

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Komoditas perkebunan merupakan salah satu komoditas yang menyumbang pendapatan nasional di Indonesia sehingga perkebunan menjadi salah satu komoditas penting. Pada tahun 2022 kontribusi yang dihasilkan dari komoditas ini mencapai 3,76 persen terhadap total PDB dan 30,30 persen terhadap sektor pertanian, kehutanan, dan perikanan atau merupakan urutan pertama pada sektor ini. Kontribusi perkebunan terhadap perekonomian semakin meningkat sehingga menjadi salah satu prioritas pemerintah untuk meningkatkan ekspor produk pertanian. Sektor perkebunan merupakan unsur dalam perkembangan ekonomi nasional keuntungan yang didapatkan mampu membantu penghasilan devisa negara. Salah satu tanaman perkebunan yang ada di Indonesia yaitu *Theobroma cacao* atau biasa dikenal dengan tanaman kakao. Kakao merupakan tanaman perkebunan yang sangat berharga dan memiliki banyak manfaat selain itu tanaman yang memiliki nilai ekspor yang cukup penting sebagai penghasil devisa negara. Permintaan kakao terus meningkat sehingga mendorong petani untuk meningkatkan produksi tetapi tidak menyampingkan kualitas hasil panen namun seiring berjalannya waktu produksi kakao di Indonesia mengalami penurunan yang disebabkan karena beberapa faktor. Indonesia masuk dalam negara sebagai produsen kakao terbesar di dunia dan menduduki posisi ketujuh (Badan Pusat Statistik, 2022).

Kakao merupakan tanaman tahunan yang membutuhkan waktu sekitar 4 tahun untuk menghasilkan buah pertamanya. Dengan perawatan yang tepat, masa produktif tanaman kakao bisa mencapai lebih dari 25 tahun lamanya. Kakao merupakan tanaman berkeping dua atau tanaman dikotil yang memiliki organ vegetatif lengkap (akar, batang, daun) dan organ generatif (bunga, buah, biji). Pertumbuhan tanaman kakao, pada usia 3 tahun dapat mencapai tinggi 1,8 - 3, meter, dan pada usia 12 tahun dapat mencapai tinggi 4,5 - 7 meter. Pertumbuhan buah maksimum kurang lebih 143 hari, dapat dipanen ketika buah sudah memperlihatkan kematangan (Juliasih et al., 2023). Dalam membudidayakan kakao terdapat beberapa faktor yang perlu diperhatikan yaitu biotik dan abiotik. Faktor abiotik dipengaruhi oleh iklim tropis dengan curah hujan yang berkisar antara 1.800 - 3.000 mm setiap tahunnya dengan kelembapan udara 80 - 90 % karena tanaman kakao memerlukan kelembapan tinggi dan curah hujan yang cukup. Tingkat intensitas cahaya matahari merupakan faktor penentu dalam proses pembungaan tanaman kakao. Tanah sebagai media tanam juga merupakan hal yang perlu diperhatikan. Menurut (As'ad et al., 2020) tanah yang mudah meresap air, kandungan humusnya banyak, dan memiliki pH antara 5-7 merupakan tanah yang ideal untuk pertumbuhan tanaman kakao. Sedangkan faktor biotik dipengaruhi oleh hama dan patogen tanaman yang dapat menurunkan produksi kakao dan produktifitasnya tidak hanya di Indonesia tetapi juga di daerah penghasil kakao lainnya (Thube et al., 2023). Sehingga faktor tersebut menjadi ancaman dan hal yang perlu diperhatikan bagi pertanaman kakao.

