



**AKTIVITAS ENZIM β -1,3-GLUKANASE, KANDUNGAN FENOL,
DAN KARBOHIDRAT PADA KAKAO (*Theobroma cacao* L.)
HASIL MUTASI MENGGUNAKAN *ETHYL*
METHANE SULFONATE (EMS)**

SKRIPSI

Oleh
Muhammad Yusuf B.
NIM. 061510101186

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

2010





**AKTIVITAS ENZIM β -1,3-GLUKANASE, KANDUNGAN FENOL
DAN KARBOHIDRAT PADA KAKAO (*Theobroma cacao* L.)
HASIL MUTASI MENGGUNAKAN *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
Muhammad Yusuf B.
NIM. 061510101186

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

SKRIPSI BERJUDUL

**AKTIVITAS ENZIM β -1,3-GLUKANASE, KANDUNGAN FENOL
DAN KARBOHIDRAT PADA KAKAO (*Theobroma cacao* L.)
HASIL MUTASI MENGGUNAKAN *ETHYL*
METHANE SULFONATE (EMS)**

Oleh

**Muhammad Yusuf B.
NIM. 061510101186**

Pembimbing:

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

Dosen Pembimbing Anggota : Tri Handoyo, S.P., Ph.D.

Skripsi Berjudul: **Aktivitas Enzim β -1,3-Glukanase, Kandungan Fenol dan Karbohidrat pada Kakao (*Theobroma cacao* L.) Hasil Mutasi Menggunakan Ethyl Methane Sulfonate (EMS)**; telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Pertanian pada:

Hari : Rabu
Tanggal : 23 Juni 2010
Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Tim Penguji
Penguji 1,

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

Penguji 2,

Penguji 3,

Tri Handoyo, S.P., Ph.D.
NIP. 197112021998021001

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

MENGESAHKAN
Dekan,

Dr. Ir. Bambang Hermiyanto, M.P.
NIP. 196111101988021001

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Muhammad Yusuf B.

NIM : 061510101186

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul: **“Aktivitas Enzim β -1,3-Glukanase, Kandungan Fenol, dan Karbohidrat 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, Juli 2010
Yang menyatakan,

Muhammad Yusuf B.
NIM. 061510101186

Aktivitas Enzim β -1,3-Glukanase, Kandungan Fenol, dan Karbohidrat pada Kakao (*Theobroma cacao* L.) Hasil Mutasi Menggunakan *Ethyl Methane Sulfonate* (EMS)

Oleh

Muhammad Yusuf B.

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

ABSTRAK

Kakao merupakan komoditas penting bagi perekonomian nasional yang berperan sebagai sumber mata pencaharian bagi petani dan sumber devisa bagi Indonesia. Produktivitas kakao di Indonesia yang masih sangat rendah disebabkan oleh serangan penyakit busuk buah kakao (*Phytophthora palmivora*). Salah satu metode untuk memperoleh tanaman kakao yang resisten terhadap penyakit busuk buah adalah dengan mutasi menggunakan EMS. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas enzim β -1,3-glukanase, kandungan fenol dan karbohidrat pada kakao klon GC 7 hasil mutasi menggunakan EMS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas relatif enzim β -1,3-glukanase pada kakao kategori rentan, moderat, dan resisten terhadap *P. palmivora* menghasilkan glukosa masing-masing 96,842; 180,322; dan 204,630 μ g/mL enzim/jam, sedangkan aktivitas spesifik 0,869; 1,028; dan 2,016 mg/mg protein/jam. Kandungan fenol masing-masing 3,600; 4,763; dan 5,198 mg/g sampel daun. Kandungan gula reduksi dan sukrosa semakin rendah dengan semakin tingginya tingkat ketahanan kakao terhadap *P. palmivora*, sedangkan kandungan amilum semakin tinggi. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kakao hasil mutasi menggunakan EMS kategori resisten terhadap *P. palmivora* memiliki aktivitas enzim β -1,3-glukanase, kandungan fenol, dan amilum lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman kakao yang moderat atau rentan, sedangkan kandungan gula reduksi dan sukrosa semakin rendah.

Kata Kunci: Kakao, EMS, β -1,3-Glukanase, Fenol, dan Karbohidrat

The Activities of Enzyme β -1,3-Glucanase, Phenol and Carbohydrate Content on Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Resulted from Mutation Using Ethyl Methane Sulfonate (EMS)

Muhammad Yusuf B.

