



**AKTIVITAS ENZIM PEROKSIDASE, KATALASE, DAN KANDUNGAN
PROTEIN PADA KAKAO (*Theobroma cacao* L.) HASIL MUTASI
MENGUNAKAN *ETHYL METHANE SULFONATE* (EMS)**

SKRIPSI

**Oleh
Marlinda
NIM. 061510101188**

**PS AGRONOMI-AGROINDUSTRI KOPI DAN KAKAO
JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2010**



**AKTIVITAS ENZIM PEROKSIDASE, KATALASE, DAN KANDUNGAN
PROTEIN PADA KAKAO (*Theobroma cacao* L.) HASIL MUTASI
MENGUNAKAN *ETHYL METHANE SULFONATE* (EMS)**

SKRIPSI

Diajukan Guna Memenuhi Salah Satu Syarat Untuk Menyelesaikan Program
Sarjana Pada PS. Agronomi-Agroindustri Spesifik Kopi dan Kakao
Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian
Universitas Jember

Oleh
Marlinda
NIM. 061510101188

**PS AGRONOMI-AGROINDUSTRI KOPI DAN KAKAO
JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2010**

SKRIPSI BERJUDUL

**AKTIVITAS ENZIM PEROKSIDASE, KATALASE, DAN KANDUNGAN
PROTEIN PADA KAKAO (*Theobroma cacao* L.) HASIL MUTASI
MENGUNAKAN *ETHYL METHANE SULFONATE* (EMS)**

Oleh

**Marlinda
NIM. 061510101188**

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Ir. Miswar, M.Si.

Dosen Pembimbing Anggota : Tri Handoyo, SP., Ph.D.

Skripsi Berjudul: **Aktivitas Enzim Peroksidase, Katalase, dan Kandungan Protein pada Kakao (*Theobroma cacao* L.) Hasil Mutasi Menggunakan *Ethyl Methane Sulfonate* (EMS)**; telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Pertanian pada:

Hari : Kamis
Tanggal : 24 Juni 2010
Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Tim Penguji
Penguji 1,

Dr. Ir. Miswar, M.Si.
NIP. 196410191990021002

Penguji 2,

Penguji 3,

Tri Handoyo, SP., Ph.D.
NIP. 197112021998021001

Dr. Ir. Slameto, M.P
NIP. 196002231987021001

MENGESAHKAN
Dekan,

Dr. Ir. Bambang Hermiyanto, MP
NIP. 196111101988021001

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Marlinda

NIM : 061510101188

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul: **“Aktivitas Enzim Peroksidase, Katalase, dan Kandungan Protein pada Kakao (*Theobroma cacao* L.) Hasil Mutasi Menggunakan *Ethyl Methane Sulfonate* (EMS)”** adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Juni 2010
Yang menyatakan,

Marlinda
NIM. 061510101188

**Aktivitas Enzim Peroksidase, Katalase, dan Kandungan Protein
pada Kakao (*Theobroma cacao* L.) Hasil Mutasi
Menggunakan *Ethyl Methane Sulfonate* (EMS)**

Marlinda

Jurusan Budidaya Pertanian Agroindustri Spesifik Kopi dan Kakao
Fakultas Pertanian Universitas Jember

ABSTRAK

Kakao merupakan komoditas perkebunan yang peranannya cukup penting bagi perekonomian nasional. Namun, produktivitas kakao di Indonesia masih sangat rendah. Rendahnya produktivitas kakao di Indonesia disebabkan oleh penyakit busuk buah kakao. Salah satu cara untuk memperoleh klon unggul yaitu dengan melakukan mutasi terhadap biji kakao menggunakan EMS. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas enzim peroksidase dan katalase, serta kandungan protein pada kakao hasil mutasi menggunakan EMS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa Kakao hasil mutasi menggunakan EMS kategori rentan, moderat, dan tahan terhadap *P. palmivora* memiliki aktivitas relatif enzim peroksidase masing-masing sebesar 12,950; 16,700; dan 13,786 U/mL enzim/jam, aktivitas spesifik 66,597; 82,969; dan 72,878 U/mg protein/jam, sedangkan aktivitas relatif katalase 3,871; 5,559; dan 2,017 %/mL enzim/jam, aktivitas spesifik 22,675; 27,328; dan 10,436 %/mg protein/jam, kandungan protein adalah 6,627; 6,837; dan 8,772 mg/g sampel. Hasil elektroforesis protein menunjukkan adanya perubahan pola pita protein pada tanaman kakao hasil mutasi menggunakan EMS. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa aktivitas enzim peroksidase dan katalase tertinggi terdapat pada kakao kategori moderat dibandingkan dengan dengan kategori rentan dan resisten.

Kata Kunci: Kakao, EMS, Peroksidase, Katalase, dan Protein

**The Enzyme Activities of Peroxidase, Catalase, and Protein Content
on Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Resulted from Mutation
Using *Ethyl Methane Sulfonate* EMS;**

Marlinda

Agronomy Department of Specific Agroindustry of Coffee and Cocoa,
Faculty of Agriculture, Jember University

ABSTRACT

Cocoa is a plantation commodity whose role is important enough for the national economy. However, the productivity of cocoa in Indonesia is still very low. The low productivity of cocoa in Indonesia is caused by pod rot disease of cacao (*Phytophthora palmivora*). One of methods to obtain best clones is by mutation of cocoa seed using EMS. The purpose of this study is to identify the activities of peroxidase and catalase as well as protein content on cocoa resulted from mutation using EMS. The research result showed that cocoa resulted from mutation using EMS in susceptible, moderate, and resistant categories to *P. palmivora* had relative activity of peroxidase respectively by 12,950; 16,700; and 13,786 U/mL enzyme/hour, the specific activities by 66,597; 82,969; and 72,878 U/mg protein/hour, while the relative catalase activities by 3,871; 5,559; and 2,017 %/mL enzyme/hour, the specific activities by 22,675; 27,328; and 10,436 %/mg protein/hour, the protein content was 6,627; 6,837; and 8,772 mg/g sample. The result of protein electrophoresis showed the changes of the protein banding pattern on cocoa crop by mutation using EMS. From the results of this study, it can be concluded that the highest activities of peroxidase and catalase are on the cocoa of moderate category compared with susceptible and resistant categories.

