- P4 : Isolat *L. theobromae* vs *L. theobromae*(7)
- P5 : Isolat *L. theobromae* vs P202
- P6 : Isolat *L. theobromae* vs AP7
- P7 : Isolat *L. theobromae* vs *P. palmivora*
- P8 : Kontrol *P. palmivora*
- P9 : Kontrol PDA
- P10 : Kontrol *L. theobromae*

2.3.8 Reisolasi

Tahapan akhir dari metode penelitian ini adalah reisolasi cendawan yang sebelumnya telah diinokulasikan pada bibit kakao untuk ditumbuhkan kembali pada media PDA. Tahapan ini dilakukan dengan mengisolasi bagian batang yang telah diinokulasi sebelumnya pada uji bibit dan kemudian dicuci terlebih dahulu hingga bersih. Batang yang telah bersih tadi kemudian dipotong dengan ukuran ± 2 cm lalu dilakukan sterilisasi permukaan dengan menggunakan larutan NaOCl (5%) sekali selama 3 menit dan aquades untuk membilas dan membersihkan batang tadi sebanyak tiga kali. Setelah dilakukan sterilisasi permukaan, batang tadi kemudian diletakkan di atas media PDA menggunakan pinset untuk kemudian ditumbuhkan. Batang kakao yang telah ditumbuhkan tadi kemudian diamati pertumbuhannya dan diidentifikasi melalui koloni yang tumbuh secara makroskopis. Hal ini dilakukan untuk melihat apakah hasil dari uji lapangan terhadap cendawan yang berasosiasi dengan kakao sehat terhadap *L. theobromae* sesuai dengan gejala yang diperlihatkan oleh tanaman atau tidak.

2.4 Parameter Pengamatan

2.4.1 Perkembangan Nekrosis

Parameter pengamatan ini dilakukan sebagai parameter dari uji daun terhadap isolat cendawan yang berasosiasi dengan kakao sehat dan bertujuan melihat apakah isolat cendawan yang berasosiasi dengan kakao sehat ini mampu menyebabkan gejala nekrotik pada daun kakao atau tidak. Pengamatan ini dilakukan dengan melihat perkembangan nekrotik yang dihasilkan cendawan pada daun kemudian dituliskan dalam bentuk persentase.

2.4.2 Diameter koloni dan gejala

Parameter pengamatan ini dilakukan sebagai parameter dari uji antagonis dan uji buah isolat cendawan yang berasosiasi dengan kakao sehat terhadap cendawan *L. theobromae*. Parameter pengamatan ini dilakukan dengan mengamati dan mengukur perkembangan miselium dari masing-masing cendawan yang sedang diuji pada media PDA serta perkembangan luas gejala nekrosis pada masing-masing buah uji dengan mengukur pertumbuhan koloninya di bagian atas, bawah, kanan, dan kiri. Hasil pengukuran terhadap perkembangan koloni uji antagonis dan uji buah tadi kemudian dimasukkan ke dalam rumus. Pengumpulan data akan dilakukan dengan menggunakan rumus perhitungan diameter koloni cendawan sebagai berikut (Lestari et al., 2022).

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

Keterangan :

D : Rata-rata diameter koloni jamur

d1 : Panjang diameter koloni secara vertikal

d2 : Panjang diameter koloni secara horizontal

2.5 Analisis Data

Analisis data menggunakan sidik ragam Anova dengan taraf kesalahan 5% dan disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT). Hasil penelitian ini dianalisis dengan perangkat lunak Microsoft Excel dan IBM SPSS versi 21.0.