

Aktivitas Antagonisme Cendawan Endofit terhadap Cendawan Penyebab Bintik Mata Cokelat Daun Kopi

Antagonism Activity of Endophytic Fungi Against Pathogenic Fungus That Cause Coffee Brown Eye Spot

Yulia Dwi Asparita¹, Luqman Qurata Aini², Suharjono^{1*}

¹Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya
Jalan Veteran, Malang 65145

²Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya
Jalan Veteran, Malang 65145

(diterima Mei 2024, disetujui Oktober 2024)

ABSTRAK

Kopi merupakan komoditas perkebunan yang memiliki nilai ekonomi tinggi dan berperan sebagai sumber devisa negara. Namun demikian produktivitas dan kualitas kopi mengalami penurunan yang disebabkan oleh cendawan penyebab bintik mata cokelat pada daun tanaman kopi. Salah satu alternatif untuk mengatasi pertumbuhan cendawan patogen tersebut ialah memanfaatkan cendawan endofit antagonisnya. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi cendawan penyebab bintik mata cokelat daun tanaman kopi dan cendawan endofit antagonisnya serta mengevaluasi potensi dan mekanisme antagonismenya. Cendawan patogen diisolasi dari daun tanaman kopi dengan gejala penyakit bintik mata cokelat, sedangkan cendawan endofit diisolasi dari daun kopi sehat yang dikumpulkan dari Perkebunan Kopi Desa Taji, Kecamatan Jabung, Kabupaten Malang. Masing-masing cendawan dimurnikan berdasarkan metode monospora. Isolat cendawan patogen diseleksi berdasarkan uji patogenisitas. Isolat cendawan endofit diuji potensi antagonisnya terhadap isolat cendawan patogen terpilih. Isolat cendawan endofit dengan potensi tertinggi menghambat pertumbuhan isolat cendawan patogen diidentifikasi berdasarkan similaritas sekuens 18S rDNA. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa isolat cendawan penyebab bintik mata cokelat memiliki similaritas sekuens 100% dengan *Mycosphaerella coffeicola*-PF2. Isolat cendawan endofit paling potensial mampu menghambat pertumbuhan isolat cendawan patogen, memiliki similaritas sekuens 99.94% dengan *Colletotrichum* sp.-EF1. Cendawan endofit *Colletotrichum* sp. menghambat pertumbuhan *M. coffeicola* dengan mekanisme kompetisi dan mikoparasit. Cendawan endofit *Colletotrichum* sp. dapat dikembangkan sebagai agens biopestisida untuk mengendalikan *M. coffeicola* penyebab penyakit bintik mata cokelat pada daun tanaman kopi.

Kata kunci: *Colletotrichum* sp., Postulat Koch, metode monospora, mikoparasit, *Mycosphaerella coffeicola*

ABSTRACT

Coffee is a high economic value commodity and is a source of foreign exchange for Indonesia. Coffee productivity and quality have decreased due to brown eye spot disease caused by fungi infection. One alternative method to overcome the growth of pathogenic fungi is to use endophytic fungi as an antagonistic biological agent. This study aims to identify the fungi causing coffee plant brown eye

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Jalan Veteran, Malang 65145
Tel: 0341-575840, Surel: calistus@ub.ac.id.

spot disease and its antagonistic endophytic fungi, and to evaluate the mechanisms and potential of antagonism. Pathogenic fungi were isolated from coffee leaves showing symptom of brown eye spot disease. Endophytic fungi were isolated from healthy leaves obtained from the Taji Village Coffee Plantation, Jabung District, Malang Regency. Each fungus was cultured and then purified using the monospore method. Pathogenic fungi isolates were selected based on the pathogenicity test. Endophytic fungi isolates were tested for their antagonistic properties against selected brown eye spot pathogenic fungi isolates and the endophytic fungus that had the highest potential to inhibit growth of the pathogenic fungi were identified based on 18S rDNA sequence similarity. The identification results show that the pathogenic fungus has 100% sequence similarity with *Mycosphaerella coffeicola*-PF2 while the antagonistic endophytic fungus has 99.94% similarity with *Colletotrichum* sp.-EF1. The endophytic fungi *Colletotrichum* sp. inhibits the growth of *M. coffeicola* by competition and mycoparasite mechanisms. The endophytic fungi *Colletotrichum* sp. can be developed as a biopesticide agent to control *M. coffeicola* which causes brown eyespot disease on coffee plant leaves.

Keywords: *Colletotrichum* sp., Koch postulate, monospore method, mycoparasite, *Mycosphaerella coffeicola*

PENDAHULUAN

Kopi (*Coffea arabica*) merupakan komoditas penting di Indonesia juga dunia yang memiliki nilai ekonomi tinggi dan berperan sebagai sumber devisa negara. Ekspor kopi menjadi penyumbang devisa terbesar dari sub sektor perkebunan setelah minyak kelapa sawit, karet, dan kakao (Purwanto *et al.* 2021). Saat ini, produktivitas tanaman kopi di Indonesia masih terhambat oleh rendahnya mutu biji kopi yang dihasilkan sehingga memengaruhi pengembangan produksi akhir kopi maupun kualitas benih kopi (Firmansyah *et al.* 2022). Rendahnya produktivitas ini di antaranya disebabkan oleh serangan organisme pengganggu tumbuhan (OPT). Serangan OPT sangat merugikan secara ekonomi baik dari jumlah maupun mutu kopi yang dihasilkan (Thoriq *et al.* 2019). Salah satu penyakit yang menginfeksi tanaman kopi ialah penyakit bintik mata coklat daun tanaman kopi yang disebabkan oleh cendawan patogen (Widyawati 2018). Penyakit bintik mata coklat dapat mengakibatkan hilangnya hasil dan kerusakan tanaman pada tahap awal pertumbuhan, sehingga timbul bintik pada biji kopi (Bhandari *et al.* 2022). Penyakit ini dapat menyebabkan kehilangan hasil kopi lebih dari 25% karena hilangnya dedaunan hingga 70% dan hilangnya buah hingga 10% (Wiryadiputra *et al.* 2014).

Pengendalian penyakit tanaman pada umumnya masih menggunakan pestisida

sinetik sehingga menimbulkan residu yang berbahaya bagi sumber daya alam. Residu pestisida dapat terakumulasi dalam biji kopi pada saat disimpan, misalnya seperti isopokarb yang masih ditemukan dalam biji kopi (Nainggolan *et al.* 2024). Selain terakumulasi dalam tanah dan perairan, residu pestisida juga dapat mengganggu kesehatan manusia. Sebesar 87% petani kopi yang tidak menggunakan sarung tangan dan masker saat penyemprotan pestisida terpapar dan mengalami masalah pernapasan (Hutter *et al.* 2018). Oleh karena itu diperlukan pengendalian penyakit secara hayati dan ramah lingkungan dengan menggunakan mikroorganisme yang memiliki sifat antagonis terhadap patogen, misalnya mikrob rizosfer, actinomycetes, dan mikrob endofit. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa mikrob rizosfer dan actinomycetes dapat mengendalikan pertumbuhan cendawan patogen, sehingga perlu dilakukan penelitian terkait pengendalian menggunakan cendawan endofit. Cendawan endofit hidup di dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan gejala penyakit pada tanaman tersebut. Cendawan endofit mengendalikan cendawan patogen tanaman dengan mekanisme kompetisi antara patogen dan cendawan endofit, parasitisme, dan produksi antibiotik (De Silva *et al.* 2019). Selain itu, cendawan endofit dapat menyekresi metabolit sekunder yang memiliki sifat untuk menghambat pertumbuhan fitopatogen (Al-Rashdi *et al.* 2022).