Key words: Cacao, EMS, Peroxidase, Catalase, and Protein

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT. atas limpahan nikmat dan karunia-Nya sehingga penyusunan skripsi yang berjudul “**Aktivitas Enzim Peroksidase, Katalase, dan Kandungan Protein pada Kakao (*Theobroma cacao* L.) Hasil Mutasi Menggunakan Ethyl Methane Sulfonate (EMS)**” ini dapat diselesaikan sesuai dengan waktu yang telah ditetapkan.

Penelitian dan penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Miswar, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama atas bantuannya baik moril maupun materiil serta bimbingan dan arahnya selama penelitian dan penyusunan karya ilmiah ini.
2. Dr. Tri Handoyo, S.P., selaku Dosen Pembimbing Anggota atas bantuannya baik moril maupun materiil serta bimbingan dan arahnya selama penelitian dan penyusunan karya ilmiah ini.
3. Kementerian Pendidikan Nasional, yang telah membiayai studi melalui Program Beasiswa Unggulan Program Studi Agronomi-Agroindustri Spesifik Kopi dan Kakao di Fakultas Pertanian Universitas Jember.
4. Pemerintah Daerah Kabupaten Berau yang telah memberikan bantuan dan dukungannya, sehingga studi ini dapat selesai tepat waktu.
5. Ir. H. Irwan Sadiman, MP., selaku Dosen Pembimbing Akademik atas bimbingan dan arahnya kepada penulis selama menempuh pendidikan di Fakultas Pertanian Universitas Jember .
6. Dr. Ir. Bambang Hermiyanto, M.P., selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember; Ir. Bambang Kusmanadhi, M.Sc., selaku Ketua Jurusan Jurusan Budidaya Pertanian; Ir. Usmani M.P., selaku Ketua Program Beasiswa Unggulan Fakultas Pertanian Universitas Jember; dan Bapak Edi Pitaya, selaku pegawai bagian akademik Fakultas Pertanian Universitas Jember yang telah banyak membantu selama penulis menempuh pendidikan tinggi di Universitas Jember.

7. Mas Ali Muhammad Yusuf Shofa, S.Si., yang telah banyak membantu dan membimbing selama penelitian.
8. Teman-teman Mahasiswa Beasiswa Unggulan Fakultas Pertanian Universitas Jember angkatan 2006, terima kasih atas kebersamaan dan bantuan kalian semua.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan karya ilmiah ini yang tidak dapat kami sebutkan satu per satu.

Penulis menyadari masih terdapat banyak kekurangan dalam karya ilmiah ini. Oleh karena itu, saran yang bersifat membangun kami harapkan demi perbaikan dimasa yang akan datang. Semoga karya ini dapat bermanfaat bagi penulis dan menambah wawasan serta pengetahuan bagi pembaca.

Jember, Juni 2010

Penulis

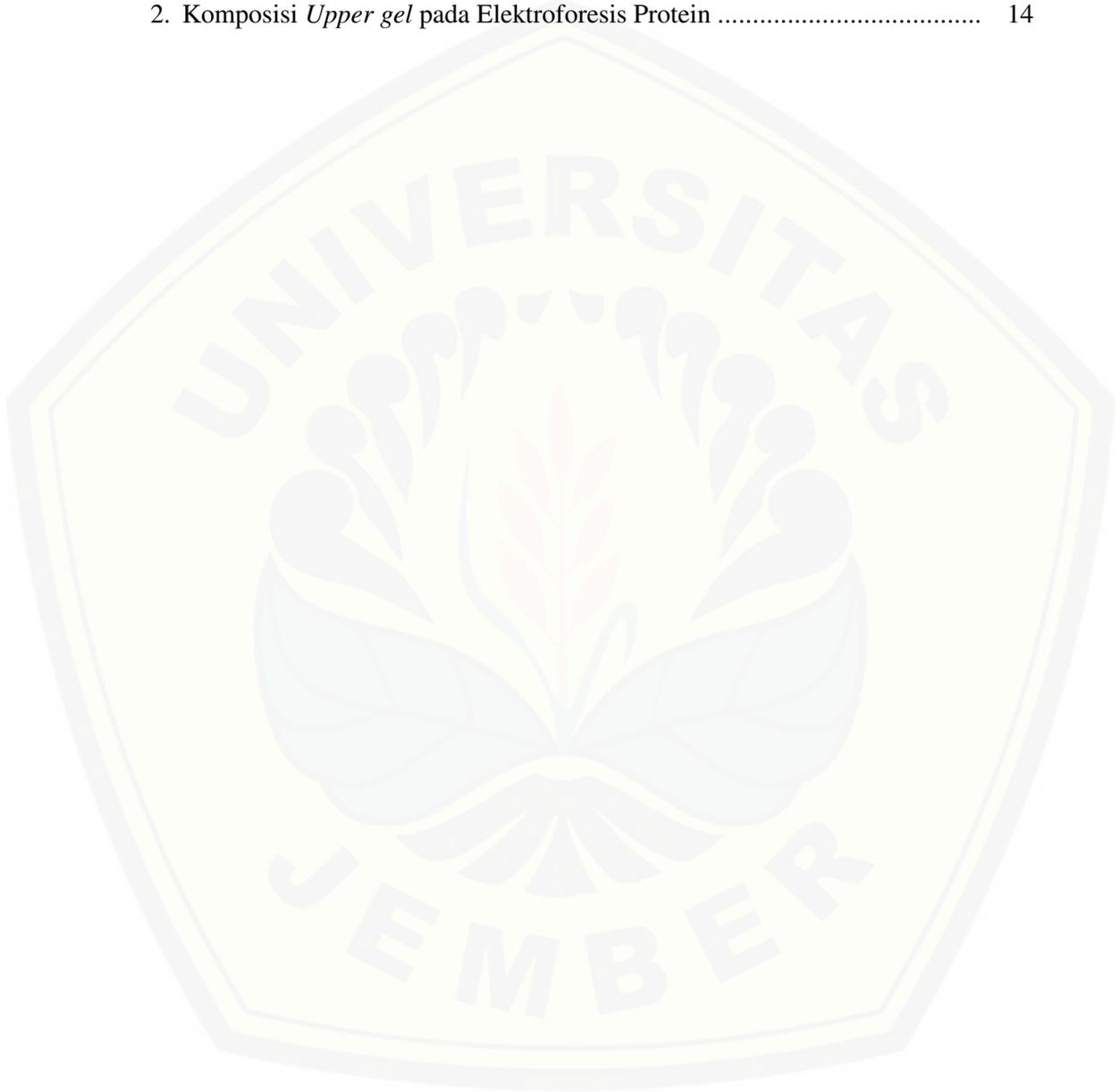
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PEMBIMBING	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
PRAKATA	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Deskripsi Tanaman Kakao	4
2.2 Penyakit Busuk Buah Kakao (<i>P. palmivora</i>)	4
2.3 Ethyl Methane Sulfonate (EMS)	6
2.4 Enzim Peroksidase	7
2.5 Enzim Katalase	9
2.6 Protein	10
2.6 Hipotesis.....	11
III. METODE PENELITIAN	12
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	12

