

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kakao (*Theobroma cacao* L.) atau cokelat merupakan salah satu komoditas perkebunan unggulan di Indonesia. Termasuk dalam famili Malvaceae, tanaman kakao berasal dari Amerika Selatan yang saat ini banyak ditanam di berbagai kawasan yang beriklim tropis (Senna, 2020). Kakao berperan penting dalam perekonomian rakyat di Indonesia dikarenakan sebagian besar perkebunan kakao diusahakan oleh rakyat. Hal ini berdasarkan data Badan Pusat Statistik (2024), bahwa pada tahun 2023 luas areal perkebunan kakao rakyat di Indonesia sekitar 1,39 juta hektar (99,64%) dari total luas areal. Sementara itu, luas areal perkebunan besar swasta sekitar 4.776 hektar (0,34%), dan 228 hektar (0,02%) merupakan Perkebunan Besar Negara. Pada tahun 2019, produksi biji kakao tercatat sekitar 734,80 ribu ton. Namun, produksinya terus mengalami penurunan hingga tahun 2023 tercatat produksi biji kakao hanya sekitar 632,12 ribu ton (BPS, 2024).

Budidaya tanaman perkebunan seperti kakao sering menghadapi berbagai kendala seperti serangan Organisme Pengganggu Tanaman (OPT), baik hama maupun penyakit. Secara umum kakao di Indonesia lebih rentan terserang penyakit yang menyebabkan produktivitasnya rendah. Salah satunya adalah penyakit kanker batang, penyakit ini menimbulkan gejala muncul bercak hitam pada batang seperti membusuk disertai cairan merah berkarat. Penyakit kanker batang dapat disebabkan oleh beberapa cendawan patogen salah satunya adalah cendawan *Lasiodiplodia* sp. (Febbiyanti, 2019). Cendawan patogen *Lasiodiplodia* sp. dapat menginfeksi berbagai tanaman inang, selain menyebabkan penyakit kanker batang, *Lasiodiplodia* sp. juga dapat menyebabkan penyakit seperti hawar daun, busuk buah (Huda-Shakirah et al., 2022), dan *dieback* (Asman et al., 2018).

Metode pengendalian patogen penyebab kanker batang yang umumnya diterapkan oleh petani saat ini adalah pengendalian dengan menggunakan fungisida kimia sintetis. Namun, penggunaan fungisida kimia seringkali tidak efektif dalam jangka panjang karena risiko resistensi, dampak negatif terhadap lingkungan (Cycon et al., 2013), kesehatan manusia (Tomer dan Sangha, 2013), serta keberadaan dan populasi organisme berguna (Sudantna et al., 2021). Penggunaan pestisida kimia tidak efisien karena hanya satu persen dari pestisida yang diaplikasikan dapat mencapai OPT target, sementara sisanya menjadi limbah berbahaya yang berdampak langsung pada manusia dan lingkungan (Theresia et al., 2023). Oleh karena itu, dibutuhkan metode pengendalian alternatif yang mampu menekan patogen ini yang bersifat ramah lingkungan. Salah satunya adalah pengendalian secara biologis yang juga dikenal dengan pengendalian hayati (Phatan et al., 2020).

Pengendalian hayati adalah salah satu solusi pengendalian OPT dengan pemanfaatan mikroba. Mikroorganisme yang berperan sebagai biokontrol ini dapat menghasilkan bioaktif bersifat fungisidal yang ramah lingkungan (Calderon et al., 2024). Mikroba ini dapat berasal dari sekitar perakaran tanaman (rizosfer) serta endofit pada

jaringan tanaman. Diketahui bahwa cendawan rizosfer merupakan mikroba yang paling banyak ditemukan mampu menekan perkembangan mikroba patogen tanaman. Sehingga pemanfaatan cendawan rizosfer yang ada di area tanaman kakao sehat dapat menjadi alternatif yang efektif untuk menekan penyakit kanker batang pada tanaman kakao (Fitriadi dan Putri, 2019).

Berdasarkan uraian di atas maka perlu dilakukan penelitian mengenai cendawan rizosfer pada beberapa klon tanaman kakao untuk mengetahui cendawan mana yang efektif menekan perkembangan penyakit yang disebabkan oleh cendawan patogen *Lasiodiplodia* sp. secara *in-vitro*.