Cendawan endofit dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang disintesis untuk meningkatkan ketahanan tanaman inang terhadap mikroorganisme patogen dan hama, melindungi tanaman inang dari cekaman lingkungan, dan membantu tanaman inang dalam mengakses nutrisi untuk mendorong pertumbuhan (Fadiji dan Babalola 2020). Sistem kekebalan tanaman juga berperan penting dalam masuknya mikroorganisme yang menguntungkan ke dalam jaringan tanaman termasuk cendawan endofit (Akram *et al.* 2023).

Cendawan endofit dapat menghasilkan metabolit sekunder yang sama dengan tanaman inangnya. Potensi penggunaan beberapa cendawan endofit di antaranya sebagai produsen zat prekursor yang relevan dalam mengatasi berbagai hama dan patogen serta sebagai pengendali potensial populasi hama (Saucedo-García *et al.* 2014). Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi cendawan patogen bintik mata cokelat daun tanaman kopi dan cendawan endofit antagonis serta mengevaluasi mekanisme antagonisnya.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan dengan metode deskriptif kuantitatif. Sampel daun tanaman kopi arabika varietas 'Gayo' diambil di Desa Taji, Kecamatan Jabung, Kabupaten Malang. Sampel daun tanaman kopi yang sehat diambil untuk isolasi cendawan endofit dan sampel daun kopi yang menunjukkan gejala penyakit bintik mata cokelat diambil untuk isolasi cendawan patogen.

Isolasi Cendawan Endofit

Cendawan endofit diisolasi dari daun tanaman kopi yang sehat. Daun tersebut dipotong dengan ukuran $0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$ kemudian dibilas akuades steril. Potongan daun direndam dalam larutan NaOCl 3% selama 3 menit, kemudian direndam dalam etanol 70% selama 2 menit. Sampel potongan daun dibilas kembali dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Potongan daun tersebut kemudian diinokulasikan di medium agar-agar dekstroza kentang (ADK) yang mengandung 50 mgL^{-1}

streptomisin (Thi Minh Le *et al.* 2019) dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 7 hari. Akuades sisa bilasan potongan daun diambil sebanyak 1 mL kemudian digores pada permukaan medium ADK yang mengandung 50 mgL^{-1} streptomisin untuk memastikan bahwa yang tumbuh adalah cendawan endofit. Koloni cendawan endofit diambil dan dimurnikan berdasarkan spora tunggal dalam medium ADK baru (Nasr *et al.* 2021). Kultur cendawan diinkubasikan pada suhu ruang selama 7 hari (Hastuti 2017).

Isolasi dan Uji Patogenisitas Cendawan Penyebab Penyakit Bintik Mata Cokelat Daun Tanaman Kopi

Cendawan patogen diisolasi dari daun tanaman kopi yang menunjukkan gejala penyakit bintik mata cokelat. Bagian daun yang bergejala dipotong dengan ukuran $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$, lalu dicuci menggunakan akuades steril. Potongan daun direndam dalam larutan NaOCl 3% selama 3 menit, kemudian direndam dalam etanol 70% selama 2 menit, selanjutnya dibilas kembali dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Potongan daun tersebut kemudian diinokulasikan pada medium lempeng ADK dalam cawan petri dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 7 hari. Koloni cendawan dimurnikan dari kecambah spora tunggal pada medium ADK selanjutnya dinkubasikan pada suhu ruang selama 7 hari (Darwesh *et al.* 2020).

Uji Patogenisitas dilakukan pada bibit tanaman kopi. Isolat cendawan patogen yang berumur 7 hari ditambahkan dengan 5 mL larutan garam fisiologis, kemudian digoyang-goyangkan sampai spora cendawan tersuspensikan. Suspensi spora ditambah dengan 1 mL larutan Tween 20 dan dibuat seri pengenceran hingga diperoleh kerapatan spora $10^6 \text{ spora mL}^{-1}$. Daun tua tanaman kopi yang berumur sekitar 1 tahun dan masih melekat pada pohon didisinfeksi dengan NaOCl 1% terlebih dahulu, kemudian dibilas dengan akuades steril dan dikeringanginkan. Bagian permukaan bawah daun ditusuk (tidak sampai menembus pada permukaan atas daun) menggunakan jarum suntik, kemudian suspensi spora cendawan patogen diinokulasikan pada

daun yang dilukai, kemudian dibungkus menggunakan plastik. Pengamatan dilakukan terhadap kemunculan gejala bintik mata coklat untuk selanjutnya cendawan patogen diisolasi kembali dari daun dan dikarakterisasi (Ashari *et al.* 2020).

Uji Potensi Antagonisme Cendawan Endofit terhadap Cendawan Patogen

Aktivitas antagonisme cendawan endofit terhadap cendawan patogen diuji menurut metode kultur ganda. Koloni biakan murni cendawan endofit dan biakan cendawan patogen berumur tiga hari dipotong menggunakan *cork borer* steril diameter 6 mm dan diletakkan pada permukaan medium ADK secara berpasangan (Gambar 1). Kultur cendawan diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari. Potensi cendawan endofit menghambat pertumbuhan cendawan patogen (aktivitas antagonisme) diamati mulai awal inkubasi sampai umur tujuh hari setelah inokulasi. Potensi cendawan endofit menghambat cendawan patogen dihitung dan diamati mekanisme antagonismenya menggunakan mikroskop cahaya (Zhao *et al.* 2022).

Data potensi cendawan endofit menghambat cendawan patogen diperoleh melalui pengukuran jari-jari koloni cendawan patogen yang mendekati dan menjauhi koloni cendawan endofit. Jari-jari koloni cendawan tersebut diukur menggunakan jangka sorong digital. Potensi cendawan endofit dalam menghambat cendawan patogen dihitung dengan rumus Yassin *et al.* (2022) berikut:

$$\text{Penghambatan} = \frac{r_1 - r_2}{r_1} \times 100\%, \text{ dengan}$$

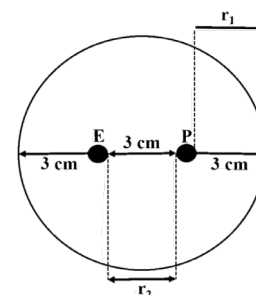
r_1 , jari-jari koloni cendawan patogen yang menjauhi koloni cendawan endofit; dan r_2 , jari-jari koloni cendawan patogen yang mendekati koloni cendawan endofit. Data tersebut dianalisis ragam dilanjutkan uji beda nyata jujur dengan α 5%.