3.2 Bahan dan Alat	12
3.3 Metode	12
3.4 Parameter Pengamatan	12
3.4.1 Ekstraksi Protein dan Pengukuran Kandungan Protein	12
3.4.2 Ekstraksi dan Pengukuran Aktivitas Enzim Peroksidase	13
3.4.3 Pengukuran Enzim Katalase	13
3.4.4 Elektroforesis protein	14
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	16
4.1 Aktivitas Enzim Peroksidase pada Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS	16
4.2 Aktivitas Enzim Katalase pada Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS	17
4.3 Kandungan Protein pada Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS	19
4.4 Elektroforesis Protein pada Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS	20
V. KESIMPULAN DAN SARAN	22
5.1 Kesimpulan	22
5.2 Saran	22
DAFTAR PUSTAKA	23
LAMPIRAN	25

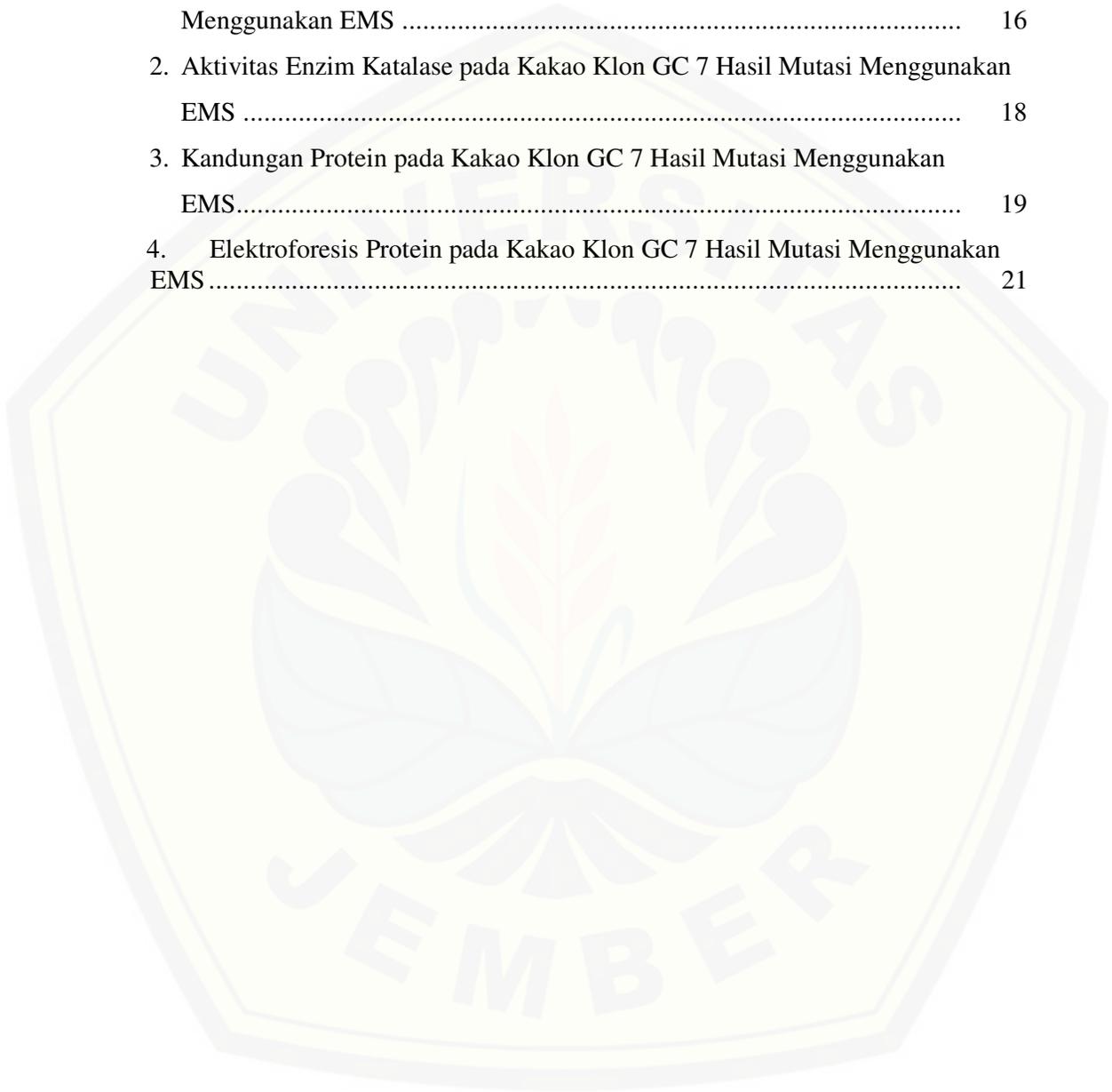
DAFTAR TABEL

1. Komposisi <i>Lower gel</i> pada Elektroforesis Protein	14
2. Komposisi <i>Upper gel</i> pada Elektroforesis Protein	14



DAFTAR GAMBAR

1. Aktivitas Enzim Peroksidase pada Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS	16
2. Aktivitas Enzim Katalase pada Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS	18
3. Kandungan Protein pada Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS.....	19
4. Elektroforesis Protein pada Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS	21