1.2 Landasan Teori

1.2.1 Tanaman Kakao

Klasifikasi *Theobroma cacao* L. menurut Minifie (1999) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Planta
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Subkelas	: Dialypetalae
Ordo	: Malvales
Famili	: Malvaceae
Genus	: <i>Theobroma</i>
Spesies	: <i>Theobroma cacao</i> L.

Tanaman kakao (*T. cacao*) merupakan tanaman tahunan yang berasal dari hutan hujan tropis di bagian utara Amerika Selatan. Suku Indian Maya dan suku Aztek (Aztec) adalah yang pertama kali membudidayakan dan memanfaatkan kakao sebagai bahan makanan dan minuman. Kakao pertama kali masuk di Indonesia dibawa oleh orang Spanyol tahun 1560 di Minahasa, Sulawesi Utara. Sulawesi Selatan merupakan salah satu Provinsi dengan produksi kakao terbesar di Indonesia (Senna, 2020).

Morfologi dan karakteristik tanaman kakao sangat beragam, salah satunya terlihat pada fenotipik seperti warna buah, jumlah biji kakao, serta diameter buah dan biji kakao. Morfologi tanaman kakao yang beragam diketahui sebagai hasil dari rekombinasi, mutasi kumulatif, dan seleksi pada individu yang dipengaruhi oleh lingkungan, dan dapat menjadi sumber daya genetik yang potensial untuk yang dapat digunakan dalam pertanian modern (Izzah et al., 2018).

Tanaman kakao memiliki kriteria dalam penyesuaian lahan, iklim serta komponen berupa fisik dan kimia tanah sangat menentukan dalam menilai perkembangan tanaman kakao yang optimal. Tanaman kakao yang masih muda memerlukan penanghungan dari sinar matahari yang berlebihan dan angin. Tanaman kakao muda tanpa penanghungan akan mengalami hambatan pertumbuhan, bahkan bisa mati (Ali, 2016).

Tanaman Kakao merupakan salah satu tanaman yang melakukan hibridisasi, yang dimana menghasilkan beragam genotipe dan resisten terhadap hama maupun penyakit. Samsuddin (2018), mengemukakan bahwa keanekaragaman kakao di Sulawesi Barat sangat tinggi. Beberapa klon tanaman kakao yang banyak dibudidayakan petani antara lain Lokal, M01, 45, AP, RB, SS, MCC 02, dan Gene-J.

Tanaman kakao klon MCC 02 (Masamba Cocoa Clone 02) merupakan klon tanaman kakao yang berasal dari kabupaten Luwu Utara Provinsi Sulawesi selatan dan merupakan klon tanaman kakao unggul di Sulawesi. MCC 02 merupakan hasil dari perbanyakan klonal menggunakan Teknik cangkok samping. Dengan ciri buah yang berukuran sedang dengan permukaan kulit buah yang halus dan berwarna merah tua hingga kekuningan. Klon tanaman kakao MCC 02 tahan terhadap serangan hama penggerek buah kakao (PBK) dan penyakit VSD dan busuk buah (Asman et al., 2024).

Tanaman kakao klon Sulawesi (SS1) merupakan klon tanaman kakao asal Sulawesi. Klon tanaman kakao ini memiliki kelebihan yaitu berbuah lebat dengan ukuran biji kakao yang relatif besar. Klon SS1 merupakan klon yang unggul karena tahan terhadap penyakit VSD dan busuk buah. Serta, batang atasnya biasa digunakan dalam teknik sambung pucuk dan okulasi (Kusuma et al., 2019).

1.2.2 Cendawan *Lasiodiplodia* sp.

Klasifikasi dari cendawan *Lasiodiplodia* sp. menurut CABI (2019), dapat dilihat sebagai berikut:

Kingdom : Fungi
 Divisi : Ascomycota
 Kelas : Dothideomycetes
 Ordo : Botryosphaerales
 Famili : Botryosphaeriaceae
 Genus : *Lasiodiplodia*

Cendawan *Lasiodiplodia* sp. merupakan cendawan patogen yang memiliki dampak ekonomi signifikan pada berbagai tanaman perkebunan di daerah tropis dan subtropis. Patogen *Lasiodiplodia* sp. melalui luka atau jaringan nekrotik dapat menyebabkan penyakit, umumnya pada bagian tanaman yang berdaging atau berkayu, seperti busuk buah, hawar daun, busuk, kanker batang, hingga mati ranting (Sandra et al., 2021).