Karakterisasi Cendawan Patogen dan Cendawan Endofit Potensial

Cendawan endofit potensial antagonis dan cendawan patogen dikarakterisasi secara fenotipik dan diidentifikasi secara filogenetik berdasarkan homologi sekuens 18S rDNA.

Ekstraksi kromosomal DNA cendawan dilakukan menggunakan kit ekstraksi (Zymo Research, US). Sebanyak 200 mg miselium disuspensikan dalam 500 μ L larutan ekstraksi dan 5% sodium dodesil sulfat, kemudian divorteks dan disentrifugasi pada kecepatan 11 000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit. Supernatan dituang dalam tabung baru dan ditambahkan larutan fenol : kloroform : isoamil alkohol (25:24:1) kemudian divorteks dan disentrifugasi selama 5 menit. Supernatan dipindahkan dalam tabung baru dan ditambah kloroform : isoamil alkohol (24:1) dan disentrifugasi pada 10 000 rpm selama 5 menit. Supernatan dipindahkan pada tabung eppendorf dengan 2.5 μ L isopropanol. Tabung diinkubasi pada suhu 4 °C selama 1 jam, kemudian disentrifugasi pada 14 000 rpm selama 10 menit. Pelet dicuci menggunakan etanol 70%, dikeringkan, kemudian ditambah 40 μ L bufer TE. Kemurnian DNA diukur dengan spektrofotometer Thermo Scientific Drop pada 260 dan 280 nm (Ikram *et al.* 2018).

Sekuens 18S rDNA cendawan diamplifikasi menggunakan primer universal NS1 dan NS8 (Hadziavdic *et al.* 2014). Pasangan primer NS1/NS8 mengamplifikasi gen 18S rDNA dengan ukuran target ampikon 800–1600 pb. Fragmen DNA target diamplifikasi dalam campuran reaksi 10 μ L yang mengandung 2 μ L akuades, 5 μ L GoTaq green (Promega, US), 1 μ L NS1, 1 μ L NS8, dan 1 μ L DNA templat. Amplifikasi fragmen DNA menggunakan



Gambar 1 Uji antagonisme kultur ganda cendawan endofit dan cendawan patogen (P, koloni cendawan patogen; dan E, koloni cendawan endofit).

(Figure 1 Dual culture antagonism test of endophytic and pathogenic fungi (P, pathogenic fungi colony; and E, endophytic fungi colony)).

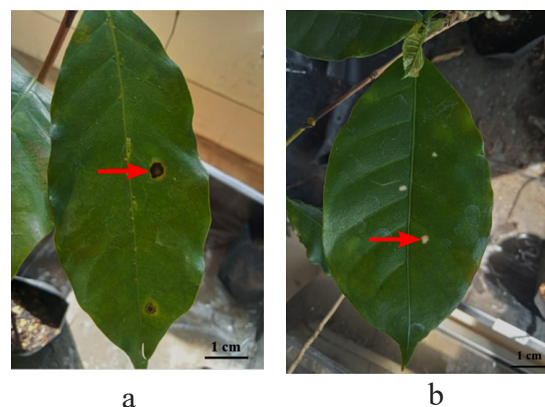
mesin PCR dengan program denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 5 menit, dilanjutkan denaturasi pada suhu 95 °C, 1 menit; *annealing* pada suhu 50 °C, 1 menit; ekstensi pada suhu 72 °C, 1 menit sebanyak 35 siklus; dan ekstensi akhir pada suhu 72 °C, 10 menit. Amplikon dielektroforesis pada 1% gel agarosa (Herkert *et al.* 2015). Amplikon tersebut kemudian disekuensing di First Base, Malaysia. Sekuens 18S rDNA isolat cendawan endofit dan cendawan patogen disejajarkan bersama beberapa strain cendawan acuan dari pangkalan data NCBI (Dissanayake *et al.* 2020). Pohon filogeni yang menunjukkan hubungan kekerabatan baik cendawan endofit maupun cendawan patogen dengan strain-strain cendawan acuan dikonstruksi berdasarkan algoritma *Neighbor-Joining* dengan *bootstrap* 1000. Pohon filogeni dikonstruksi menggunakan program MEGA 5.1 (Kafi *et al.* 2022).

HASIL

Patogenisitas Cendawan Penyebab Bintik Mata Cokelat pada Daun Tanaman Kopi

Terdapat tiga isolat cendawan patogen yang terisolasi dari daun tanaman kopi arabika yang menunjukkan gejala penyakit bintik mata cokelat. Ketiga isolat tersebut memiliki perbedaan sifat dan warna koloni. Berdasarkan hasil uji patogenisitas yang telah dilakukan, ketiga isolat bersifat patogen terhadap daun tanaman kopi (Tabel 1). Perubahan miselium dan warna bintik yang muncul pada daun menjadi indikator untuk mengonfirmasi isolat cendawan patogen yang potensial.

Hasil uji patogenisitas masing-masing isolat menunjukkan gejala munculnya bintik yang berbeda. Sampel daun yang diinokulasikan dengan isolat PF2 menunjukkan perubahan dari bintik berwarna kuning hingga terbentuk halo dengan warna bintik paling luar adalah kuning, lapisan kedua berwarna cokelat, dan bagian tengah berwarna abu-abu. (Gambar 2a). Sampel yang diinokulasikan dengan isolat PF1 dan PF3 menunjukkan gejala bintik yang berwarna putih dan menjadi hitam, serta tidak terbentuk halo (Gambar 2b). Perubahan warna tersebut berhenti pada 30 hari setelah inokulasi cendawan patogen.



Gambar 2 Hasil uji patogenisitas pada daun tanaman kopi. a, bercak berwarna cokelat dan terbentuk halo pada daun yang diinokulasi dengan isolat PF2 dan b, bintik berwarna putih tanpa halo pada daun yang diinokulasi dengan isolat PF1 atau PF3.

(Figure 2 Results of pathogenicity tests on coffee plant leaves. a, brown spots and halo formation on leaves inoculated with PF2 isolate and b, white spots without halo on leaves inoculated with PF1 or PF3 isolate).

Tabel 1 Karakteristik gejala penyakit bintik mata cokelat pada daun tanaman kopi 14 hari setelah inokulasi (Table 1 Characteristics of symptoms of brown eyespot disease on coffee plant leaves 14 days after inoculation)

Isolat cendawan patogen (Pathogenic fungi isolate)	Gejala (Symptoms)	
	Warna (Colour)	Miselium (Mycelium)*
Kontrol (Control)	Tidak ada (Asymptomatic)	-
PF1	Putih (White)	+
PF2	Kuning kecokelatan (Brownish yellow)	++
PF3	Putih (White)	++

* -, tidak ada miselium (no mycelium); +, sedikit (few); dan ++, banyak (many)

Karakteristik Fenotip dan Identitas Spesies Cendawan Patogen

Berdasarkan pengujian patogenisitas disimpulkan bahwa isolat PF2 merupakan isolat patogen. Karakter permukaan atas koloni berwarna abu-abu (Gambar 3a), dasar koloni abu-abu kehitaman dengan bercak-bercak hitam yang tidak beraturan, dan diameter koloni 9 cm setelah 7 hari inkubasi (Gambar 3b).