DAFTAR LAMPIRAN

1. Standar Protein	25
2. Standar H ₂ O ₂	25
3. Data Aktivitas Enzim Peroksidase pada Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS	26
4. Data Aktivitas Enzim Katalase pada Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS (penurunan H ₂ O ₂)	27
5. Data Protein (pada sampel enzim) pada Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS	28
6. Data Kandungan Protein pada Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS	29

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kakao merupakan salah satu komoditas perkebunan yang peranannya cukup penting bagi perekonomian nasional, khususnya sebagai penyedia lapangan kerja, sumber pendapatan dan devisa negara. Disamping itu kakao juga berperan dalam mendorong pengembangan wilayah dan pengembangan agroindustri. Pada tahun 2002, perkebunan kakao telah menyediakan lapangan kerja dan sumber pendapatan bagi sekitar 900 ribu kepala keluarga petani yang sebagian besar berada di Kawasan Timur Indonesia (KTI) serta memberikan sumbangan devisa terbesar ke tiga sub sektor perkebunan setelah karet dan kelapa sawit dengan nilai sebesar US \$ 701 juta (Goenadi *et al.*, 2005).

Indonesia sebenarnya berpotensi untuk menjadi produsen utama kakao dunia, apabila berbagai permasalahan utama yang dihadapi perkebunan kakao dapat diatasi dan agribisnis kakao dikembangkan dan dikelola secara baik. Salah satu permasalahan dalam pembudidayaan tanaman kakao adalah penyakit *Phytophthora palmivora*. *P. palmivora* merupakan penyebab penyakit penting pada kakao, antara lain penyakit busuk buah, kanker batang, hawar daun, hawar bibit, dan layu tunas air (McMahon dan Purwantara, 2004).

Seluruh bagian tanaman kakao dapat terinfeksi oleh patogen tersebut mulai dari akar, batang, bunga, buah dan daun. Namun kerugian yang sangat tinggi dapat terjadi oleh serangan patogen pada buah. Survei yang dilakukan di Jawa menunjukkan bahwa serangan penyakit busuk buah dapat menurunkan hasil sekitar 26-56 % (Pawirosoemardjo dan Purwantara 1992). Buah yang menjadi busuk akan menjadi sumber penularan penyakit yang sangat potensial. Oleh karena itu, diperlukan teknik pengendalian yang tepat, yang bertujuan untuk memperkecil peluang terjadinya infeksi merupakan tindakan utama yang harus dilakukan. Peluang terjadinya infeksi dapat diperkecil dengan menekan serendah mungkin kuantitas dan kualitas sumber infeksi atau inokulum penyakit yaitu dengan menggunakan bahan tanam dari klon kakao yang tahan *P. palmivora*.

Upaya pencarian sumber plasma nutfah klon kakao yang tahan *Phytophthora palmivora* masih jarang, sehingga perlu dilakukan induksi buatan untuk meningkatkan ketahanan suatu tanaman dengan menggunakan senyawa kimia (Chopra, 2005), yaitu *Ethyl Methane Sulfonate* (EMS). EMS merupakan salah satu mutagen kimia yang telah diaplikasikan dan mampu menginduksi mutasi pada beberapa jenis tanaman. Diharapkan dengan adanya mutasi ini diperoleh tanaman kakao yang lebih resisten atau lebih tahan terhadap penyakit busuk buah kakao, bentuk ketahanan tersebut dapat diketahui melalui peningkatan sintesis protein sehingga peran enzim peroksidase dan katalase juga mengalami peningkatan. Enzim peroksidase dan katalase berperan untuk menguraikan hidrogen peroksida yang berlebih pada tanaman. Kaitan hidrogen peroksida dengan enzim katalase dan enzim peroksidase terhadap penyakit *P. palmivora* adalah pada tanaman apabila terdapat hidrogen peroksida yang berlebih maka akan menyebabkan keracunan pada tanaman, yang menyebabkan rusaknya membran sel pada tanaman. Tanaman dalam keadaan keracunan sangat rentan terhadap penyakit. Oleh karena itu, hidrogen peroksida yang berlebih perlu diuraikan menjadi air dan oksigen. Enzim katalase berperan untuk melindungi sel dari pengaruh racun hidrogen peroksida dan menguraikan hidrogen peroksida menjadi oksigen dan air. Sehingga secara tidak langsung enzim katalase berperan terhadap ketahanan penyakit, apabila tanaman sehat (tidak mengalami keracunan) maka tanaman akan semakin tahan terhadap penyakit. Sama halnya dengan enzim katalase, enzim peroksidase berperan menguraikan hidrogen peroksida yang berlebih pada tanaman menjadi air dan oksigen. Selain itu, enzim peroksidase berperan secara langsung meningkatkan ketahanan tanaman terhadap penyakit, semakin tinggi aktivitas enzim peroksidase maka tanaman akan semakin tahan terhadap penyakit.

Uji ketahanan klon kakao terhadap *P. palmivora* penyebab busuk buah dapat dilakukan pada masa pembibitan. Menurut Tahi *et al.* (2007), terdapat hubungan antara resistensi klon kakao terhadap *P. palmivora* dengan ukuran luka nekrosis daun pasca inokulasi spora *P. palmivora*, umumnya klon yang tahan memiliki ukuran nekrosis daun yang lebih kecil.

1.2 Perumusan Masalah

1. Bagaimana aktivitas enzim peroksidase dan katalase pada tanaman kakao klon GC 7 hasil mutasi menggunakan EMS
2. Bagaimana hubungan antara ketahanan tanaman kakao klon GC 7 hasil mutasi menggunakan EMS terhadap *P. palmivora* dengan aktivitas enzim peroksidase dan katalase.
3. Bagaimana kandungan protein pada daun kakao klon GC 7 hasil mutasi menggunakan EMS

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui aktivitas enzim peroksidase dan katalase pada tanaman kakao klon GC 7 hasil mutasi menggunakan EMS
2. Melihat hubungan antara ketahanan tanaman kakao klon GC 7 hasil mutasi menggunakan EMS terhadap *P. palmivora* dengan aktivitas enzim peroksidase dan katalase.
3. Mengetahui kandungan protein pada daun kakao klon GC 7 hasil mutasi menggunakan EMS.