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

ABSTRACT

Cocoa is an important commodity for the national economy which acts as a source of livelihood for farmers and exchange for Indonesia. Productivity of cocoa in Indonesia is still very low due to the attack disease of pod rot (*Phytophthora palmivora*). One method for obtaining plants resistant of pod rot disease is by mutation using EMS. The objective of this study was to identify the activities of enzyme β -1,3-glucanase, phenols and carbohydrate content on cocoa clones of GC 7 by mutation using EMS. The research results showed that the relative activities of the enzyme β -1,3-glucanase on cocoa in the susceptible, moderate, and resistant categories toward *P. palmivora* produced glucoses respectively by 96,842; 180,322; and 204,630 $\mu\text{g/mL}$ enzyme/hour, while the specific activities by 0,869; 1,028; and 2,016 mg/mg protein/hour. Phenol contents in susceptible, moderate, and resistant categories to *P. palmivora* respectively were by 3,600; 4,763; and 5,198 mg/g of leaf samples. The content of reducing sugar and sucrose was lower due to the more increasing level of cocoa resistance to *P. palmivora*, therefore the amilum content was higher and higher. From this research concluded that cocoa resulted from mutation using EMS was in resistant category to *P. palmivora* which has the enzyme activities of β -1,3-glucanase, phenol content, and amilum higher than moderate or susceptible cocoa crop, while the content of reducing sugar and sucrose were lower and lower.

Key words: Cacao, EMS, β -1,3-Glucanase, Phenol, and Carbohydrate

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT. atas limpahan nikmat dan karunia-Nya sehingga penyusunan skripsi yang berjudul “**Aktivitas Enzim β -1,3-Glukanase, Kandungan Fenol dan Karbohidrat 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 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. Tri Handoyo, S.P., Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Anggota atas bantuannya baik moril maupun materiil serta bimbingan dan arahnya selama penelitian dan penyusunan karya ilmiah ini.
3. Dr. Ir. Slameto, M.P., selaku Dosen Penguji 3 atas saran dan perbaikannya dalam penyusunan karya ilmiah ini.
4. Kementerian Pendidikan Nasional, yang telah membiayai studi pada Program Beasiswa Unggulan Program Studi Agronomi-Agroindustri Spesifik Kopi dan Kakao di Fakultas Pertanian Universitas Jember.
5. Pemerintah Daerah Kabupaten Berau dan PT. Berau Coal yang telah memberikan bantuan dan dukungannya selama penulis menempuh pendidikan tinggi di Universitas Jember.
6. Dr. Ir. Josi Ali Arifandi, M.S., selaku Dosen Pembimbing Akademik atas bimbingan dan arahnya kepada penulis selama menempuh pendidikan di Fakultas Pertanian Universitas Jember .
7. Dr. Ir. Bambang Hermiyanto, M.P., selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember; Ir. Bambang Kusmanadhi, M.Sc., selaku Ketua Jurusan Jurusan Budidaya Pertanian; Ir. Usmadi M.P., selaku Ketua Program Beasiswa Unggulan Fakultas Pertanian Universitas Jember; dan Bapak Edi Pitaya, S.P., selaku pegawai bagian akademik Fakultas Pertanian Universitas

Jember yang telah banyak membantu selama penulis menempuh pendidikan tinggi di Universitas Jember.

8. Kedua Orang Tuaku, keluarga besar Bapak Hamdani Hasan, S.E., dan keluarga besar Bapak H.M. Rasyid, S.PdI., atas doa restu, dukungan dan bantuannya sehingga penulis dapat menyelesaikan studi ini.
9. Mas Ali Muhammad Yusuf Shofa, S.Si., M.P., yang telah banyak membantu dan membimbing selama penelitian.
10. Teman-teman Mahasiswa Beasiswa Unggulan Fakultas Pertanian Universitas Jember angkatan 2006, terima kasih atas kebersamaan dan bantuan kalian semua.
11. 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