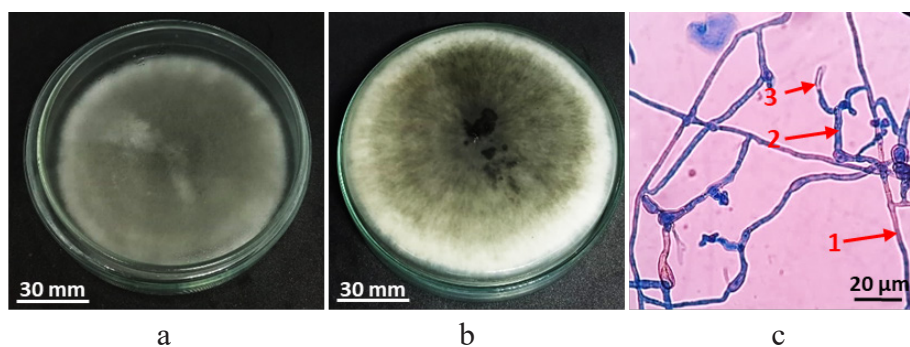
Karakteristik mikroskopis isolat cendawan patogen potensial menunjukkan konidium yang berbentuk obklavat dengan diameter 2.5-3.75 μm dan multisekat, konidiofor tidak bercabang, berwarna kecokelatan dengan diameter 2.5 μm dan multisekat (Gambar 3c). Berdasarkan hasil identifikasi tersebut dan dirujuk pada buku Barnett dan Hunter (1998),

diduga cendawan patogen potensial tersebut termasuk dalam genus *Mycosphaerella*.

Hasil identifikasi mikroskopis isolat PF2 dikonfirmasi melalui sekuensing fragmen 18S rDNA. Analisis sekuensing menunjukkan bahwa isolat PF2 memiliki similaritas 100% dengan *Mycosphaerella coffeicola*-PF2 (Gambar 4).

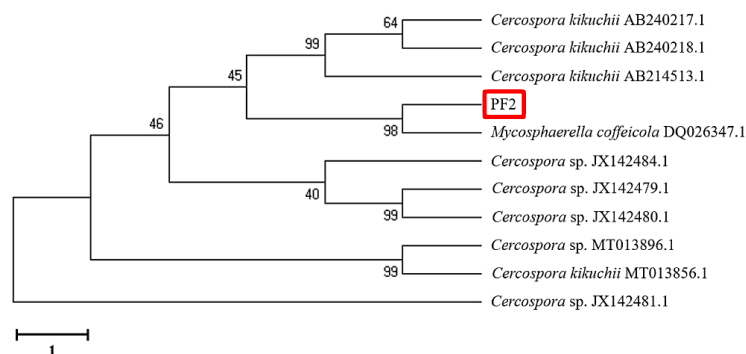
Potensi Cendawan Endofit Antagonisme terhadap Cendawan Patogen

Semua isolat cendawan endofit memiliki sifat antagonisme terhadap isolat cendawan penyebab bintik mata coklat daun tanaman kopi. Isolat cendawan endofit EF1 memiliki potensi penghambatan paling tinggi, yaitu sebesar 92.33% dan termasuk dalam kategori



Gambar 3 Cendawan penyebab penyakit bintik mata coklat daun tanaman kopi (isolat PF2). a, bagian permukaan atas koloni; b, bagian dasar koloni; dan c, pengamatan mikroskopis (1, hifa; 2, konidiofor; dan 3, konidium).

(Figure 3 Pathogenic fungi that cause brown eye spot disease on coffee leaves (PF2 isolate). a, the upper surface of the colony; b, the under side of the colony; and c, a microscopic image of pathogenic fungi (1, hyphae; 2, conidiophores; and 3, conidium)).



Gambar 4 Pohon filogeni isolat PF2 dengan strain cendawan acuan berdasarkan homologi sekuens 18S rDNA menurut algoritma Neighbor-Joining dan model Tamura-Nei.

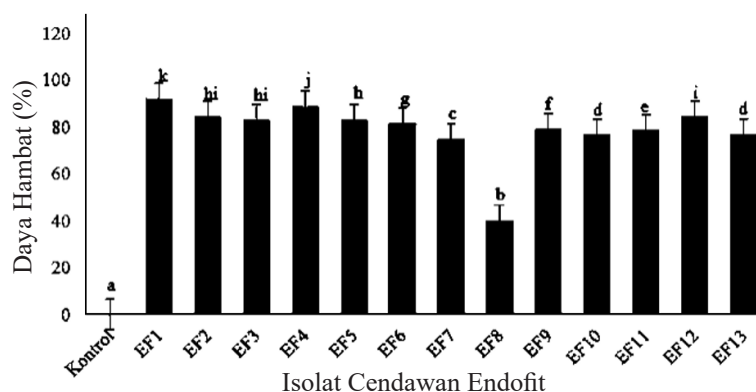
(Figure 4 Phylogenetic tree of PF2 isolates with reference fungi strains based on 18S rDNA sequence homology according to the Neighbor-Joining algorithm and the Tamura-Nei model).

sangat kuat untuk menghambat pertumbuhan cendawan patogen (Gambar 5). Isolat cendawan endofit EF8 memiliki potensi penghambatan terendah, yaitu sebesar 40.01% dan termasuk dalam kategori sedang.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa cendawan endofit EF1 diduga menghambat cendawan patogen bintik mata cokelat dengan mekanisme kompetisi dan mikoparasit (Gambar 6). Mekanisme kompetisi ditunjukkan dengan diameter koloni cendawan endofit yang lebih besar jika dibandingkan dengan diameter

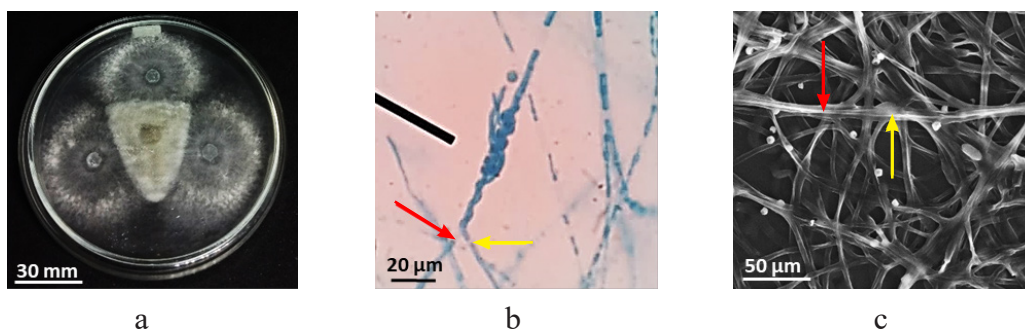
koloni cendawan patogen (Gambar 6a). Hal ini menunjukkan bahwa koloni cendawan endofit dapat memanfaatkan nutrisi secara maksimal sehingga pertumbuhannya lebih cepat dibandingkan koloni cendawan patogen dan mengakibatkan koloni cendawan patogen nampak lebih kecil.