Beberapa patogen yang menyebabkan penyakit pada tanaman kakao yaitu busuk buah kakao yang disebabkan oleh *Phytophthora palmivora*, yang menimbulkan gejala nekrosis coklat kehitaman pada buah, buah yang telah busuk berwarna hitam dan terdapat miselium berwarna putih yang menutupi permukaan buah (Purwantara et al., 2015). Hawar benang yang disebabkan oleh *Marasmius* sp. dengan gejala yang di tunjukkan perubahan warna daun dari hijau menjadi kuning yang dimulai dari bagian tengah daun mengikuti tulang-tulang daun, lama kelamaan daun akan kering tetapi tidak jatuh karena terdapat benang-benang yang mengikat sehingga daun terlihat bergantung pada ranting (Matitaputty et al., 2014). *Vascular Streak Dieback* (VSD) yang disebabkan oleh cendawan *Lasiodiplodia theobromae*, dengan gejala klorosis kemudian disusul dengan gejala nekrosis pada daun, terutama dilihat pada daun kedua atau ketiga dari ujung batang (Alvindhia et al., 2017). Mati pucuk dan kanker batang yang disebabkan oleh *Lasiodiplodia* yang menyebabkan gejala secara tiba-tiba daunnya menguning dan menghitam kemudian disusul dengan cabang yang mati, memperlihatkan adanya perubahan warna dengan garis-garis coklat pada jaringan pembuluh (Asman et al., 2020).

Lasiodiplodia adalah cendawan yang menyerang kakao dan menyebabkan beberapa penyakit, cendawan ini dianggap sebagai ancaman bagi budidaya tanaman kakao karena jika menyerang tanaman dapat menyebabkan kerusakan yang parah. Mempunyai kemampuan untuk bertahan hidup di dalam tanah dan tanaman yang telah mati sehingga sulit untuk dikendalikan. Untuk mengendalikan penyakit pada tanaman kakao biasanya petani akan menggunakan fungisida sintetis atau fungisida kimia. Fungisida dapat menghambat perkembangan cendawan *L. theobromae*, tetapi hal ini akan berdampak negatif karena akan menimbulkan efek samping sehingga tanaman menjadi resisten terhadap hama, penyakit juga berdampak pada kesehatan manusia dan lingkungan (Calderon et al., 2024). Karena adanya hal tersebut salah satu cara alternatif yang ramah lingkungan untuk menghambat pertumbuhan cendawan ini yaitu dengan menggunakan cendawan antagonis.

Cendawan antagonis berperan penting untuk mengendalikan patogen penyebab penyakit atau sebagai pengendalian hayati yang dapat menekan serangan dari patogen. Cendawan antagonis memiliki metabolit penghambat atau antibiotik dan bekerja sebagai parasitisme dimana antagonis menyerap sebagian atau seluruh nutrisi dari inangnya selain itu dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman (Thambugala et al., 2020). Menurut Susanna et al. (2018), umumnya ada tiga mekanisme pengendalian dengan cendawan antagonis terhadap cendawan patogen yang menyerang tanaman yaitu kompetisi terhadap ruang tumbuh dan nutrisi, antibiosis dan parasitisme. Sudah banyak penelitian terkait cendawan antagonis yang dapat menghambat pertumbuhan cendawan patogen namun tidak semua menunjukkan keefektifitas atau kemampuan antagonis yang tinggi, banyak juga yang memiliki kemampuan antagonis yang rendah sehingga diperlukan lagi penelitian terkait cendawan antagonis untuk melihat kemampuannya dalam menghambat patogen kususny cendawan *L. theobromae*.

Berdasarkan uraian di atas maka penulis melakukan penelitian yang berjudul Uji penghambatan cendawan asal kakao sehat terhadap *Lasiodiplodia theobromae* untuk melihat cendawan antagonis yang berasosiasi dengan tanaman kakao yang lebih efektif untuk menghambat pertumbuhan cendawan *L. theobromae* pada tanaman kakao. Pengujian ini dapat memberikan informasi terkait cendawan antagonis yang berasosiasi terhadap kakao sehat memiliki kemampuan antagonis yang lebih tinggi.