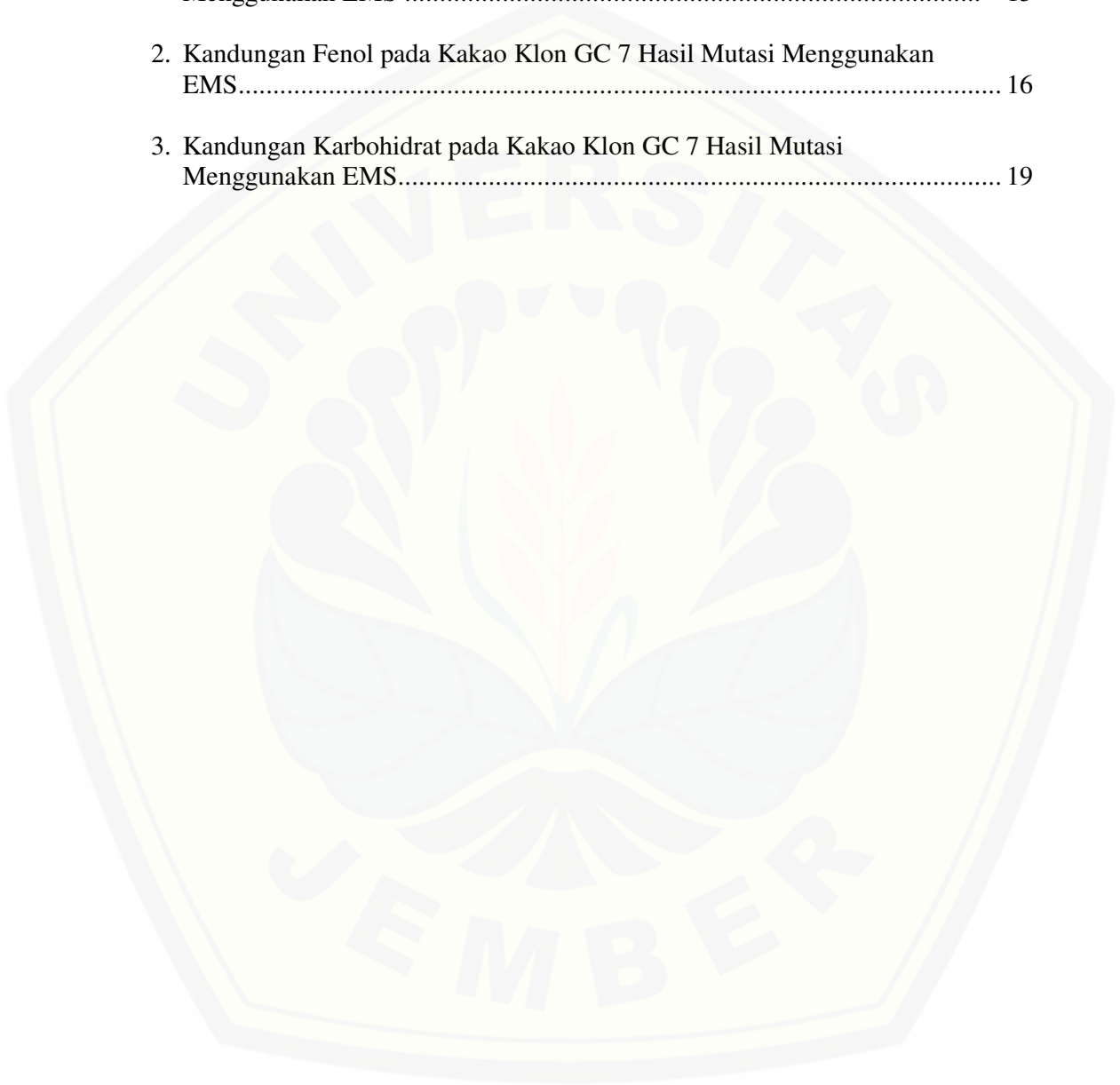
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PEMBIMBING	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
PRAKATA	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
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 Sistematika Tanaman Kakao	4
2.2 Deskripsi Kakao Klon GC 7	4
2.3 Penyakit Busuk Buah pada Tanaman Kakao	5
2.4 EMS dan Peranannya Dalam Mutasi	6
2.5 Peran Enzim β -1,3-Glukanase pada Tanaman Kakao	7
2.6 Karbohidrat pada Tanaman	8
2.7 Senyawa Fenol dan Sintesisnya Dalam Tanaman	9
2.8 Hipotesis	9
III. METODE PENELITIAN	10
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	10

3.2 Bahan dan Alat	10
3.3 Metode	10
3.4 Parameter Pengamatan	11
3.4.1 Ekstraksi dan Pengukuran Aktivitas Enzim β -1,3-Glukanase ...	11
3.4.2 Pengukuran Kandungan Protein	11
3.4.3 Ekstraksi dan Pengukuran Kandungan Fenol Total	12
3.4.4 Ekstraksi dan Pengukuran Kandungan Karbohidrat	12
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	14
4.1 Aktivitas Enzim β -1,3-Glukanase pada Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS	14
4.2 Kandungan Senyawa Fenolik pada Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS	16
4.3 Kandungan Karbohidrat pada Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS	17
V. KESIMPULAN DAN SARAN	20
5.1 Kesimpulan	20
5.2 Saran.....	20
DAFTAR PUSTAKA	21
LAMPIRAN	23

DAFTAR GAMBAR

1. Aktivitas Enzim β -1,3-Glukanase pada Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS	15
2. Kandungan Fenol pada Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS.....	16
3. Kandungan Karbohidrat pada Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS.....	19



DAFTAR LAMPIRAN

1. Standar Glukosa	23
2. Standar Protein (BSA)	23
3. Standar Fenol (Asam Galat)	23
4. Standar Glukosa	24
5. Standar Sukrosa	24
6. Data Aktivitas Enzim β -1,3-Glukanase pada Tanaman Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS	25
7. Data Kandungan Protein pada Tanaman Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS	26
8. Data Kandungan Fenol Total pada Tanaman Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS	27
9. Data Kandungan Glukosa pada Tanaman Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS	28
10. Data Kandungan Sukrosa pada Tanaman Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS	29
11. Data Kandungan Amilum pada Tanaman Kakao Klon GC 7 Hasil Mutasi Menggunakan EMS	30

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kakao merupakan salah satu komoditas perkebunan yang peranannya cukup penting bagi perekonomian Indonesia, dalam hal ini kakao berperan sebagai penyedia lapangan kerja bagi pekebun, dan sumber devisa bagi negara. Berdasarkan data Departemen Pertanian Republik Indonesia, pada tahun 2002 kakao dapat menyediakan lapangan kerja bagi 900 ribu petani yang sebagian besar berada di Kawasan Timur Indonesia (KTI). Pada tahun 2008 kakao menyumbang devisa sebesar US \$ 701 juta dan merupakan komoditas terbesar ke tiga dari sub sektor perkebunan setelah karet dan kelapa sawit (Goenadi *et al.*, 2005), dan pada tahun 2008 mengalami peningkatan dengan nilai sebesar US \$ 1,268 milyar.