Pemanfaatan nutrisi terjadi melalui proses pengenalan cendawan patogen oleh cendawan endofit yang disertai dengan penetrasi. Penetrasi melalui mekanisme hifa cendawan endofit membelit hifa cendawan patogen



Gambar 5 Daya hambat cendawan endofit terhadap cendawan patogen (nilai batang yang tidak berbagi huruf yang sama memiliki perbedaan yang signifikan pada $p < 0.05$).

(Figure 5 Suppression level of endophytic fungus against pathogenic fungus (bar values that do not share the same letter have significant differences at $p < 0.05$)).



Gambar 6 Aktivitas antagonisme cendawan endofit terhadap cendawan penyebab penyakit bintik mata cokelat daun kopi. a, kompetisi cendawan endofit dan cendawan patogen; b, mekanisme mikoparasit, hifa cendawan endofit membelit hifa cendawan patogen (→, hifa cendawan patogen dan →, hifa cendawan endofit); dan c, scanning electron micrograph (SEM) mekanisme mikoparasit, hifa cendawan endofit menembus hifa cendawan patogen (→, hifa cendawan patogen dan →, hifa cendawan endofit).

(Figure 6 Antagonistic activity of endophytic fungi against pathogenic fungi that cause brown eye spot disease on coffee leaves. a, competition between endophytic fungi and pathogenic fungi; b, mycoparasite mechanism, endophytic fungi hyphae entangle with pathogenic fungi hyphae (→, pathogenic fungi hyphae and →, endophytic fungi hyphae); and c, scanning electron micrograph (SEM) showing mechanism of mycoparasites, endophytic fungi hyphae penetrate pathogenic fungi hyphae (→, pathogenic fungi hyphae and →, endophytic fungi hyphae).

(Gambar 6b) ataupun mekanisme hifa cendawan endofit menembus hifa cendawan patogen (Gambar 6c), sehingga merusak hifa cendawan patogen. Kerusakan dinding sel dan membran sel cendawan patogen mengakibatkan cairan sitoplasma keluar beserta nutrisi dan enzim, sehingga dapat menghambat proses metabolisme cendawan patogen.

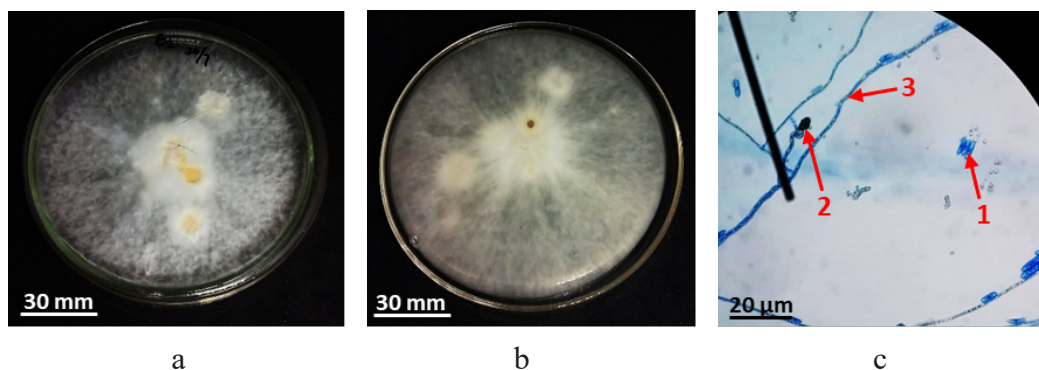
Karakteristik Fenotip Isolat Potensial Cendawan Endofit

Cendawan endofit EF1 memiliki potensi penghambatan tertinggi terhadap pertumbuhan cendawan penyebab bintik mata cokelat daun tanaman kopi. Karakter fenotip isolat cendawan endofit EF1 adalah bagian atas koloni berwarna putih dengan bintik-bintik

oranye tidak beraturan (Gambar 7a), dasar koloni putih keabuan, diameter koloni 9 cm setelah inkubasi 6 hari (Gambar 7b).

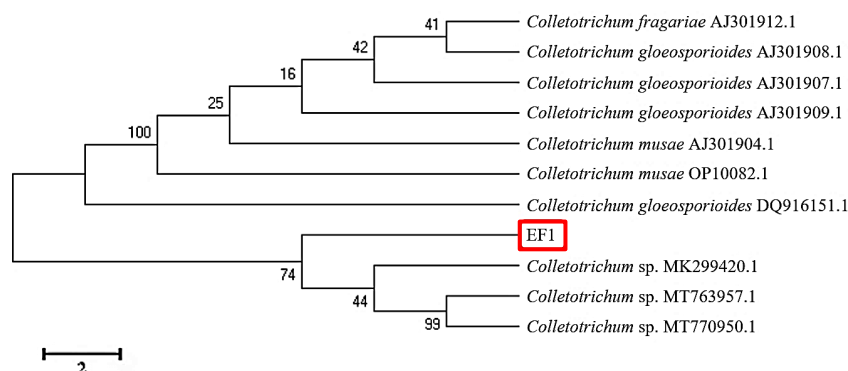
Hifa berdinding halus, bersekat dengan diameter 3-7.5 μm , konidium berbentuk oval dengan diameter 2.25-2.75 μm dan panjang 8.75-12 μm . Apresorium berwarna kecokelatan dengan diameter 6-6.5 μm dan panjang 9-12 μm (Gambar 7c). Hasil identifikasi secara mikroskopis yang didapatkan dirujuk pada buku identifikasi Barnett dan Hunter (1998) dan diduga cendawan endofit antagonis tersebut termasuk dalam genus *Colletotrichum*.

Hasil identifikasi secara mikroskopis didukung dengan hasil identifikasi berdasarkan homologi sekuens 18S rDNA. Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa isolat



Gambar 7 Cendawan endofit antagonis terhadap cendawan penyebab bintik mata cokelat daun tanaman kopi. a, bagian permukaan atas koloni; b, bagian dasar koloni; dan c, pengamatan mikroskopis cendawan patogen (1, konidium; 2, apresorium; dan 3, hifa).

(Figure 7 Endophytic fungi that are antagonistic to pathogenic fungi that cause brown eyespots on coffee leaves. a, upper surface of the colony; b, the under side of the colony; and c, microscopic image of pathogenic fungi (1, conidium; 2, appressorium; and 3, hyphae).



Gambar 8 Pohon filogeni isolat EF1 dengan strain-strain cendawan acuan berdasarkan sekuens 18S rDNA menurut algoritma *Neighbor-Joining* dan model *Tamura-Nei*.