Penyakit yang disebabkan oleh patogen *Lasiodiplodia* sp. dapat menginfeksi tanaman dari berbagai usia, tetapi tanaman yang sudah tua lebih rentan terserang. Mati pucuk berupa dieback, daun menguning dan mengering, kemudian mati merupakan gejala yang timbul jika tanaman terserang (Susanna, 2018). Infeksi oleh cendawan patogen *Lasiodiplodia* sp. khususnya *L. theobromae* dapat terlihat pada batang tanaman, dapat menghambat proses fotosintesis sehingga pertumbuhan tanaman tidak optimal (Agustina, 2019).

Penularan cendawan patogen *Lasiodiplodia* sp. umumnya terjadi melalui kontak dengan tanaman yang terinfeksi dan juga percikan air. Patogen *Lasiodiplodia* sp. dapat bersifat saprofit dan juga hidup di dalam tanah. Patogen ini termasuk dalam kelompok cendawan yang kisaran inangnya luas, dapat menyebabkan penyakit pada tanaman seperti jeruk (Retnosari et al., 2014), mangga (Khanzada, 2005), karet (Pha et al., 2010), cokelat atau kakao (Twumasi dan Ohene, 2014), dan persik (Li et al., 2016).

1.2.3 Cendawan Sebagai Agensia Hayati

Agens pengendali hayati (APH) untuk penyakit tanaman adalah mikroorganisme yang ditemukan di alam, seperti bakteri, jamur, actinomycetes yang mampu menekan, menghambat, atau bahkan menghilangkan organisme pengganggu tanaman (OPT) (Tombe 2002). Pengendalian hayati bertujuan untuk mengurangi kepadatan inokulum atau aktivitas patogen agar tidak menyebabkan gejala pada tanaman, dengan memanfaatkan satu atau lebih APH melalui manipulasi lingkungan, inang, atau antagonis.

Cendawan rizosfer merupakan cendawan yang diperoleh dari sekitar area perakaran tanaman, cendawan rizosfer dari tanaman sehat dapat dijadikan biokontrol karena dapat menghambat pertumbuhan patogen tanaman (Fitriadi dan Putri, 2019). Cendawan dari berbagai genus diantaranya *Trichoderma* sp., *Penicillium*, dan *Aspergillus*, memiliki potensi antagonistik terhadap berbagai patogen tular tanah dengan berbagai mekanisme seperti kompetisi ruang dan nutrisi, antibiosis, dan mikoparasitisme (Poudel et al., 2020).

Cendawan rizosfer selain dapat digunakan sebagai pengendali hayati penyakit tanaman juga sebagai agen pemacu pertumbuhan tanaman (*plant growth promoting microbes*) atau PGPM. Cendawan rizosfer dapat memacu pertumbuhan tanaman serta meningkatkan ketahanan tanaman terhadap stress yang disebabkan oleh pengaruh biotik dan abiotik (Azis et al., 2025).

Penggunaan APH dalam pengendalian OPT sangat dianjurkan karena tidak berdampak negatif terhadap lingkungan dan musuh alami, mencegah ledakan OPT sekunder, bebas residu pestisida kimia sintetis, aman bagi kesehatan manusia, terdapat di area tanaman sehingga mengurangi ketergantungan petani pada pestisida kimia sintetis (Tombe et al., 1999).

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman cendawan rizosfer pada beberapa klon tanaman kakao dan efektivitasnya dalam menekan perkembangan *Lasiodiplodia* sp.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi mengenai keragaman cendawan rizosfer pada beberapa klon tanaman kakao dan potensinya sebagai agensia hayati untuk menekan perkembangan *Lasiodiplodia* sp.