Sejak tahun 2009, pemerintah melaksanakan Program Gerakan Nasional Percepatan Revitalisasi Kakao Nasional (GERNAS) di sembilan provinsi yang meliputi Sulawesi Selatan, Sulawesi Barat, Sulawesi Tengah, Sulawesi Tenggara, Nusa Tenggara Timur, Bali, Maluku, Papua Barat dan Papua. Gerakan yang dilaksanakan sampai tahun 2011 ini bertujuan untuk mempercepat peningkatan produktivitas dan mutu kakao nasional dengan memberdayakan seluruh potensi pemangku kepentingan perkakaoan nasional. Harga kakao yang cenderung mengalami kenaikan dari tahun ke tahun mendorong komoditas ini untuk dikembangkan secara luas, baik diperkebunan rakyat maupun di perkebunan milik negara.

Kakao merupakan tanaman perkebunan yang sangat cocok dikembangkan diperkebunan rakyat, karena sifatnya yang dapat berbuah sepanjang tahun, sehingga dapat memberikan pendapatan harian bagi petani dan dapat meningkatkan perekonomian mereka. Harga kakao yang cenderung stabil dan terus mengalami peningkatan dari tahun ke tahun, juga menjadi salah satu alasan komoditas ini sangat cocok dikembangkan oleh perkebunan rakyat.

Seiring dengan peningkatan luas perkebunan kakao di Indonesia, populasi organisme pengganggu tanaman mengalami peningkatan. Salah satu penyakit penting pada perkebunan kakao adalah penyakit busuk buah

(*Phytophthora palmivora*). Hal inilah yang menjadi kendala dalam pengembangan kakao ditingkat petani, yang berakibat pada rendahnya produktivitas kakao di Indonesia. Pengendalian penyakit busuk buah ditingkat petani masih bertumpu pada penggunaan fungisida. Pengendalian dengan cara ini mempunyai banyak kelemahan, selain tidak ramah lingkungan fungisida juga berbahaya bagi tubuh manusia melalui residu yang ditinggalkan pada produk yang dihasilkan. Di pasaran internasional, kakao yang mengandung residu fungisida banyak ditolak dan jika laku harganya sangat rendah.

Masalah rendahnya produktivitas tanaman merupakan masalah klasik yang hingga kini masih dihadapi pada tanaman kakao. Secara umum rata-rata produktivitas kakao di Indonesia sebesar 900 kg/ha/thn, masih jauh dibawah rata-rata potensi yang diharapkan sebesar 2000 kg/ha/thn. Salah satu penyebab rendahnya produktivitas kakao di Indonesia adalah serangan penyakit busuk buah kakao (Wahyudi dan Misnawi, 2007). Kehilangan hasil akibat serangan *P. palmivora* sangat bervariasi bergantung pada faktor-faktor yang berpengaruh seperti curah hujan, suhu kelembaban dan genetik tanaman.

Ketersediaan tanaman unggul yang berpotensi produksi tinggi serta tahan penyakit utama masih menjadi kendala dalam upaya meningkatkan produktivitas tanaman kakao. Upaya mendapatkan tanaman unggul tersebut menjadi sasaran utama dalam program pemuliaan tanaman kakao. Salah satu metode yang dapat digunakan untuk memperoleh tanaman unggul adalah dengan mutasi dengan menggunakan senyawa kimia. EMS merupakan salah satu mutagen kimia yang telah diaplikasikan dan mampu menginduksi mutasi pada beberapa jenis tanaman.

Uji ketahanan klon kakao terhadap *P. palmivora* dapat dilakukan pada masa pembibitan (Tahi *et al.*, 2007). Terdapat hubungan antara resistensi kakao terhadap *P. palmivora* dengan luka nekrosis daun pasca inokulasi. Umumnya tanaman yang resisten memiliki luka nekrosis lebih kecil. Selain itu, menurut Omokolo (2003), kakao yang resisten juga memiliki kandungan senyawa fenolik dan aktivitas enzim β -1,3-Glukanase lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman yang rentan.

1.2 Perumusan Masalah

1. Bagaimana hubungan antara ketahanan tanaman kakao klon GC 7 hasil mutasi menggunakan EMS terhadap *P. palmivora* dengan aktivitas enzim β -1,3-glukanase.
2. Bagaimana hubungan antara ketahanan tanaman kakao klon GC 7 hasil mutasi menggunakan EMS terhadap *P. palmivora* dengan kandungan fenol.
3. Bagaimana kandungan karbohidrat pada tanaman kakao klon GC 7 hasil mutasi menggunakan EMS.