1.2 Landasan Teori

1.2.1 Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Menurut Valderrama et al. (2020) kakao merupakan komoditas tanaman yang berasal dari daerah tropis, yang dibudidayakan oleh petani kecil. Amazon hulu (Amerika Selatan) merupakan asal dari pohon kakao yang didomestikasi pada sekitar 5300 - 5450 SM. Dari pusat asalnya kakao disebarkan dan dibudidayakan di Mesoamerika pada tahun 3000 - 3800 SM. Setelah penaklukan eropa atas amerika. Kemudian menyebar kebeberapa wilayah terutama daerah Trinidad, Venezuela, dan Ekuador. Indonesia mengenal kakao pada saat Belanda datang dan membawa kakao pada abad ke-15, tepatnya di Minahasa, Sulawesi Utara (Wijaya et al., 2023).

Adapun klasifikasi tanaman Kakao menurut United States Department of Agriculture (USDA) sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Sub Kingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Dilleniidae
Ordo	: Malvales
Famili	: Sterculiaceae Vent.
Genus	: <i>Theobroma</i> L.
Spesies	: <i>Theobroma cacao</i> L.

Kakao merupakan salah satu komoditas yang menjadi potensi besar bagi perkembangan industri coklat di Indonesia sekaligus mendorong perekonomian nasional. Perkembangan tanaman kakao dapat dilihat dari luas wilayah atau luas lahan dan kontribusinya terhadap negara sebagai komoditas ekspor, selain itu perkebunan kakao juga banyak menggunakan tenaga kerja dan menjadi sumber pendapatan bagi petani di Indonesia (Pratama et al., 2021). Perbanyakan kakao dapat dilakukan secara generatif dan vegetatif, perbanyakan secara generatif dapat menggunakan biji kakao, perbanyakan dengan cara ini lebih mudah dilakukan serta menghasilkan bibit dalam jumlah yang banyak. Bibit tanaman hasil perbanyakan secara generatif memiliki sifat genetik yang bervariasi. Perbanyakan secara vegetatif merupakan salah satu cara agar menghasilkan bibit yang seragam secara genetik, teknik pencangkakan terdiri dari merangsang cambium perakitan dua tanaman untuk mengembangkan satu tanaman. Bagian tanaman yang menempel dinamakan batang atas sedangkan tanaman inangnya disebut batang bawah, tanaman inang

berperan sebagai penyalur nutrisi sedangkan batang atas berperan sebagai sifat genetik. Metode atau perbanyakkan klonal dengan cara sambung pucuk dapat menggunakan klon-klon lokal yang unggul dan telah beradaptasi pada lingkungan daerah tersebut dengan cara ini diharapkan dapat menghasilkan tanaman yang tidak rentan terhadap hama dan penyakit tanaman (N'zi et al., 2023).

Tanaman kakao yang unggul sangat penting dalam bidang pertanian kakao di masyarakat, produktifitas serta kualitas dari hasil panen kakao sangat ditentukan oleh kualitas bahan tanam. Untuk meningkatkan produktivitas dan kualitas tanaman kakao upaya yang diambil yaitu dengan melakukan teknik klonalisasi. Teknik dari klonalisasi sudah banyak tersebar di masyarakat dengan karakteristik yang beragam. Beberapa hasil dari teknik klonisasi yang ada di Sulawesi Selatan yaitu klon MCC 01, Sulawesi 2 dan BB01. MCC 01 mempunyai daun yang panjang dan sedikit kasar sedangkan Sulawesi 02 mempunyai daun yang panjang dan tekstur daun halus, buah MCC 01 berbentuk lonjong dan berwarna hijau serta tekstur permukaan buah yang kasar sedangkan Sulawesi 02 berbentuk lancip dan berwarna ungu serta memiliki tekstur permukaan buah yang halus (Widiyani et al., 2022). Sedangkan klon BB01 memiliki buah berbentuk bulat yang berwarna hijau dengan permukaan yang halus, bentuk daun yang panjang menyempit kebagian ujung, batang yang memiliki postur kuat sehingga terlihat kokoh (Akmal et al., 2022).