1.5 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah terdapat beberapa cendawan rizosfer pada tanaman kakao klon MCC 02, SS, dan Lokal yang efektif untuk menekan perkembangan cendawan patogen *Lasiodiplodia* sp.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada Mei–Desember 2025. Adapun Lokasi pengambilan sampel tanah rizosfer di kebun kakao multiclonal yang terletak di Polewali Mandar, Sulawesi Barat. Selanjutnya sampel tanah diuji di Laboratorium Penyakit Tanaman, Program Studi Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin dan identifikasi senyawa metabolit dengan metode *Gas-Chromatography-Mass Spectrometry* (GCMS) di lakukan di Laboratorium Kimia Lingkungan, Balai Besar Laboratorium Kesehatan Masyarakat Makassar I.

2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu cawan Petri, tabung reaksi, rak tabung, *Erlenmeyer*, pinset, *sprayer*, sendok pengaduk, pipet tetes, kaca preparat, nampan/wadah plastik, *deg glass*, *tube*, *autoclave*, gunting, *cutter*, kertas label, *cork borer*, oven, *laminar air flow*, dan mikroskop *compound*.

Beberapa bahan yang digunakan adalah media PDA (*potato dextrose agar*), biakan cendawan *Lasiodiplodia* sp., akuades, *spiritus*, alkohol 70%, *alumunium foil*, *lactophenol cotton blue*, bunsen, dedak, kain kasar, dan plastik wrap. Bahan yang digunakan dalam pembuatan media PDA: aquades 1000 ml, gula 20 g, agar 17 g, *chloramphenicol*, kain kasar, dan kentang 200 g.

2.3 Metode Penelitian

Penelitian ini terbagi menjadi beberapa tahap. Adapun metode penelitiannya sebagai berikut:

2.3.1 Pengambilan Sampel Tanah Rizosfer

Sampel tanah rizosfer diambil di kebun kakao multiclonal yang terletak di Polewali Mandar, Sulawesi Barat. Dimana tempat pengambilan sampel merupakan lokasi yang memiliki tanah yang subur dengan tanaman kakao yang sehat. Pengambilan sampel metode acak terpilih dengan mengambil sampel tanah dengan jarak 1 meter dari batang tanaman kakao dengan kedalaman galian 20 cm pada 4 titik dari tanaman kakao klon MCC 02, SS, dan Lokal sehingga diperoleh 12 sampel tanah dengan berat 200 g per sampelnya.

2.3.2 Pembuatan Media Biakan *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Pertama-tama kentang dikupas dan dipotong-potong kecil kemudian direbus dengan aquades sebanyak 1000 ml hingga mendidih. Memasukkan gula 20 gr dan agar 17 gr, kemudian ekstrak kentang disaring dan dimasukkan kedalam erlen meyer hingga volume 1000 ml. Menutup rapat *erlen meyer* dengan kapas dan *alumunium foil* kemudian

dieratkan dengan plastik wrap. Selanjutnya media disterilisasi dalam *autoclave* selama 20 menit pada suhu 121°C. Menambahkan antibiotik *chloramphenicol* untuk mencegah kontaminasi, setelah itu media siap dituangkan pada cawan petri.

2.3.3 Isolasi dan Perhitungan Populasi Cendawan Rizosfer

Cendawan yang diperoleh dari tanah rizosfer tanaman kakao diisolasi dengan metode pengenceran bertahap hingga mencapai pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} . Sebanyak 1 mL suspensi dari 10^{-3} dan 10^{-4} dituangkan ke media PDA kemudian diinkubasi selama 72 jam. Setelah 72 jam inkubasi, koloni cendawan akan tumbuh. Setiap koloni yang tumbuh dengan karakteristik cendawan yang berbeda diisolasi ke media PDA baru untuk mendapatkan biakan murni.