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui aktivitas enzim β -1,3-glukanase pada kakao klon GC 7 hasil mutasi menggunakan EMS.
2. Untuk mengetahui kandungan fenol pada kakao klon GC 7 hasil mutasi menggunakan EMS.
3. Untuk mengetahui kandungan karbohidrat pada kakao klon GC 7 hasil mutasi menggunakan EMS.

1.4 Manfaat Penelitian

Aktivitas enzim β -1,3-glukanase, kandungan fenol, dan kandungan karbohidrat dapat digunakan sebagai dasar dalam seleksi tanaman kakao, sehingga diharapkan akan diperoleh tanaman yang unggul.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sistematika Tanaman Kakao

Tanaman kakao (*Theobroma cacao*, L.) merupakan salah satu tanaman perkebunan yang dikembangkan dalam rangka peningkatan sumber devisa negara dari sektor nonmigas. Tanaman kakao tersebut merupakan salah satu anggota genus *Theobroma* dari famili *Sterculiaceae* yang banyak dibudidayakan. 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.

2.2 Deskripsi Kakao Klon GC 7

Kakao lindak klon GC 7 merupakan klon unggul yang dilepas oleh Menteri Pertanian pada tahun 1997 dengan surat keputusan No.: 735/Kpts/TP.240/7/97. Deskripsi kakao klon GC 7 yang diberikan oleh Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia adalah: habitus tanaman sedang, daya hasil 2.035 kg/ha, berat biji kering 1,26 g/biji, warna flush merah, bentuk daun membulat dengan ujung daun meruncing dan pangkal daun tumpul, bentuk buah agak bulat dengan pangkal buah tumpul tanpa leher botol, kulit buah agak kasar, dengan alur buah tidak tegas dan ujung buah meruncing. Warna buah muda merah kecoklatan dan warna buah masak merah kecoklatan. Respon terhadap serangan penyakit busuk buah yaitu rentan, sedangkan terhadap serangan hama *Helopeltis* spp. tanaman kakao klon GC 7 tergolong moderat.

2.3 Penyakit Busuk Buah pada Tanaman Kakao

Penyakit busuk buah disebabkan oleh jamur *P. palmivora*. Penyakit busuk buah merupakan penyakit penting pada tanaman kakao, karena penyakit ini terdapat hampir diseluruh areal pertanaman kakao. Gejala serangan pada buah adalah pembusukan disertai bercak cokelat kehitaman dengan batas yang tegas. Salah satu dampak serangan yang paling merugikan adalah penurunan produksi kakao yang cukup drastis (Anonim, 2005; Sunanto, 2005; Susanto, 1994).

Jamur *P. palmivora* yang menginfeksi buah kakao dapat bersumber dari tanah, buah yang atau batang yang sakit, atau bersumber dari tanaman inang yang lain (Semangun, 2000). Jamur *P. palmivora* dapat menyebar dari satu buah ke buah lain melalui beberapa cara, terutama melalui percikan air hujan, hubungan langsung antara buah sakit dan buah sehat, dan melalu perantara binatang. Air hujan merupakan agen penyebar penyakit yang paling penting, karena berperan dalam menyebarkan spora jamur *P. palmivora* dari buah sakit ke buah sehat atau spora yang berasal dari tanah. Binatang dapat menyebarkan jamur ke tempat yang lebih tinggi dan lebih jauh, karena binatang dapat berpindah tempat dengan mudah. Salah satu binatang yang paling berperan dalam penyebaran jamur *P. palmivora* adalah golongan semut (Anonim, 2005).

Faktor-faktor yang mempengaruhi penyakit *P. palmivora* antara lain kelembaban udara, curah hujan, cara bercocok tanam, dan jenis tanaman. Kelembaban yang tinggi akan membantu pembentukan spora dan meningkatkan infeksi. Infeksi hanya akan dapat terjadi jika terdapat air pada permukaan buah. Cara bercocok tanam yang berpengaruh terhadap penyakit *P. palmivora* antara lain pemangkasan, kerapatan tanaman, pemberian mulsa, drainase, pemupukan, dan pemungutan hasil (Semangun, 2000).

Kerugian yang ditimbulkan akibat serangan penyakit *P. palmivora* sangat bervariasi. Di Kamerun penyakit ini menurunkan 20-80% produksi buah kakao, di Costa Rica diperkirakan berkurang 50%. Kerugian akibat serangan *P. palmivora* di Indonesia juga bervariasi. Di Kebun Kedondong dan Ngobo (Jawa Tengah) sebesar 49,8% dan 32%. Di Kebun Klatakan (Jawa Timur) kehilangan hasil sebesar 45,5% (Anonim, 2005).

Pengendalian penyakit yang disebabkan oleh jamur *P. palmivora* umumnya dilakukan dengan cara: (1) mengurangi kelembaban kebun dengan cara pengelolaan drainase yang baik, memangkas tanaman kakao dan pohon pelindung dengan teratur dan dengan mengendalikan gulma; (2) mempertahankan seresah sebagai mulsa disekitar pangkal batang tanaman kakao; (3) memanen buah masak secara teratur sambil membersihkan buah-buah yang sakit untuk dipendam cukup dalam, sehingga paling sedikit tertutup tanah setebal 10 cm; (4) selama musim hujan buah disemprot dengan fungisida tembaga 1-2 minggu sekali dengan dosis 0,15-2 g tembaga per pohon. Pemanfaatan jamur *Trichoderma* spp. sebagai agen hayati diketahui dapat menghambat perkembangan jamur *P. palmivora* pada buah kakao dalam skala laboratorium (Anonim, 2005).