1.4 Manfaat Penelitian

Pengamatan kandungan protein, aktivitas enzim peroksidase, dan katalase dapat digunakan untuk mengetahui hubungannya dengan ketahanan kakao terhadap penyakit yang disebabkan oleh *P. palmivora*.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Deskripsi tanaman kakao

Kakao berasal dari Benua Amerika pada bagian yang mempunyai iklim tropis. Sangat sulit untuk mengetahui negara bagian mana tepatnya tanaman ini berasal, karena tanaman ini telah tersebar secara luas semenjak penduduk daerah itu masih hidup mengembara. Tanaman ini mulai masuk ke Indonesia sekitar tahun 1560 oleh orang Spanyol melalui Sulawesi dan kakao mulai dibudidayakan secara luas sejak tahun 1970 (Darwis dan Agustin, 2003).

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan tumbuhan berwujud pohon yang berasal dari daerah hutan hujan tropis di Amerika Selatan. Menurut Tjitrosoepomo (1988), sistematika tanaman kakao adalah sebagai berikut:

Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Malvales
Familia	: Sterculiaceae
Genus	: <i>Theobroma</i>
Spesies	: <i>Theobroma cacao</i> , L.

Kakao merupakan salah satu tanaman perkebunan dan merupakan komoditas ekspor penting di Indonesia, namun pengembangannya secara luas masih menghadapi hambatan antara lain oleh adanya serangan hama dan penyakit. Beberapa jenis penyakit dapat menyerang tanaman kakao, akan tetapi yang sangat penting dan penyebarannya sangat luas adalah penyakit busuk buah yang disebabkan oleh *Phytophthora* sp.

2.2 Penyakit Busuk Buah Kakao (*P. palmivora*)

Penyakit busuk buah pada tanaman kakao disebabkan oleh *P. palmivora*, cendawan ini tergolong dalam:

Kingdom	: Stramenophiles
Kelas	: Oomycetes
Ordo	: Peronosporales

Famili : Pythiaceae
Genus : Phytophthora
Spesies : *Phytophthora palmivora* Butler

Menurut Evan dan Priori (1987), sekurang-kurangnya terdapat tujuh spesies *Phytophthora* yang teridentifikasi di lapang, akan tetapi ahli mikologi sekarang ini mengkarakterisasi empat spesies utama yang menginfeksi kakao yaitu *P. palmivora*, *P. megakarya*, *P. capsici* dan *P. citrophthora*.

Phytophthora merupakan marga yang memiliki sporangium yang jelas berbentuk seperti buah jeruk nipis dengan tonjolan di ujungnya. Sporangium ini tidak tahan kering, jika ada air maka sporangium ini akan melepaskan zoosporanya. Zoospora berenang-renang kemudian membentuk kista pada permukaan tanaman dan akhirnya berkecambah dengan menghasilkan hifa yang pipih yang masuk ke dalam jaringan inang. Pada perkecambahan secara tidak langsung diferensiasi zoospora terjadi di dalam sporangium. Cendawan *Phytophthora palmivora* merupakan cendawan yang mempunyai miselium yang menghasilkan oospora dan zoosporangium. Zoospora mempunyai bulu cambuk. Spora seksual (oospora) dihasilkan oleh penyatu gamet yang berbeda secara morfologi. Zoosporangium dihasilkan sepanjang hifa somatik atau pada ujung hifa dan seperangkat hifa bebas. Sporangium berukuran 36-80 x 26-40 (av 57 x 34) mikron. Oogonium berkisar 26-36 dan 22-32 mikron. Klamidospora siap dibentuk yang memiliki ukuran 32-48 mikron.

Zoospora keluar satu persatu melalui papilia yang terdapat pada ujung sporangium. Zoospora mempunyai dua flagella yang tidak sama panjangnya. Pada pemeriksaan dengan mikroskop elektron diketahui bahwa flagella yang pendek (anterior) mempunyai benang-benang yang disebut mastigonema, sedang yang panjang (posterior) berbulu sangat halus. Jenis *Phytophthora* sp. tertentu membentuk klamidospora bulat, terminal atau interkalar, berdinding agak tebal, mula-mula hialin, akhirnya berwarna kecoklat-coklatan.

Seluruh bagian tanaman kakao dapat terinfeksi oleh patogen tersebut mulai dari akar, batang, bunga, buah dan daun. Namun kerugian yang sangat tinggi disebabkan oleh serangan pada buah. Survei yang dilakukan di Jawa

menunjukkan bahwa serangan penyakit busuk buah dapat menurunkan hasil sekitar 26 – 56 % (Pawirosoemardjo dan Purwantara 1992). Infeksi *Phytophthora* sp. dapat langsung terjadi antar buah melalui percikan air hujan dari permukaan tanah, penyebaran *Phytophthora* sp. banyak di bantu oleh keadaan lingkungan yang lembab dan adanya seresah dipermukaan tanah. Buah yang membusuk pada pohon juga mendorong infeksi pada buah lain yang berdekatan (Siregar *et al.*, 2007).

Gejala infeksi *Phytophthora* sp pada buah adalah terjadinya bercak berwarna kelabu kehitaman. Biasanya bercak tersebut terdapat pada ujung buah, bercak mengandung air yang kemudian berkembang sehingga menunjukkan warna hitam. Bagian buah menjadi busuk yang kemudian menyebabkan biji menjadi busuk (Siregar *et al.*, 2007). Jika gejala ini muncul pada buah yang masih muda, pada waktu biji masih menempel pada daging buah, maka biji akan mengkerut dan terhambat pertumbuhannya. Tetapi, jika sudah masak, biasanya tidak akan terganggu. Meskipun demikian biji yang terserang harus dipisahkan dari biji yang sehat supaya hasilnya tetap bagus (Sunanto, 1994).

Pembentukan spora *Phytophthora* sp. terlihat dengan adanya warna putih di atas bercak hitam. Pada temperature 27,5-30⁰C dan kelembaban 60-80%. Pada batang, gejala yang terlihat berupa bercak bulat berwarna cokelat di dekat permukaan tanah. Bila kulit kayu dikerok akan terlihat warna cokelat dan bagian dalam kayu membusuk (Siregar *et al.*, 2007).