Setelah diinkubasi, koloni cendawan akan tumbuh. Koloni yang terbentuk dihitung secara visual. Jumlah koloni pada satuan volume/gram sampel (misalnya CFU/mL atau CFU/g) dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Jumlah Mikroba} = \frac{\text{Jumlah Koloni}}{\text{Volume Inokulum yang Ditanam (mL)} \times \text{Faktor Pengenceran}}$$

2.3.4 Uji Potensi Patogenik Cendawan Rizosfer pada Daun Kakao

Uji potensi patogenik dilakukan pada daun tanaman kakao sehat. Selanjutnya diamati tiap 48 jam selama 4 kali. Cendawan yang menimbulkan gejala seperti nekrotik pada daun kakao tidak dimasukkan pada uji berikutnya karena termasuk patogen tanaman dan cendawan yang tidak menimbulkan gejala kemudian akan dilakukan uji pada tahap selanjutnya. Uji potensi patogenik ini dilakukan dengan tujuan untuk menyeleksi mana cendawan yang aman untuk digunakan dan nantinya tidak bersifat patogenik pada tanaman.

2.3.5 Uji Potensi Patogenik Cendawan Rizosfer pada Benih Kakao

Uji potensi patogenisitas dilakukan pada benih kakao sehat yang sebelumnya telah dibersihkan dari dagingnya (*pulp*). Setelah bersih dilakukan sterilisasi permukaan pada benih kakao kemudian direndam pada isolat cendawan rizosfer suspensi 10^6 spora/mL selama 1 jam dan disimpan pada wadah yang telah dialasi kain kasar yang telah dilembabkan menggunakan aquades steril. Pengamatan dilakukan selama 8 hari dengan jumlah 4 kali pengamatan. Pengamatan dilakukan setiap 2 hari dan dihitung dengan rumus :

$$KB = \frac{\text{Jumlah benih yang ditanam} - \text{Total benih yang rusak}}{\text{Jumlah benih yang ditanam}} \times 100\%$$

Keterangan : KB = Kerusakan Benih

Pengamatan kerusakan benih ini dilihat secara visual benih, dengan melihat kondisi fisik benih secara langsung. Benih yang pecah, mengerut, bahkan busuk dicatat dan dikategorikan sebagai benih yang rusak pada pengamatan ini.

2.3.6 Ekstraksi Senyawa Metabolit oleh Isolat Sampel

Pertama-tama dilakukan pembuatan *Potato Dextrose Broth* (PDB) langkahnya yaitu, kentang dikupas dan dipotong-potong kecil kemudian direbus dengan aquades sebanyak 1000 ml hingga mendidih. Memasukkan gula 20 gr, kemudian ekstrak kentang disaring dan dimasukkan kedalam erlen meyer hingga volume 1000 ml. Menutup rapat erlenmeyer dengan kapas dan alumunium foil kemudian dieratkan dengan plastik wrap. Selanjutnya media disterilisasi dalam *autoclave* selama 20 menit pada suhu 121°C. Menambahkan antibiotik *chlorampenicol* untuk mencegah kontaminasi, setelah itu media siap dituangkan pada botol kultur. Botol kultur yang sebelumnya telah diisi dengan media PDB selanjutnya di beri potongan cendawan rizosfer kemudian diinkubasi dan dihomogenkan selama 4 pekan.

2.3.7 Uji Potensi Biokontrol Cendawan Rizosfer Kakao terhadap *Lasiodiplodia* sp. secara *In Vitro* pada Media PDA

Uji biokontrol cendawan rizosfer kakao terhadap cendawan patogen *Lasiodiplodia* sp. dilakukan secara *in vitro* dengan metode biakan ganda, bertujuan untuk mengetahui isolat cendawan rizosfer yang mampu menekan perkembangan cendawan patogen. Cendawan rizosfer dan cendawan *Lasiodiplodia* sp. hasil subkultur ditumbuhkan bersamaan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dengan jarak 3 cm dalam cawan petri kemudian diamati pertumbuhannya. Persentase dihitung untuk menilai kemampuan daya hambat dan antibiosis dari cendawan rizosfer. Pengamatan dilakukan setiap hari dengan mengukur diameter pertumbuhan patogen dengan rumus :

$$D = \frac{D1 + D2}{2}$$

Keterangan : D1 = Lebar zona hambat vertikal

D2 = Lebar zona hambat horizontal

Kemudian dilakukan analisis perhitungan penghambatan pertumbuhan cendawan dengan rumus :

$$\% \text{ Penghambatan} = \frac{DC - DP}{DC} \times 100\%$$

Keterangan : DC = Diameter cendawan patogen pada kontrol

DP = Diameter cendawan patogen pada perlakuan

Kategori efektivitas penghambatan pertumbuhan cendawan patogen terhadap cendawan antagonis menurut Amaria et al., (2013) dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