2.4 EMS dan Peranannya dalam Mutasi

Mutasi adalah perubahan yang terjadi secara mendadak dalam bahan genetik organisme, yang kemudian dapat dipindahkan secara turun temurun ke keturunannya. Mutasi menyebabkan perubahan urutan basa pada untaian nukleotida DNA, baik melalui substitusi satu basa terhadap basa lain atau melalui penambahan atau pengurangan satu atau beberapa pasang basa (Agrios, 1996; Semangun, 2001).

Ethyl Methane Sulfonate (EMS) merupakan salah satu bahan kimia yang dapat menyebabkan mutasi pada beberapa jenis tanaman. Dari beberapa hasil penelitian, EMS telah diaplikasikan pada beberapa jenis komoditas diantaranya padi (Tatsuo, 1988), kacang panjang (*Vigna unguiculata* L.) (Danavel *et al.*, 2008). EMS memiliki kemampuan dalam mengalkilasi gugus oksigen dan gugus nitrogen reaktif pada basa purin dan pirimidin. Perlakuan menggunakan EMS dapat menyebabkan perubahan struktur basa-basa DNA yang berakibat terbentuknya rekombinasi pita DNA, sehingga materi genetik suatu organisme mengalami perubahan (Priyono dan Susilo, 2002).

2.5 Peranan Enzim β -1,3-Glukanase pada Tanaman Kakao

Enzim adalah molekul protein besar yang mengkatalisasi semua reaksi-reaksi yang saling berhubungan dalam sel hidup. Setiap reaksi kimia dalam sel dikendalikan oleh enzim berbeda yang mengkatalisasi reaksi tersebut (Agrios, 1996).

Enzim β -1,3-glukanase secara luas ditemukan pada sebagian besar bakteri, jamur, dan tanaman tingkat tinggi. Terdapat dua jenis glukonase, yang pertama adalah ekso- β -1,3-glukanase menghidrolisis laminarin secara berurutan memotong residu glukosa dari ujung suatu polimer atau oligomers. Sebagai konsekuensinya, hasil hidrolisis berupa monomer glukosa. Tipe yang kedua adalah, endo- β -glukanase memotong ikatan β -1,3 pada sisi yang acak sepanjang rantai polisakarida yang melepaskan oligosakarida yang lebih kecil (Cohen, 1999)

β -1,3-glukan adalah komponen struktur utama dinding sel dari banyak jamur patogen. Sebagai contoh, *P. infestans* adalah patogen *oomycetes* yang menyebabkan bercak pada kentang dan tomat. *Oomycetes* mempunyai dinding sel yang terdiri dari 80-90% β -1,3-glukan. β -1,3-glukanase tanaman merupakan bagian yang penting dari mekanisme pertahanan tanaman dalam melawan patogen jamur (Agrios, 1996). Berdasarkan pada aktivitas hidrolitik dari β -1,3-glukanase dan hubungannya dengan infeksi patogen, β -1,3-glukanase dinyatakan sebagai komponen penting dalam mekanisme pertahanan tanaman dalam melawan infeksi patogen.

Mekanisme interaksi antara inang dengan parasit sangat menentukan tingkat ketahanan tanaman terhadap suatu penyakit. Mekanisme ketahanan tanaman dapat berupa hiper sensitifitas sel dengan cara pembentukan lignin atau protein struktural, senyawa fitoaleksin dan sintesis protein PR (*patogenesis related proteins*) seperti kitinase dan glukonase. Beberapa tanaman menghasilkan kedua enzim ini sebagai bagian dari sistem pertahanan melawan jamur patogen, karena keduanya dapat menghidrolisis komponen dinding sel jamur patogen. β -1,3-glukanase berperan dalam menghidrolisis β -1,3-glukan yang merupakan penyusun utama dari dinding sel jamur patogen (Agrios, 1996). Pemahaman mengenai mekanisme ketahanan tanaman terhadap suatu penyakit merupakan

salah satu faktor penting yang diperlukan dalam usaha mengatasi serangan jamur tersebut.