(Figure 8 Phylogenetic tree of EF1 isolates with reference fungi strains based on 18S rDNA sequences according to the *Neighbor-Joining* and *Tamura-Nei* model)

cendawan endofit EF1 memiliki similaritas 99.94% dengan *Colletotrichum* sp.-EF1 (Gambar 8).

PEMBAHASAN

Hasil uji patogenesis menunjukkan bahwa terdapat perbedaan karakter gejala munculnya bintik mata cokelat daun tanaman kopi. Hal ini dipengaruhi oleh kecepatan pertumbuhan masing-masing isolat cendawan patogennya. Berdasarkan pengamatan uji patogenesis pada daun tanaman kopi selama masa inkubasi menunjukkan setiap isolat cendawan patogen memiliki kecepatan pertumbuhan miselium dan gejala yang berbeda. Proses infeksi cendawan patogen dimulai dengan perkecambahan spora, kemudian hifa menembus stomata daun tanaman inang. Setelah itu hifa cendawan patogen menyebar di jaringan mesofil dan menghasilkan toksin yang dapat menyebabkan nekrosis sel dan muncul bintik mata cokelat pada daun (Tan *et al.* 2023).

Mycosphaerella coffeicola merupakan penyebab bintik mata cokelat daun tanaman kopi yang bereproduksi secara seksual dan sering disebut sebagai tahap aseksual *Cercospora coffeicola* (Groenewald *et al.* 2005). Karakteristik yang teridentifikasi pada isolat sesuai dengan penelitian Shivas *et al.* (2015) bahwa bagian dasar koloni *Cercospora* sp. pada medium ADK berwarna keabuan dengan bintik mata cokelat yang lebih gelap dan tidak beraturan (*irregular*). Konidiofor *C. coffeicola* muncul dari bagian stomata, tidak bercabang, bersekat, dan berbentuk silinder lurus ataupun melengkung, serta memiliki warna cokelat kekuningan hingga cokelat gelap. *Cercospora coffeicola* memiliki bentuk konidium seperti jarum (*acicular*) hingga seperti silinder hingga berbentuk seperti buah labu (*obclavate*), lurus ataupun melengkung, dan bersekat (Phengsintham *et al.* 2013). Konidium *C. coffeicola* sebagian besar berkecambah dari ujung dan sel basal. Setiap konidium menghasilkan satu hingga beberapa tabung germinal dan apresoriumnya tidak berkembang pada bagian permukaan daun (Souza *et al.* 2011). Sebagian besar tabung germinal yang terletak

pada permukaan abaksial daun cenderung mengarah pada stomata, sedangkan tabung germinal pada permukaan adaksial daun tumbuh secara acak dan akan masuk ke stomata terdekat serta melalui penetrasi jika letak stomata lebih jauh. Jarak antara konidium dengan stomata memengaruhi kecepatan perkecambahannya (Babu *et al.* 2007).

Pertumbuhan *Cercospora* sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungannya, terutama suhu dan cahaya. Cahaya dan suhu dapat menghambat pertumbuhan vegetatif dan proses reproduksi sebagian besar cendawan (Silva *et al.* 2016). Suhu berperan dalam produksi protein dan enzim untuk menunjang pertumbuhan koloni cendawan, sporulasi, dan perkecambahan konidium. Cahaya berperan dalam pembentukan struktur reproduksi (Schumann dan D'Arcy 2012).

Cendawan endofit memiliki kemampuan menghasilkan enzim yang terlibat dalam mekanisme mikoparasit yang spesifik (Bhardwaj *et al.* 2023). Aktivasi mekanisme antagonisme didukung oleh produksi senyawa dan metabolit tertentu, seperti faktor pertumbuhan tanaman, enzim hidrolitik, dan antibiotik. *Colletotrichum* sp. dapat menghasilkan beberapa senyawa bioaktif seperti *aspergillomarasmine* A dan B, 10-hidroksi camptothecine, dan senyawa *colletolide* A dan B yang memiliki aktivitas antimikrob (Li *et al.* 2019). *Colletotrichum* mampu menghasilkan senyawa 2-feniletil 1 H-indol-3-il-asetat dan tujuh senyawa, yaitu urasil, siklo-(S-Pro-S-Tyr), siklo-(S-Pro-S-Val), 4-hidroksi-benzamid, 2(2-aminofil) asam asetat, 2(4-hidroksifenil) asam asetat, dan 2(2-hidroksifenil) asam asetat yang memiliki aktivitas anticendawan asetilkolinesterase (AChE), serta antikanker (Chapla *et al.* 2014). Pada mekanisme mikoparasit, cendawan endofit menghambat pertumbuhan cendawan patogen dengan memanfaatkan nutrisi cendawan patogen (Rajani *et al.* 2021).

Mekanisme antagonisme yang terjadi melalui mekanisme kompetisi dan mikoparasit. Pada mekanisme kompetisi, cendawan endofit memanfaatkan nutrisi yang ada dan dapat tumbuh lebih besar jika dibandingkan dengan

cendawan patogen. Pada mikoparasit, terjadi pemanfaatan nutrisi cendawan patogen oleh cendawan endofit melalui proses pengenalan cendawan patogen oleh cendawan endofit yang disertai dengan serangan, kemudian terjadi proses penetrasi hifa cendawan endofit terhadap hifa cendawan patogen, sehingga mengakibatkan struktur hifa cendawan patogen mengalami kerusakan (Latz *et al.* 2018). Penetrasi tersebut dapat melalui mekanisme hifa cendawan endofit membelit hifa cendawan patogen ataupun mekanisme hifa cendawan endofit menembus hifa cendawan patogen, sehingga merusak hifa cendawan patogen. Setelah itu, cendawan endofit berhasil menghambat pertumbuhan cendawan patogen yang mengakibatkan cendawan patogen mengalami kematian. Selama proses mikoparasit terjadi, cendawan endofit menghasilkan enzim yang mampu mendegradasi dinding sel cendawan patogen (Rajani *et al.* 2021). Kerusakan pada dinding sel dan membran sel cendawan patogen mengakibatkan air dalam sitoplasma keluar beserta nutrisi dan enzim, sehingga mengakibatkan terhambatnya proses metabolisme cendawan patogen. Metabolisme yang terhambat mengakibatkan jumlah ATP menurun sehingga aktivitas dan pertumbuhan hifa terhambat. Hal ini mengakibatkan pertumbuhan koloni terhambat dan mengalami kematian sel (Simamora *et al.* 2021). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian bahwa pertumbuhan koloni cendawan patogen tidak maksimal.