1.2.2 Cendawan *Lasiodiplodia theobromae*

Lasiodiplodia theobromae merupakan cendawan yang dapat tumbuh di mana saja atau cendawan kosmopolitan. Patogen ini menginfeksi dengan memanfaatkan luka atau jaringan tanaman. *L. theobromae* memiliki kisaran inang yang banyak yaitu sekitar 500 spesies tanaman, kakao, jeruk, karet, manggis, mangga, dan pisang merupakan beberapa tanaman inang dari patogen ini, tanaman yang terserang mengalami kerusakan atau beberapa gejala yang diakibatkan oleh patogen sehingga dapat menurunkan produksi (Sandra et al., 2021).

Adapun klasifikasi dari cendawan *Lasiodiplodia theobromae* menurut Global Biodiversity Information Facility (GBIF) sebagai berikut:

Kingdom	: Fungi
Phylum	: Ascomicota
Kelas	: Dothideomycetes
Ordo	: Botryosphaerales
Famili	: Botryosphaeriaceae
Genus	: <i>Lasiodiplodia</i>
Spesies	: <i>Lasiodiplodia theobromae</i>

Lasiodiplodia theobromae merupakan cendawan yang penting dan berbahaya karena dapat menyebar luas dipertanaman. Patogen ini dapat menyerang berbagai jenis inang sehingga menyebabkan penyakit seperti busuk akar, penyakit rebah daun, kanker batang, mati pucuk, serta busuk buah. Pada tanaman yang telah terinfeksi cukup parah dapat mengalami kematian Bragard et al., (2022), VSD *Vascular Streak Dieback* Alvindia et al., (2014). Iklim yang panas dan lembab

merupakan faktor mendukung penyebaran cendawan ini, ketika lingkungan mendukung, penyebarannya pun lebih cepat dan faktor iklim secara signifikan memengaruhi pelepasan spora Zhang (2014). Penyebaran *L. theobromae* biasanya melalui kontak tanaman yang terserang dan juga percikan air disertai angin sehingga cendawan tersebut menyebar luas (Susanna et al., 2018).

Dalam kondisi lapangan, patogen ini dapat menyerang ranting muda sehingga menyebabkan ranting tersebut mati tetapi tidak memengaruhi cabang utama. Namun ketika diperbanyak dalam jaringan tanaman atau klonisasi patogen ini menunjukkan kemampuan untuk menyebabkan klorosis dapat diamati diseluruh dedaunan, layu dan kemudian kematian tanaman (Alvindia et al., 2017) Pada buah kakao mengalami pembusukan. Patogen masuk kedalam jaringan buah yang sehat sehingga buah mengalami bitnik-bintik cokelat muncul pada permukaan buah dan dapat mencapai biji kakao pada akhirnya buah mengalami nekrosis dan tidak dapat bertahan hidup. Buah kakao yang terserang dapat dilihat dengan adanya miselium berwarna kehitaman terlihat pada permukaan buah (Kannan et al., 2010).

Morfologi cendawan *L. theobromae* yang diamati saat cendawan ini memiliki ciri dengan perkembangan miselium yang berwarna putih apabila pertama kali ditumbuhkan di cawan, lama-kelamaan akan berubah menjadi abu gelap dan pada akhirnya menjadi kehitaman, piknidia berwarna hitam dan ostiolate dengan lebar dan panjang masing-masing 4 dan 55 μm hifa sepenuhnya terpisah membentuk konidiafor yang pendek dan sederhana, menghasilkan konidia yang lebarnya 15,4 μm dan panjangnya antara 23,6 dan 28,2 μm , konidida berbentuk hialin pada pada tahap belum dewasa, uniseluler memiliki kandungan granula sedangkan bentuk konidia pada tahap dewasa berbentuk seperti septat dengan garis-garis memanjang berwarna coklat tua (Moreira et al., 2021).