2.3 Ethyl Methane Sulfonate (EMS)

Ethyl Methane Sulfonate (EMS) termasuk salah satu mutagen kimia yang mampu melakukan mutasi pada berbagai jenis tanaman. Pada tanaman yang di mutasi dengan EMS akan mengalami perubahan pada struktur organisme (Priyono dan Susilo, 2002). Perubahan ini terjadi karena sifat dari EMS yang mengalkilasi gugus oksigen dan gugus nitrogen reaktif pada basa purin dan pirimidin sehingga menyebabkan perubahan pada struktur basa-basa yang berakibat terbentuknya rekombinasi pita baru DNA, adanya rekombinasi pada pita baru DNA menyebabkan perubahan pada struktur organisme. EMS biasanya digunakan

secara biologis untuk memutasi DNA sebagai generasi acak dari mutasi titik tunggal. Mutasi ini selalu berperan dalam melengkapi atau menghilangkan sebagian fungsi gen dan dapat terjadi dimana saja dalam genom. Mutasi EMS dapat digunakan pada banyak organisme termasuk cacing dan Arabidopsis. EMS bersifat mutagenik, teratogenik dan mungkin karsinogen organik. Mutagenik merupakan zat yang dapat menyebabkan mutasi. Karsinogenik merupakan zat atau agen-agen yang dapat menyebabkan sel-sel normal menjadi ganas yaitu membelah diri yang tak terkendali dan memiliki kemampuan untuk menyebar dan membentuk sederetan sel pada bagian-bagian tubuh yang tak sesuai, yang dapat mendorong berkembangnya kanker (karsinoma) atau tumor ganas. Teratogenik adalah kecenderungan yang menyebabkan kelainan pada penerusnya (bawaan). EMS menghasilkan mutasi secara acak dalam material genetik oleh substitusi nukleotida, khususnya oleh alkilasi guanine (Merck index, 1989 dalam Arif Bawono Saputra, 2009).

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Purwati dkk, (2007) bahwa penggunaan EMS pada tanaman abaka secara invitro mampu menghasilkan respon yang beragam diantaranya adalah dihasilkannya tunas normal abaka yang insensitif terhadap penyakit *Fusarium oxysporum*. Keragaman respon ini diduga terjadi sebagai akibat adanya sel-sel atau jaringan mutan dengan fenotipe sensitif AF (asam fusarat) yang diinduksi oleh perlakuan EMS di antara sel-sel atau jaringan *wild type* yang sensitif AF (asam fusarat). Sel atau jaringan mutan yang insensitif AF mampu tumbuh dan berkembang menjadi kalus embriogen, tunas roset, atau tunas normal. Sedangkan sel atau jaringan *wild type* mati membusuk dalam media MT (media induksi tunas) yang mengandung AF. EMS dapat menghasilkan mutan antara lain daun variegata pada Arabidopsis, ketahanan terhadap *lincomycin* dan *streptomycin* pada cabe merah dan jumlah cabang yang lebih banyak pada kenaf.

2.4 Enzim Peroksidase

Enzim adalah molekul protein besar yang mengkatalisasi semua reaksi-reaksi yang saling berhubungan dalam sel hidup. Untuk setiap reaksi kimia yang

terjadi dalam sel, terdapat enzim berbeda yang mengkatalisasi reaksi tersebut (Agrios, 1996).

Peroksidase merupakan salah satu *PR-protein* (*Pathogenesis Related-protein*) yang berperan dalam sistem pertahanan biokimia tanaman dalam melawan patogen. Peroksidase terakumulasi pada saat tanaman yang terserang patogen. Selain itu, peningkatan aktivitas enzim peroksidase dipengaruhi juga oleh adanya serangan virus. Menurut Zhou *et al.*, (1992) ekspresi meningkatnya aktifitas peroksidase diakibatkan tanaman terinfeksi patogen termasuk virus yang akan berkorelasi dengan tingkat ketahanan terhadap virus.

Aktivitas enzim *phenol-oxidizing* (enzim pengoksidase fenol contohnya enzim peroksidase) lebih tinggi pada jaringan varietas tahan yang terinfeksi dibanding dengan jaringan varietas rentan yang terinfeksi. Peranan aktivitas enzim polifenoloksidase dalam ketahanan penyakit mungkin berasal dari sifatnya yang dapat mengoksidase senyawa fenol menjadi kinon, yang sering lebih beracun bagi mikroorganisme. Peningkatan aktivitas polifenoloksidase akan menghasilkan produk toksin yang lebih tinggi dari hasil oksidasi, sehingga akan menghasilkan tingkat ketahanan yang lebih tinggi terhadap infeksi. Enzim fenol oksidase yang lain adalah peroksidase. Enzim peroksidase tidak hanya mengoksidasi fenolik tetapi juga meningkatkan laju polimerisasi senyawa-senyawa fenolik menjadi senyawa-senyawa seperti lignin, yang terdeposit dalam dinding sel dan papilla selanjutnya mengganggu pertumbuhan patogen (Agrios, 1996). Peroksidase pada tanaman merupakan isoenzim yang berperan dalam pertumbuhan, diferensiasi dan pertahanan.

Pada tanaman yang terinfeksi patogen, peningkatan radikal bebas yang selaras dengan peningkatan aktivitas enzim peroksidase berkaitan dengan mekanisme pertahanan. Mekanisme pertahanan tersebut diwujudkan dalam bentuk lignifikasi dinding sel sehingga perkembangan patogen terhambat. Aktivitas enzim peroksidase dilaporkan berperan dalam mekanisme ketahanan tanaman terhadap serangan virus. Adanya korelasi menunjukkan peroksidase terlibat dalam perkembangan ketahanan tanaman terhadap penyakit daun tembakau yang

mempunyai aktivitas peroksidase tinggi lebih tahan terhadap infeksi penyakit *Pseudomonas tabaci*.

Gupta *et al.*, (1990) menyatakan bahwa tanaman yang tahan terhadap penyakit cenderung memperlihatkan aktivitas peroksidase yang lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman rentan. Dari beberapa penelitian menyatakan bahwa mekanisme pertahanan yang melibatkan aktivitas peroksidase tampaknya bekerja pada infeksi oleh jamur dan virus yang menghasilkan respons hipersensitif. Hasil penelitian Hersanti (2007) menunjukkan bahwa aktivitas peroksidase pada tanaman cabai merah yang diinduksi ketahanan menggunakan ekstrak *Clerodendrum paniculatum* memiliki aktivitas lebih tinggi dari pada tanaman kontrol (rentan).