2.6 Karbohidrat pada Tanaman

Karbohidrat merupakan senyawa yang terbentuk dari molekul karbon (C), hydrogen (H), dan oksigen (O) dan berfungsi sebagai sumber energi. Dalam tumbuhan senyawa ini dibentuk melalui proses fotosintesis antara air (H_2O) dengan karbondioksida (CO_2) dengan bantuan sinra matahari menghasilkan senyawa sakarida dengan rumus $(CH_2O)_n$. Karbohidrat dalam jaringan merupakan cadangan makanan atau energi yang disimpan dalam sel. Sebagian besar karbohidrat yang ditemukan di alam terdapat sebagai polisakarida dengan berat molekul tinggi. Karbohidrat dibedakan menjadi dua jenis yaitu karbohidrat sederhana (glukosa) dan karbohidrat kompleks (amilum) (Irawan, 2007)

Glukosa merupakan senyawa golongan karbohidrat yang merupakan sumber energi utama bagi makhluk hidup karena glukosa berasal dari proses fotosintesis yang mengkonversi energi matahari menjadi energi kimia. Energi yang terkandung dalam senyawa glukosa selanjutnya akan ditransformasi melalui serangkaian reaksi katabolisme yang dinamakan glikolisis. Glikolisis terjadi di dalam sitosol di dalam sel yang menghasilkan senyawa turunan dan energi konversi dalam bentuk senyawa kimia yang lain (ATP) (Dey, 1997).

Selain glukosa, golongan karbohidrat yang lain adalah sukrosa dan amilum yang digunakan tanaman sebagai cadangan energi. Untuk dapat digunakan oleh tanaman sebagai sumber energi, sukrosa harus dirombak menjadi senyawa yang lebih sederhana yaitu glukosa atau fruktosa. dan amilum dirombak menjadi glukosa (Dey, 1997).

Amilum merupakan cadangan utama polisakarida yang terdapat dalam sel tumbuhan. Amilum disintesis dalam kloroplas dan dalam organ nonfotosintetik, dalam bentuk amiloplas. Amilum adalah polimer glukosa yang terdapat dalam dua bentuk yaitu amilosa yang dasarnya berupa molekul linear, dan amilopektin yang merupakan molekul bercabang banyak dengan panjang rantai bervariasi (Agrios, 1996).

2.7 Senyawa Fenol dan Sintesisnya Dalam Tanaman

Fenol merupakan senyawa yang berasal dari tumbuhan yang umumnya ditemukan di dalam vakuola sel. Fenol terdiri dari beraneka ragam struktur dengan ciri khas berupa cincin aromatik yang mengandung satu atau dua gugus hidroksil. Jalur sintesis senyawa fenol bermula dari produk hasil perombakan glukosa yaitu melalui proses glikolisis. Salah satu hasil dari proses glikolisis adalah fosfoenol piruvat. Selanjutnya, produk tersebut akan memasuki jalur asam shikimat untuk menghasilkan fenilalanin sebagai materi awal untuk alur metabolik fenil propanoid (Dey, 1997).

Pembentukan asam shikimat dimulai dengan kondensasi aldol antara suatu tetrosa yaitu eritrosa dan asam fosfoenolpiruvat. Pada kondensasi ini, gugus metilen $C=CH_2$ dari asam fosfoenolpiruvat berlaku sebagai nukleofil dan beradisi dengan gugus karbonil $C=O$ dari eritrosa menghasilkan suatu gula yang terdiri dari 7 atom karbon. Selanjutnya reaksi yang analog (intramolekuler) menghasilkan asam 5-dehidrokuinat yang mempunyai lingkaran sikloheksana yang kemudian diubah menjadi asam shikimat. Asam pefenat terbentuk oleh adisi asam fosfoenolpiruvat kepada asam shikimat. Berikutnya aromatisasi dari asam pefenat menghasilkan fenilpiruvat yang menghasilkan fenilalanin melalui reaksi reduktif aminasi. Akhirnya, deaminasi dari fenilalanin menghasilkan asam sinamat. Reaksi paralel yang sejenis terhadap tirosin yang mempunyai tingkat oksidasi yang lebih tinggi menghasilkan asam kumarat dan selanjutnya asam-asam kafeat, ferulat dan sinapat (Lenny, 2006).

2.8 Hipotesis

1. Semakin tahan tanaman kakao klon GC 7 hasil mutasi menggunakan EMS terhadap *P. palmivora* maka aktivitas enzim β -1,3-glukanase semakin tinggi.
2. Semakin tahan tanaman kakao klon GC 7 hasil mutasi menggunakan EMS terhadap *P. palmivora* maka kandungan fenol semakin tinggi.
3. Terjadi variasi kandungan karbohidrat pada tanaman kakao klon GC 7 hasil mutasi menggunakan EMS.

III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Jember. Pelaksanaan penelitian dimulai Bulan Desember 2009 sampai dengan April 2010.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun mutan kakao klon GC 7, nitrogen cair, buffer sodium asetat, *reagent* folin ciocalteau, *reagent* resorsinol, *reagent* DNS, *reagent* Bradford, bovine serum albumin (BSA), asam galat, sukrosa, glukosa, laminarin 1%, dan bahan-bahan lainnya yang mendukung penelitian ini.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: timbangan analitik, *water bath*, pemanas elektrik, pH meter, mortar-stamper, mikropipet, sentrifuge, stirer magnetik, vorteks, spektrofotometer, 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 kontrol (rentan) digunakan Klon GC 7 tanpa perlakuan. Dari masing-masing kategori tersebut diambil sampel daunnya dan diuji aktivitas enzim β -1,3-glukanase, kandungan fenol, glukosa, sukrosa, dan amilum.