Pengendalian terhadap cendawan *L. theobromae* bisa menggunakan fungisida kimia yang dapat menekan pertumbuhan dari cendawan tersebut namun ada beberapa hal yang perlu dipertimbangkan karena penggunaan fungisida kimia berdampak buruk pada lingkungan dan kesehatan manusia. Penggunaan fungisida kimia dapat mengendalikan *L. theorbomae* namun penggunaan fungisida yang tidak terkontrol dapat menimbulkan masalah contohnya seperti pencemaran tanah dan lingkungan, periode degradasi yang lama, toksisitas residu yang tinggi, dan dapat mengeliminasi organisme berguna. Karena adanya hal tersebut pengendalian yang dapat digunakan yaitu dengan cendawan antagonis, penggunaan cendawan antagonis mampu menghambat penyebaran cendawan *Lasiodiplodia theobromae* (Brito et al., 2022).

1.2.3 Cendawan Antagonis

Cendawan antagonis merupakan cendawan yang berasosiasi dengan tanaman sehat dan tidak memperlihatkan gejala serangan apapun, setiap tanaman inang dapat ditemukan satu atau lebih cendawan antagonis namun sangat sering ditemukan pada tanaman tingkat tinggi (Al-Rashdi et al., 2022). Cendawan antagonis berada di tanaman inang untuk menghabiskan siklus hidupnya tanpa menimbulkan gejala penyakit. Memiliki kemampuan untuk membangun hubungan symbiosis

mutualistik dengan inangnya dimana keduanya sama-sama menerima manfaat. Tanaman inang sebagai penyedia tempat tinggal dan menyediakan nutrisi bagi mereka sedangkan cendawan antagonis memberikan perlindungan atau ketahanan saat tanaman inang menghadapi stres baik yang bersifat biotik maupun abiotik. Dengan menggunakan cendawan antagonis dapat menghambat patogen melalui berbagai mekanisme kerja seperti parasitisme, produksi metabolit sekunder yang beracun, memengaruhi komposisi untuk pasokan nutrisi (Silva et al.,2023). Cendawan antagonis yang memiliki daya hambat tinggi merupakan cendawan yang memiliki pertumbuhan yang lebih cepat dibandingkan dengan patogen sehingga koloni yang dihasilkan oleh antagonis dapat menutupi serta menekan perkembangan koloni patogen (Safitri et al.,2019).

Menurut Asman et al., (2018) cendawan antagonis mampu mengatasi kerugian yang diakibatkan oleh cendawan patogen salah satunya penyakit tanaman kakao yang disebabkan oleh VSD dan penyakit lainnya seperti busuk buah hitam, busuk buah dingin, dan sapu jagat. Dan Kamil et al., (2018) juga menuliskan ada beberapa cendawan antagonis yang dapat mengendalikan penyakit yang disebabkan oleh cendawan *L. theobromae* diantaranya yaitu *Bacillus* Sp untuk mengendalikan busuk biji dan bibit labu, *Trichoderma* dan *Aspergillus* untuk mengendalikan hawar perbungaan jambu mete, *Penicillium* untuk mengendalikan busuk batang pada tanaman jeruk dan *Pseudomonas* untuk mengendalikan busuk ujung batang pada buah mangga.

1.3 Tujuan dan Kegunaan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan beberapa cendawan antagonis yang berasosiasi terhadap tanaman kakao sehat untuk menghambat pertumbuhan cendawan *L. theobromae*. Pengujian ini dapat memberikan informasi terkait cendawan antagonis yang berasosiasi terhadap kakao sehat memiliki kemampuan antagonis yang lebih tinggi

1.4 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini yaitu dari beberapa cendawan antagonis yang berasosiasi pada tanaman kakao sehat diduga bahwa diantara cendawan tersebut memiliki kemampuan yang lebih efektif untuk menghambat pertumbuhan cendawan *L. theobromae*.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Penyakit, Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin, Penelitian dilakukan pada bulan Agustus 2024 hingga bulan Februari 2025.