Karakteristik isolat cendawan endofit menunjukkan bahwa pada bagian atas dan bawah koloni terdapat bintik-bintik berwarna oranye. Bintik-bintik oranye tersebut merupakan aservulus yang berisi massa konidium dan tampak jelas pada pusat koloni (Rangkuti *et al.* 2017). Selain itu, terdapat apresorium berfungsi untuk membantu hifa cendawan endofit berpenetrasi ke dalam hifa cendawan patogen. Apresorium diproduksi ketika cendawan tersebut memerlukan akses untuk memperoleh nutrisi (Cethana *et al.* 2021). Berdasarkan similaritas sekuens 18S rDNA menunjukkan bahwa cendawan endofit tersebut adalah *Colletotrichum* sp.-EF1. *Colletotrichum* sering dilaporkan sebagai spesies cendawan endofit

yang dapat ditemukan pada berbagai tanaman dari daerah tropis salah satunya adalah kopi arabika (Costa *et al.* 2012). *Colletotrichum* merupakan salah satu cendawan endofit yang paling umum ditemukan pada sistem pertanian kopi konvensional dan organik di Brazil (Oliveira *et al.* 2014). *Colletotrichum* juga dilaporkan sebagai cendawan endofit yang secara umum terdapat pada tanaman kopi di perkebunan kopi Taiwan (Wu *et al.* 2022). *Colletotrichum* memiliki peran mendorong pertumbuhan, perkembangan, dan proteksi terhadap tanaman inang (Oliveira *et al.* 2014). Selain itu, *Colletotrichum* sp. mampu menekan pertumbuhan cendawan patogen dengan cara menyekresikan senyawa antibiotik dan mikoparasit terhadap cendawan patogen (Li *et al.* 2019).

Beberapa cendawan endofit dalam penelitian ini memiliki aktivitas antagonisme terhadap cendawan patogen *M. coffeicola*. *Colletotrichum* sp. memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan cendawan patogen *M. coffeicola* sebesar 92.33% melalui mekanisme antagonisme kompetisi dan mikoparasit, sehingga dapat disimpulkan bahwa cendawan endofit *Colletotrichum* sp. berpotensi sebagai agens hayati untuk mengendalikan pertumbuhan cendawan patogen *M. coffeicola* penyebab penyakit bintik mata coklat daun tanaman kopi dan dapat dijadikan sebagai rekomendasi biopestisida pengendalian penyakit bintik mata coklat daun tanaman kopi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah mendukung penulisan artikel ini, pemilik perkebunan kopi yang telah memberikan izin pengambilan sampel daun tanaman kopi dan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya yang telah menyediakan laboratorium untuk penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

Akram S, Ahmed A, He P, He P, Liu Y, Wu Y, Munir S, He Y. 2023. Uniting the

- role of endophytic fungi against plant pathogens and their interaction. *Journal of Fungi*. 9(1):72. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof9010072>.
- Al-Rashdi FKH, Al-Sadi AM, Al-Riyamy BZ, Maharachchikumbura SS, Al-Sabahi JN, Velazhahan R. 2022. Endophytic fungi from the medicinal plant *Aloe dhufarensis* Lavranos exhibit antagonistic potential against phytopathogenic fungi. *South African Journal of Botany*. 147: 1078–1085. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.05.022>.
- Ashari KIAH, Rosli NM, Azmi NSA. 2020. Isolation and preliminary screening of endophytic fungi from *Ficus carica* for biocontrol and phosphate solubilization. *Environment and Ecosystem Science*. 4(2):77–84. DOI: <http://doi.org/10.26480/ees.02.2020.77.84>.
- Babu AM, Philip T, Kumar V. 2007. Development of the brown eye spot fungus, *Cercospora ricinella*, on castor leaf – an SEM account. *Journal of Phytopathology*. 155(7-8):426–430. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01253.x>.
- Barnett HL, Hunter BB. 1988. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Minnesota (MN): APS Press.
- Bhandari S, Nepal S, Banstola R, Thapaliya B, Poudel A. 2022. Ecofriendly management of *Cercospora* leaf spot, *Cercospora coffeicola* (Berk & MA Curtis) disease of coffee in Gulmi. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. 127(7):111–123.
- Bhardwaj M, Kailoo S, Khan RT, Khan SS, Rasool S. 2023. Harnessing fungal endophytes for natural management: a biocontrol perspective. *Frontiers in Microbiology*. 14:1280258. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1280258>.
- Chapla VM, Zeraik ML, Leptokarydis IH, Silva GH, Bolzani VS, Young MCM, Pfenning LH, Araujo AR. 2014. Antifungal compounds produced by *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus from *Michelia champaca*. *Molecules*. 19(11):19243–19252. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules191119243>.
- Chethana KWT, Jayawardena RS, Chen YJ, Konta S, Tibpromma S, Abeywickrama PD, Gomdola D, Balasuriya A, Xu J, Lumyong S, Hyde KD. 2021. Diversity and function of appressoria. *Pathogens*. 10(6):746. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens10060746>.
- Costa IPMW, Assuncao MMC, Lima TEF, Oliveira RJV, Cavalcanti MAQ. 2012. CCC. *Mycotaxon*. 119:493–494.
- Darwesh OM, El-Maraghy SH, Abdel-Rahman HM, Zaghloul RA. 2020. Improvement of paper wastes conversion to bioethanol using novel cellulose degrading fungal isolate. *Fuel*. 262:116518. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116518>.
- De Silva NI, Brooks S, Lumyong S, Hyde KD. 2019. Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews*. 33(2): 133–148. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.10.001>.
- Dissanayake AJ, Bhunjun CS, Maharachchikumbura SSN, Liu JK. 2020. Applied aspects of methods to infer phylogenetic relationships amongst fungi. *Mycosphere*. 11(1):2652–2676. DOI: <https://doi.org/10.5943/mycosphere/11/1/18>.
- Fadiji AE, Babalola OO. 2020. Exploring the potentialities of beneficial endophytes for improved plant growth. *Saudi Journal of Biological Science*. 27(12):3622–3633. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.002>.
- Firmansyah R, Nazimah, Rafli M, Safrizal, Faisal. 2022. Respon perkecambahan benih kopi arabika (*Coffea arabica* L.) pada beberapa konsentrasi dan lama perendaman telur keong mas (*Pomacea canaliculata* L.). *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Agroekoteknologi*. 1(2):39–42. DOI: <https://doi.org/10.29103/jimatek.v1i2.8464>.
- Groenewald M, Groenewald JZ, Crous PW. 2005. Distinct species exist within the *Cercospora apii* morphotype. *Phytopathology*. 95(8):951–959. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0951>.