3.4 Parameter Pengamatan

3.4.1 Ekstraksi dan Pengukuran Aktivitas Enzim β -1,3-Glukanase

Sampel daun kakao sebanyak 1 g dimasukkan ke dalam mortar yang telah didinginkan dengan nitrogen cair dan diletakkan pada pecahan es, kemudian tambahkan nitrogen cair, gerus hingga halus, dan tambahkan pasir kuarsa gerus hingga benar-benar halus. Tambahkan 2 mL larutan buffer ekstraksi 50 mM sodium asetat pH 5,2 yang mengandung 0,5 M mannitol dan 10 mM β -mercaptoethanol, gerus hingga mencair dan kemudian masukkan dalam *ependorf*. Sentrifugasi pada 12.000 rpm suhu 4⁰C selama 15 menit. Supernatan digunakan sebagai sampel untuk pengukuran aktivitas enzim (Omokolo *et al.*, 2003).

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan cara dipipet sebanyak 600 μ L buffer sodium asetat 20 mM, 100 μ L laminarin 1%, kemudian divortex agar homogen, dan ditambahkan 300 μ L supernatan. Larutan tersebut diinkubasi pada suhu 37⁰C (Anggoro, 2007) selama 3 jam, kemudian ditambahkan *reagent* DNS 1 mL dan direbus selama 10 menit. Setelah dingin, absorbansinya diukur pada panjang gelombang 570 nm. Sebagai blanko, dipipet 600 μ L buffer sodium asetat 20 mM, supernatan 300 μ L, dan *reagent* DNS 1 mL kemudian direbus selama 10 menit dan didinginkan, tambahkan 100 μ L laminarin 1%. Absorbansinya diukur pada panjang gelombang 570 nm. Jumlah glukosa dihitung menggunakan persamaan regresi dari kurva standar glukosa. Aktivitas relatif enzim β -1,3-glukanase didefinisikan sejumlah enzim (mL) untuk menghasilkan glukosa dari substrat selama waktu reaksi.

3.4.2 Pengukuran Kandungan Protein

Pengukuran kandungan protein dilakukan untuk menentukan aktivitas spesifik enzim β -1,3-glukanase, yaitu sejumlah enzim (protein) untuk menghasilkan glukosa dari substrat selama waktu reaksi. Pengukuran kandungan protein dalam sampel dilakukan dengan cara dipipet 100 μ L supernatan ditambahkan 1 mL *reagent* Bradford kemudian divortex agar homogen dan

didiamkan selama 15 menit. Absorbansinya diukur pada panjang gelombang 595 nm. Kandungan protein dihitung menggunakan persamaan regresi kurva standar BSA (Bradford, 1976).

3.4.3 Ekstraksi dan Pengukuran Kandungan Senyawa Fenolik

Daun kakao dimasukkan ke dalam mortar kemudian ditambahkan nitrogen cair dan digerus hingga halus. 0,1 g sampel daun halus, tambahkan aquadest 7,5 mL, panaskan suhu 100°C selama 1 jam, kemudian didinginkan. Tambahkan aquadest hingga 10 mL, vorteks hingga homogen, kemudian masukkan dalam *ependorf* dan disentrifugasi 10.000 rpm 10 menit. Supernatan digunakan sebagai sampel untuk pengukuran kandungan senyawa fenolik.

Untuk pengukuran kandungan senyawa fenolik, 100 µL supernatan ditambah 100 µL ethanol, 50 µL *reagent* folin ciocalteau, 650 µL aquadest, vorteks hingga homogen dan didiamkan 5 menit. Tambahkan 100 µL Na₂CO₃ 5% kemudian vorteks dan diamkan selama 1 jam. Absorbansinya diukur pada panjang gelombang 725 nm. Kandungan fenol total dihitung menggunakan persamaan regresi dari kurva standar asam galat.

3.4.4 Ekstraksi dan Pengukuran Kandungan Karbohidrat

Daun kakao dihilangkan tulang daunnya, kemudian dipotong-potong dan dimasukkan ke dalam mortar. Tambahkan nitrogen cair, gerus hingga halus dan ditimbang 2 g sampel daun, di tambahkan 5 mL aquades dan divorteks hingga homogen. Dipanaskan pada 80°C selama 10 menit kemudian didinginkan dan disentrifugasi pada 2.000 rpm selama 10 menit. Supernatant digunakan sebagai sampel. Pelet diresuspensi dalam 5 mL aquades, divorteks hingga homogen dan dipanaskan pada 80°C selama 10 menit kemudian didinginkan, sentrifugasi pada 2.000 rpm 10 menit. Supernatan diambil dan dicampurkan dengan supernatan sebelumnya. Proses ini diulang sebanyak 5 kali sehingga volume akhir supernatan adalah 25 mL.

Pengukuran kandungan gula reduksi dilakukan dengan cara dipipet 100 µL supernatan ditambah 400 µL aquades, 500 µL *reagent* DNS, kemudian