2.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini berupa Cawan Petri, Erlenmeyer, botol, karet gelang, plastik, autoklaf, LAF (*Laminar Air Flow*), oven, *hot plate*, panci, pisau, spatula, bunsen, cork borer, jarum preparat, timbangan analitik, sedangkan bahan yang digunakan kentang, gula, agar, isolat cendawan antagonis yang berasosiasi dengan tanaman kakao, isolat *Lasiodiplodia theobromae*, aquades, plastik wrap, aluminium foil, spiritus, chloromphenicol, kertas saring, label.

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Pembuatan Media PDA (Potato Dextrose Agar)

Pada penelitian ini media PDA digunakan untuk perbanyak cendawan antagonis dan cendawan *L. theobromae*. Kentang sebanyak 200 gram dipotong dadu, cuci bersih kentang yang telah dipotong kemudian rebus menggunakan air sebanyak 1000 mL hingga lunak dan air rebusan berubah jadi keruh kemudian saring untuk memisahkan air dan kentang, Erlenmeyer diisi dengan agar 21 gram, gula 20 gram, kemudian air hasil rebusan dituang pada Erlenmeyer lalu homogenkan menggunakan spatula. Media PDA yang telah ditutup dengan aluminium foil dan wrap selanjutnya disterilisasi dalam autoklaf selama 2 jam pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm. Media PDA yang telah sterilisasi kemudian dituang dalam cawan petri di dalam LAF hingga dibiarkan sampai memadat.

2.3.2 Perbanyak Isolat *Lasiodiplodia theobromae* dan Cendawan Antagonis yang Berasosiasi dengan Kakao

Isolat cendawan *L. theobromae* dan cendawan antagonis yang berasosiasi dengan kakao diperoleh dari koleksi Laboratorium Penyakit Tanaman, Universitas Hasanuddin, Fakultas Pertanian. Isolat cendawan tersebut berasal dari klon-klon kakao sehat yang berbeda hasil penelitian dari (Anugrah, 2023), (Chatimah, 2023), (Ramadhani, 2023), dan (Ersya, 2024). Isolat diremajakan menggunakan media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dengan cara memindahkan cendawan dari isolat awal ke media yang baru menggunakan cork borer, potongan cendawan diletakkan secara terbalik agar dapat tumbuh lebih cepat. Lakukan hal yang sama pada setiap cendawan lalu tunggu hingga dua hari atau cendawan belum memenuhi cawan petri untuk bisa digunakan dalam pengujian.

2.3.3 Pembuatan Media PDB (*Potato Dextrose Broth*)

Media yang digunakan pada penelitian ini yaitu media PDB (*Potato Dextrose Broth*). Menggunakan kentang sebanyak 200 gram di potong dadu kemudian di rebus

menggunakan air sebanyak 1000 ml hingga mendidih, Setelah mendidih kentang disaring dan air rebusannya di ambil masukkan ke erlenmeyer yang telah berisi gula 20 gram, aduk hingga semuanya merata dan tuang media tersebut ke dalam botol masing-masing botol berisi 25 ml media cair, setelah itu tutup menggunakan plastik dan ditimpa menggunakan aluminium foil lalu rekatkan menggunakan karet dan wrap, jika semua botol telah berisi media selanjutnya sterilisasi dalam autoqlaf selama 2 jam pada temperatur 121 °C dengan tekanan 1 atm.