Aktivitas enzim peroksidase dilaporkan berperan dalam mekanisme ketahanan tanaman terhadap virus pada tanaman Rapseed (Zhou *et al.*, 1992), mustard (Gupta *et al.*, 1990), mentimun (Yurina *et al.*, 1993) dan kedelai (Andreeva, 1989). Menurut van Lelyveld dan van Vuuren (1988), bahwa kenaikan aktivitas enzim peroksidase berhubungan secara nyata dengan penyakit yang disebabkan virus, infeksi bakteri, dan jamur. Korelasi juga ditemukan antara peningkatan aktivitas peroksidase dengan ketahanan terhadap penyakit pada jaringan tanaman setelah terjadi infeksi. Adanya korelasi menunjukkan peroksidase terlibat dalam perkembangan ketahanan tanaman terhadap penyakit Daun tembakau yang mempunyai aktivitas peroksidase tinggi lebih tahan terhadap infeksi penyakit *Pseudomonas tabaci*.

2.5 Enzim Katalase

Katalase adalah sebuah enzim yang sangat luas dalam distribusi organisme aerobik dan dapat dimurnikan dari sejumlah hewan, tumbuhan, dan bakteri. Katalase merupakan suatu hemoprotein yang mengandung 4 gugus heme dengan berat molekular sesungguhnya antara 210.000-280.000 dalton.



Dua molekul H_2O_2 pada katalase berfungsi sebagai akseptor elektron dan donor elektron (aktivitas katalitik) menghasilkan molekul oksigen (O_2) dan air

(H₂O). dalam dekomposisi hydrogen peroksida bertindak sebagai donor atom hidrogen (akseptor elektron dan oksidator) dan molekul hidrogen peroksida yang kedua bertindak sebagai substrat dan akseptor atom-atom hidrogen (donor elektron, reduktor). Satu molekul hidrogen peroksida direduksi menjadi 2OH⁻ dan yang lain dioksidasi menjadi O₂ dan 2H⁺, menghasilkan produk 2H₂O dan O₂ (West and Tood, 1961).

Katalase berfungsi sebagai pelindung sel dari pengaruh racun hidrogen peroksida dan mengkatalisa dekomposisinya menjadi oksigen dan air tanpa menghasilkan radikal bebas. Katalase mempunyai dua fungsi. Pertama kemampuan untuk menghilangkan H₂O₂ (peroksida) berlebih yang dihasilkan pada metabolisme oksidatif, dan kedua kemampuan untuk menggunakan H₂O₂ dalam oksidasi fenol, alkohol dan donor hidrogen lain.

2.6 Protein

Protein adalah senyawa organik kompleks berbobot molekul tinggi yang merupakan polimer dari monomer-monomer asam amino yang dihubungkan satu sama lain dengan ikatan peptida. Molekul protein mengandung karbon, hidrogen, oksigen, nitrogen dan kadang kala sulfur serta fosfor. Kebanyakan protein merupakan enzim atau subunit enzim. Jenis protein lain berperan dalam fungsi struktural atau mekanis, seperti misalnya protein yang membentuk batang dan sendi sitoskeleton. Protein terlibat dalam sistem kekebalan (imun) sebagai antibodi, sistem kendali dalam bentuk hormon, sebagai komponen penyimpanan (dalam biji) dan juga dalam transportasi hara. Sebagai salah satu sumber gizi, protein berperan sebagai sumber asam amino bagi organisme yang tidak mampu membentuk asam amino tersebut (heterotrof).

Menurut Plank (1978), bahwa enzim inang yang dihasilkan sebagai respon terhadap patogen, dipakai oleh patogen untuk membentuk protein yang diperlukan sebagai nutrisinya. Pada tumbuhan yang rentan patogen mengeksresikan satu protein kedalam sel inang yang mengadakan kopolimerisasi (polimerisasi bersama) dengan protein inang yang komplementer. Kopolimerisasi seperti ini akan mengganggu autoregulasi inang untuk membentuk protein tersebut. Karena

terganggunya autoregulasi, inang terus menerus membentuk protein yang sama untuk memberi nutrisi kepada parasit. Pada umumnya, inang dan patogen saling mengenal lewat proteinnya. Jika tumbuhan rentan, terjadilah kopolimerisasi, sedangkan tidak adanya kopolimerisasi menyebabkan ketahanan.

Sehubungan dengan hal tersebut parasitisme agaknya berkisar sekeliling kopolimerisasi dengan protein inang dan dengan baik dapat menjelaskan ketahanan maupun kerentanan.

2.7 Hipotesis

1. Enzim peroksidase dan katalase pada kakao hasil mutasi menggunakan EMS memiliki aktivitas yang bervariasi
2. Terdapat hubungan antara aktivitas enzim peroksidase dan katalase pada kakao hasil mutasi menggunakan EMS dengan tingkat ketahanan terhadap *P. palmivora*.
3. Kandungan protein pada kakao hasil mutasi menggunakan EMS kategori tahan terhadap *P. palmivora* lebih tinggi dari pada yang moderat atau rentan.

III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Jember. Pelaksanaan penelitian dimulai Bulan Desember 2010 sampai dengan Mei 2010.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tanaman kakao klon GC 7 yang telah dimutasi menggunakan EMS, *reagent* Bradford, β -mercaptoethanol, triton X-100, H₂O₂, guaiacol 3%, buffer ekstraksi sodium fosfat, nitrogen cair, alkohol, aquadest, dan bahan lainnya yang mendukung penelitian ini.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: timbangan analitik, pH meter, mikropipet, sentrifuge, stirer magnetik, vortex, spektrofotometer, Kuvet, mortar-stamper, eppendorf, dan alat lainnya yang mendukung penelitian ini.

3.3 Metode

Tanaman kakao klon GC 7 hasil mutasi menggunakan EMS diuji ketahanannya dengan menggunakan isolat *P. palmivora*. Dari uji tersebut, diseleksi tanaman kakao dengan kategori moderat, dan resisten terhadap *P. palmivora*, serta sebagai tanaman kakao rentan (kontrol) digunakan Klon GC 7 tanpa perlakuan. Dari masing-masing kategori tersebut diambil sampel daunnya dan diuji aktivitas enzim peroksidase, katalase, kandungan protein dan dilakukan elektroforesis protein.