1. Efektivitas rendah: 0-39%
2. Efektivitas sedang: 40-69%
3. Efektivitas Tinggi: 70-100%

2.3.8 Uji Potensi Biokontrol Cendawan Rizosfer Kakao terhadap *Lasiodiplodia* sp. secara *In Vitro* Menggunakan Media Daun Kakao Sehat

Daun kakao sehat dioles menggunakan senyawa metabolit cendawan rizosfer yang telah dibuat dan berumur 4 pekan, masing-masing daun dioles menggunakan 3 ml cendawan rizosfer. Setelah daun dioles, kemudian diberikan perlakuan cendawan patogen *Lasiodiplodia* sp. pada daun sebanyak 4 titik pada permukaan bawah daun. Setelah itu diamati luas nekrotiknya selama 8 hari sebanyak 4 kali pengamatan. Kemudian dihitung menggunakan rumus:

$$D = \frac{D1 + D2}{2}$$

Keterangan : D1 = Lebar nekrotik vertikal

D2 = Lebar nekrotik horizontal

Kemudian dilakukan analisis perhitungan penghambatan kerusakan daun dengan rumus :

$$\% \text{ Penghambatan kerusakan daun} = \frac{DC - DP}{DC} \times 100\%$$

Keterangan : DC = Diameter nekrotik pada kontrol

DP = Diameter nekrotik pada perlakuan

Kategori efektivitas penghambatan kerusakan daun cendawan patogen terhadap cendawan antagonis menurut Amaria et al., (2013) dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

1. Efektivitas rendah: 0-39%
2. Efektivitas sedang: 40-69%
3. Efektivitas Tinggi: 70-100%

2.3.9 Uji Potensi Biokontrol Cendawan Rizosfer Kakao terhadap *Lasiodiplodia* sp. secara *In Vitro* pada Media PDB

Senyawa metabolit dari cendawan rizosfer yang telah dibuat disaring dan dipindahkan ke dalam botol kultur yang berukuran lebih kecil dengan volume 7 ml dan masing-masing diulang sebanyak 3 ulangan. Setelah itu potongan cendawan *Lasiodiplodia* sp. hasil subkultur ditumbuhkan pada senyawa metabolit cendawan rizosfer dan diinkubasi selama 72 jam. Setelah 72 jam cendawan *Lasiodiplodia* sp. disaring kemudian ditimbang berat basahanya dan untuk berat keringnya dilakukan dengan cara cendawan *Lasiodiplodia* sp. yang telah ditimbang berat basahanya dikeringkan menggunakan inkubator selama 24 jam dengan suhu 60°C kemudian ditimbang berat keringnya. Persentase dihitung untuk menilai kemampuan daya hambat dari cendawan rizosfer. Pengamatan pertumbuhan patogen diamati dengan rumus:

$$E = \frac{WWC - WWT}{WWC} \times 100\%$$

Keterangan : E = Efektivitas
 WWC = Berat Basah Kontrol
 WWT = Berat Basah Perlakuan

$$E = \frac{DWC - DWT}{DWC} \times 100\%$$

Keterangan : E = Efektivitas
 DWC = Berat Kering Kontrol
 DWT = Berat Kering Perlakuan

Kategori efektivitas penghambatan pertumbuhan cendawan patogen terhadap cendawan antagonis menurut Amaria et al., (2013) dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