2.3.4 Uji Produksi Biomassa Cendawan

Pengujian dilakukan dengan menumbuhkan miselium cendawan pada media PDB. Pengujian ini menggunakan metode *Dual Culture* yang diawali dengan memotong biakan murni cendawan patogen dan antagonis dengan cork borer steril, masukkan potongan agar tadi kedalam media yang kemudian diinkubasi selama 2 minggu dan 1 bulan menggunakan suhu 28°C (Daroodi et al., 2021). Setelah masa inkubasi berakhir selanjutnya hifa patogen dan antagonis dipisahkan kemudian dibilas dengan aquades steril selanjutnya simpan di atas kertas saring hingga cairan yang berlebih terserap sehingga pada saat pengukuran bobot basah hanya tersisah hifa cendawan, lalu dilakukan perhitungan bobot basah dan bobot kering menggunakan timbangan analitik. Untuk mendapatkan ukuran bobot kering diperlukan suhu 60 °C selama 24 jam (Achmad 2015). Parameter pengamatan dilihat dari persentase penghambatan antagonis pada media cair diperoleh dari perhitungan bobot basah dan kering miselium. Data yang telah di peroleh dari bobot miselium selanjutnya dihitung menggunakan rumus persentase penghambatan (Firmansyah et al., 2022).

$$\text{Hambatan relatif (\%)} \text{ media PDB} = \frac{B_1 - B_2}{B_1} \times 100 \%$$

Keterangan:

B1 = Biomassa miselium kontrol (gram)

B2 = Biomassa miselium perlakuan (gram)

2.3.5 Uji Buah Isolat Cendawan yang Berasosiasi dengan Kakao Sehat Terhadap Pertumbuhan *L. theobromae*

Buah yang digunakan pada pengujian ini berasal dari klon BB01 yang diambil dari Kabupaten Luwu didesa Lamasi Pantai. Uji buah dilakukan dengan melukai permukaan buah menggunakan cork borer yang berdiameter 0,5 mm kemudian meletakkan potongan agar cendawan antagonis yang telah melalui proses pengujian di laboratorium, pada permukaan buah yang telah dilukai. Buah kemudian diwrapping dengan tujuan merekatkan sehingga potongan agar tidak terlepas dan tidak terjadi kontaminasi. Setelah proses inokulasi selesai, buah diinkubasi selama 48 jam untuk dibiarkan tumbuh terlebih dahulu sebelum diinokulasikan cendawan *L. theobromae* di waktu setelah 48 jam. Setiap perlakuan diulang sebanyak 4 kali dan diberi jarak yang sama tergantung pada panjang buah (Ajayi 2019). Buah kakao kemudian diinkubasi pada suhu ruang dan diamati setiap 24 jam diwaktu yang sama selama 9 hari dengan parameter pengamatan dilihat pada gejala nekrosis yang berupa bercak pada permukaan buah tempat inokulasi. Dimater gejala kemudian diukur dengan

membagi 4 bagian yaitu diukur pada bagian atas buah, bawah, samping kanan dan juga samping kiri. Hasil pengukuran kemudian dimasukkan kedalam rumus, Lestari et al. (2022) sebagai berikut:

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

Keterangan:

D : Rata-rata diameter koloni jamur

d1 : Panjang diameter koloni secara vertikal

d2 : Panjang diameter koloni secara horizontal

2.3.6 Re-isolasi

Pada tahapan akhir penelitian ini, cendawan yang sebelumnya telah diinokulasikan pada buah kakao akan diisolasi kembali. Isolat cendawan tersebut kemudian akan ditumbuhkan pada media PDA untuk pengamatan yang lebih lanjut. Tujuan dari tahapan reisolasi ini adalah untuk mengkonfirmasi hasil uji lapangan, yaitu apakah cendawan yang berasosiasi dengan kakao sehat mampu menghambat pertumbuhan *L. theobromae* sesuai dengan gejala yang muncul pada tanaman.

2.5 Analisis Data

Untuk menganalisis data digunakan uji statistik ANOVA dengan taraf kesalahan 5% yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Setiap perlakuan diulang sebanyak lima kali pada uji biomassa dan empat kali pada uji buah. Untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antar kelompok, dilakukan uji tukey. Seluruh analisis data menggunakan perangkat lunak microsoft excel dan perangkat lunak SPSS