3.4 Parameter Pengamatan

3.4.1 Ekstraksi Protein daun Kakao dan Pengukuran Kandungan Protein

Sampel daun kakao 0,5 gram dihilangkan tulang daunnya, kemudian dipotong-potong dan dimasukkan dalam mortar dingin, ditambahkan nitrogen cair, digerus hingga halus, ditambahkan 2 mL buffer ekstraksi protein yang

mengandung (0,1 M Tris-HCl pH 7,5 ; 1% β -2-mercaptoethanol ; 1% Triton X-100 dan 0,15 M NaCl). Ekstrak daun kakao disentrifuse selama 10 menit pada kecepatan 10.000 rpm. Supernatan yang diperoleh digunakan untuk uji kandungan protein dan uji pola pita protein (elektroforesis protein).

Supernatan diambil sebanyak 10 μ L kemudian ditambahkan 1 mL *reagent* Bradford setelah itu divortex dan dibiarkan selama 15 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 595 nm. Kandungan protein dihitung dengan menggunakan persamaan regresi dari kurva standard BSA.

3.4.2 Ekstraksi enzim dan Pengukuran Aktivitas Enzim Peroksidase

Sampel daun kakao di timbang sebanyak 0,5 gram dihilangkan tulang daunnya, kemudian dipotong-potong dan dimasukkan dalam mortar dingin, ditambahkan nitrogen cair, digerus hingga halus, tambahkan kuarsa sebanyak 1 sendok kecil kemudian tambahkan 2 mL buffer sodium phosphate, masukkan ke dalam eppendorf kemudian di sentrifuse pada 12.000 rpm suhu 4⁰C selama 15 menit, supernatan diambil dengan cara dituang ke dalam eppendorf, dan digunakan sebagai sampel enzim untuk pengukuran aktivitas peroksidase dan katalase, serta digunakan untuk mengukur kandungan protein.

Pengukuran aktivitas enzim peroksidase dilakukan dengan cara dipipet 2,80 mL guaiacol 3%, 100 μ L supernatan, kuvet yang berisi larutan tersebut di letakkan pada spektrofotometer, kemudian tambahkan 100 μ L H₂O₂ 2%, kenaikan nilai absorbansinya diukur pada panjang gelombang 470 nm selama tiga menit (t_0 , t_1 , t_2 , dan t_3) (Gao, 2008). Aktivitas peroksidase ditentukan dalam unit (U), yaitu peningkatan absorbansi pada λ 470 nm sebesar 1,0 per menit.

3.4.3 Pengukuran Enzim Katalase

Pengukuran aktivitas enzim katalase dilakukan dengan cara dipipet 2,85 mL buffer sodium phospat pH 7 dan 50 μ L enzim, kuvet yang berisi larutan tersebut di letakkan pada spektrofotometer, kemudian tambahkan 100 μ L H₂O₂ 1%, penurunan absorbansi diukur pada panjang gelombang 240 nm selama satu menit (t_0 , dan t_1) (Gao, 2008). Aktivitas katalase dihitung berdasarkan penurunan

kandungan H_2O_2 selama reaksi, dan ditentukan dengan persamaan kurva Standar H_2O_2 .

3.4.4 Elektroforesis Protein

Elektroforesis protein membutuhkan dua jenis gel elektroforesis yaitu *upper gel* dan *lower gel*.

Tabel 1. Komposisi *Lower Gel* dalam Elektroforesis Protein

No	Nama bahan	Jumlah
1	1,5 M buffer Tris-HCl pH 8,8	3,75 mL
2	Acrilamide 30%	4,00 mL
3	SDS 10%	0,15 mL
4	APS	0,05 mL
5	TEMED	0,005 mL
6	H_2O	7,10 mL
Total volume		15 mL

Tabel 2. Komposisi *Upper Gel* dalam Elektroforesis Protein

No	Nama bahan	Jumlah
1	0,5 M buffer Tris-HCl pH 6,8	0,75 mL
2	Acrilamide 30%	1,25 mL
3	SDS 10%	0,05 mL
4	APS	0,05 mL
5	TEMED	0,005 mL
6	H_2O	3 mL
Total volume		5 mL

Lower gel dimasukkan dimasukkan ke dalam pasangan plat kaca, kemudian ditambahkan aquadest dan ditunggu sekitar 1 jam sampai gel terpolimerisasi. Setelah terbentuk gel aquadest di buang kemudian dimasukkan *upper gel* di atas *resolving gel* dan dipasang sisir untuk membuat sumuran tempat memasukkan sampel protein. Setelah gel terbentuk, gel dilepas dari cetakannya dan plat dirangkai dengan aparatus elektroforesis *Running buffer* dituang ke dalam bak dan sisir dilepas. 10 μ g sampel protein dicampur dengan 2 μ L sampel buffer. Lalu dipanaskan pada 100⁰C selama 2 - 3 menit. Untuk marker, diambil 10 μ L marker protein dicampur dengan 2 μ L sampel buffer. larutan sampel protein dan marker protein dimasukkan ke dalam sumuran pada gel. Elektroforesis pada 25

volt dilakukan selama ± 3 jam. Setelah sampel protein melewati *upper gel*, arus listrik dinaikkan pada 50 volt sampai sampel protein berada pada bagian *lower gel*. Pewarnaan (*staining*) pita protein dilakukan dengan jalan merendam gel hasil elektroforesis (setelah dilepas dari rangkaian plat) dalam larutan 0,10% *Coomasie brilliant blue* semalam. Setelah diwarnai, dilakukan *destaining* untuk menghilangkan kelebihan warna dengan jalan merendam gel dalam larutan *destaining* (50 mL aquadest, 40 mL metanol, 10 mL asam asetat glasial) hingga gel menjadi jernih dengan pita terpisah jelas satu sama lainnya. Gel kemudian disimpan dalam 10% asam asetat glasial selanjutnya dikeringkan. Pita protein yang terbentuk dalam gel setelah elektroforesis ditentukan berat molekulnya.