- Hadziavdic K, Lekang K, Lanzen A, Jonassen I, Thompson EM, Troedsson C. 2014. Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. PLoS ONE. 9(2):e87624. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087624>.
- Hastuti US. 2017. Antagonisme antara Kapang Antagonis dan Kapang Patogen. Malang (ID): UMM Press.
- Herkert PF, Gomes RR, Muro MD, Pinheiro RL, Fornari G, Vicente VA, Queiroz-Telles F. 2015. In vitro susceptibility and molecular characterization of *Candida* spp. from candidemic patients. Revista Iberoamericana de Micología. 32(4): 221–228. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.riam.2014.07.007>.
- Hutter HP, Khan AW, Lemmerer K, Wallner P, Kundi M, Moshhammer H. 2018. Cytotoxic and genotoxic effects of pesticide exposure in male coffee farmworkers of the Jarabacoa Region, Dominican Republic. International Journal of Environmental Research and Public Health. 15(8):1641. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph15081641>.
- Ikram M, Ali N, Jan G, Jan FG, Rahman IU, Iqbal A, Hamayun M. 2018. IAAproducing fungal endophyte *Penicillium roqueforti* Thom., enhances stress tolerance and nutrients uptake in wheat plants grown on heavy metal contaminated soils. PLOS ONE. 13(11):e0208150. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208150>.
- Kafi ZZ, Ghalyanchilangeroudi A, Nikaein D, Marandi A, Rahmati-Holasoo H, Sadri N, Erfanmanesh A, Enayati A. 2022. Phylogenetic analysis and genotyping of Iranian infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) based on the glycoprotein gene. Veterinary Medicine and Science. 8(6):2411–2417. DOI: <https://doi.org/10.1002/vms3.931>.
- Latz MAC, Jensen B, Collinge DB, Jorgensen HJL. 2018. Endophytic fungi as biocontrol agents: elucidating mechanisms in disease suppression. Plant Ecology and Diversity. 11:555–567. DOI: <https://doi.org/10.1080/17550874.2018.1534146>.
- Li Y, Wei W, Wang RL, Liu F, Wang YK, Li R, Khan B, Lin J, Yan W, Ye YH. 2019. Colletolides A and B, two new γ -butyrolactone derivatives from the endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. Phytochemistry Letters. 33:90–93. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.08.004>.
- Nainggolan R, Saefumillah A, Saefudin E, Putra YP. 2024. Metabolite formation of pesticide isoprocab in coffee beans during short-term storage and condition. Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi. 27(2):45–52. DOI: <https://doi.org/10.14710/jksa.27.2.45-52>.
- Nasr SH, Mousa ASM, Yasser MM, Marzouk MA. 2021. Antagonistic potential of some phosphate solubilizing fungi against some phytopathogenic fungi. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences. 10:1–11. DOI: <https://doi.org/10.1186/s43088-021-00159-y>.
- Oliveira RJV, Souza RG, Lima TEF, Cavalcanti MAQ. 2014. Endophytic fungal diversity in coffee leaves (*Coffea arabica*) cultivated using organic and conventional crop management systems. Mycosphere. 5(4):523–530. DOI: <https://doi.org/10.5943/mycosphere/5/4/4>.
- Phengsintham P, Braun U, McKenzie EHC, Chukeatirote E, Cai L, Hyde KD. 2013. Monograph of Cercosporoid fungi from Thailand. Plant Pathology and Quarantine Journal. 3(2):67–138. DOI: <https://doi.org/10.5943/ppq/3/2/2>.
- Purwanto E, Erfit, Mustika C. 2021. Analisis faktor-faktor yang mempengaruhi ekspor kopi Indonesia ke Jepang periode 2000-2017. E-Journal Perdagangan Industri dan Moneter. 9(1):23–34. DOI: <https://doi.org/10.22437/pim.v9i1.7842>.
- Rajani P, Rajasekaran C, Vasanthakumari MM, Olsson SB, Ravikanth G. 2021. Inhibition of plant pathogenic fungi by endophytic *Trichoderma* spp. through mycoparasitism and volatile organic compounds. Microbiological Research.

- 242(1):1–12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126595>.
- Rangkuti EE, Wiyono S, Widodo W. 2017. Identifikasi *Colletotrichum* spp. asal tanaman pepaya. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. 13(5):175–183. DOI: <https://doi.org/10.14692/jfi.13.5.175>.
- Saucedo-Garcia A, Anaya AL, Espinosa-Garcia FJ, Gonzalez MC. 2014. Diversity and communities of foliar endophytic fungi from different agroecosystems of *Coffea arabica* L. in two regions of Veracruz. Mexico. *PLoS ONE*. 9(6):1–11. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098454>.
- Schumann GL, D'Arcy CJ. 2012. Review of hungry planet: stories of plant diseases essential plant pathology. Saint Paul (MN): APS.
- Shivas RG, Marney ST, Tan YP, McTaggart AR. 2015. Novel species of *Cercospora* and *Pseudocercospora* (Capnodiales, *Mycosphaerellaceae*) from Australia. *Fungal Biology Journal*. 119(5): 362–369. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.09.004>.
- Silva MG, Pozza EA, Monteiro FP, Lima CV. 2016. Effect of light and temperature on *Cercospora coffeicola* and *Coffea arabica* pathosystem. *Coffee Science*. 11:148–160.
- Simamora AV, Hahuly MV, Henuk JBD. 2021. Endophytic fungi as potential biocontrol agents of *Phytophthora palmivora* in the cocoa plant. *Biodiversitas*. 22(5): 2601–2609. DOI: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220519>.
- Souza AGC, Rodrigues FA, Maffia LA, Mizubuti ESG. 2011. Infection process of *Cercospora coffeicola* on coffee leaf. *Journal of Phytopathology*. 159(1): 6–11. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01710.x>.
- Tan W, Li K, Liu D, Xing W. 2023. *Cercospora* leaf spot disease of sugar beet. *Plant Signal Behav*. 18(1):2214765. DOI: <https://doi.org/10.1080/15592324.2023.2214765>.
- Thi Minh Le T, Thi Hong Hoang A, Thi Bich Le T, Thi Bich Vo T, Van Quyen D, Hoang Chu H. 2019. Isolation of endophytic fungi and screening of Huperzine A-producing fungus from *Huperzia serrata* in Vietnam. *Scientific Reports*. 9(1):16152. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52481-2>.
- Thoriq A, Sugandi WK, Sampurno RM, Soleh MA. 2019. Pengetahuan dan tindakan petani dalam pengendalian organisme pengganggu tanaman kopi berbasis agroforestri di Kecamatan Sukasari, Kabupaten Sumedang, Jawa Barat. *Jurnal Penelitian Sosial dan Ekonomi Kehutanan*. 17(3):209–219.
- Widyawati AC. 2018. Diagnosa penyakit tanaman kopi dengan menggunakan backward chaining pada Kabupaten Tanggamus. *Seminar Nasional Teknologi dan Bisnis*. 1(1):189–197.
- Wiryadiputra S. 2014. Evaluasi Tanaman Kopi Asal Bibit dari Puslitkota Kerjasama dengan Nestle di Kabupaten Tanggamus. *Laporan Kunjungan*. Lampung.
- Wu CJ, Hsu SL, Lai SY, Lin MC, Ni HF. 2022. Study of endophytic *Colletotrichum* spp. in coffee leaves in Taiwan. DOI: 10.6156/JTAR.202209_71(3.0005).
- Yassin MT, Mostafa AAF, Al-Askar AA. 2022. In vitro antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against fungal pathogens causing black point disease of wheat. *Journal of Taibah University for Science*. 16(1):57–65. DOI: <https://doi.org/10.1080/16583655.2022.2029327>.
- Zhao X, Hou D, Xu J, Wang K, Hu Z. 2022. Antagonistic activity of fungal strains against *Fusarium crown rot*. *Plants*. 11(3): 255. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants11030255>.