1. Efektivitas rendah: 0-39%
2. Efektivitas sedang: 40-69%
3. Efektivitas Tinggi: 70-100%

2.3.10 Identifikasi Senyawa Metabolit pada Isolat Terbaik dengan Metode GCMS

Cendawan rizosfer yang terbaik dan berpotensi sebagai agens hayati kemudian diidentifikasi senyawa metabolitnya dengan metode *Gas Chromatography Mass Spectrometry* (GCMS). Senyawa metabolit cendawan rizosfer yang telah dibuat dan berumur 4 pekan kemudian dibuatkan ekstraksi dengan cara sebanyak 15 ml senyawa metabolit cendawan rizosfer dicampur dengan 10 ml *etil acetat* kemudian dihomogenkan menggunakan *centrifuge* selama 20 menit. Setelah itu supernatannya diambil dan dipindahkan ke *tube* yang telah diberi kode isolate. Ekstrak *etil acetat* senyawa metabolit cendawan rizosfer kemudian dianalisis menggunakan GC-MS ISQ 7000. Larutan sampel ekstrak *etil acetat* senyawa metabolit cendawan rizosfer sebanyak 1 µl diinjeksikan ke GCMS Thermo Scientific. Temperatur oven terprogram pada suhu 50°C selama 54,89 menit. Identifikasi senyawa fitokimianya menggunakan NIST mainlib dengan membandingkan antara pola spektrum massa dengan pola fragmentasi senyawa referensi.

2.3.11 Identifikasi Morfologi

Biakan yang memiliki potensi sebagai agens hayati yang terbaik dari uji yang telah dilakukan kemudian diinkubasi, selanjutnya diidentifikasi morfologi meliputi makromorfologi dan mikromorfologi. Pengamatan makromorfologi mencakup bentuk koloni, warna permukaan, tekstur koloni, dan pola penyebaran koloni. Sementara itu, pengamatan mikromorfologi meliputi hifa (memiliki sekat atau tidak), bentuk spora, dan konidia (bentuk dan warna). Hasil pengamatan ini kemudian diidentifikasi menggunakan padoman buku identifikasi Barnett & Hunter, 1998.

2.4 Parameter Pengamatan

Adapun parameter pengamatan dari penelitian ini sebagai berikut:

- a. Populasi
Parameter ini mengacu pada jumlah total individu atau mikroorganisme pada cawan petri. Tujuannya adalah untuk mengetahui pertumbuhan, penyebaran, atau keberhasilan suatu perlakuan terhadap dinamika populasi.
- b. Persentase (%) Kerusakan Benih
Persentase kerusakan digunakan untuk mengevaluasi cendawan rizosfer yang berpotensi merusak serta menghambat perkecambahan benih.
- c. Persentase (%) Penghambatan Pertumbuhan Patogen pada Media PDA dan PDB.
Persentase penghambatan pertumbuhan patogen digunakan untuk mengevaluasi seberapa besar kemampuan cendawan rizosfer dalam menghambat pertumbuhan patogen *cendawan Lasiodiplodia* sp.
- d. Persentase (%) Penghambatan Kerusakan Daun
Persentase penghambatan kerusakan daun digunakan untuk mengevaluasi seberapa besar kemampuan cendawan rizosfer dalam menghambat kerusakan daun yang disebabkan oleh patogen *cendawan Lasiodiplodia* sp.
- e. Kandungan Senyawa Cendawan Rizosfer dan Peran Cendawan Rizosfer
Cendawan rizosfer terbaik diidentifikasi kandungan senyawanya yang berpotensi sebagai agens hayati.
- f. Karakteristik morfologi makroskopis dan mikroskopis
Pengamatan morfologi makroskopis mencakup pengamatan terhadap ciri-ciri fisik yang dapat dilihat dengan mata telanjang, seperti warna, bentuk, ukuran, tepi, permukaan, dan tekstur koloni. Sementara itu, morfologi mikroskopis dilakukan dengan bantuan mikroskop untuk mengamati struktur halus, seperti bentuk dan susunan sel, hifa, spora, dan struktur anatomi lainnya yang tidak terlihat secara kasat mata. Parameter ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui jenis cendawan pada rizosfer tanaman kakao yang memiliki potensi sebagai agens hayati.

2.5 Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan beberapa perlakuan dan ulangan. Data setiap parameter dimasukkan ke dalam tabel menggunakan Microsoft® Excel® 2019 MSO (Version 2501 Build 16.0.18429.20132). Parameter pengamatan seperti % penghambatan patogen dan % kerusakan daun oleh patogen dilakukan analisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA). Analisis ragam (ANOVA) menggunakan taraf kesalahan 5% dan uji lanjut BNT.