

## Aktivitas Kitinase dan Peroksidase, Kerapatan Stomata Serta Ketahanan Kakao Terhadap Penyakit Busuk Buah

### *Chitinase and Peroxidase Activities, Stomatal Density and Resistance of Cocoa Against Black Pod Disease*

Rubiyo<sup>1\*)</sup>, Agus Purwantara<sup>2)</sup> dan Sudarsono<sup>3)</sup>

#### Ringkasan

Penelitian berdasarkan morfologi yang terkait dengan ketahanan struktural seperti kerapatan stomata dan ketahanan kimiawi yang melibatkan enzim-enzim kitinase maupun peroksidase perlu dilakukan, sehingga mekanisme ketahanan tanaman kakao terhadap patogen penyakit busuk buah (*Phytophthora palmivora*) dapat diketahui. Penelitian berlangsung pada bulan Juni 2008 hingga Februari 2009, bertempat di Laboratorium Penyakit Tanaman dan kebun percobaan Kaliwining, Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia di Jember Jawa Timur. Penelitian analisis kitinase dan peroksidase berlangsung di Laboratorium Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor. Berdasarkan hasil pengamatan stomata pada 10 klon, kerapatan stomata pada daun maupun buah tidak memberikan korelasi yang tinggi terhadap ketahanan. Klon kakao yang tahan tidak selalu menghasilkan jumlah kerapatan stomata yang lebih sedikit dibandingkan dengan yang rentan, atau klon kakao yang rentan tidak selalu memiliki jumlah stomata yang banyak di daun maupun pada buah. Jumlah stomata tidak berbeda nyata antara kelompok klon yang tahan maupun rentan. Aktivitas kitinase dan peroksidase terhadap klon kakao yang diuji mengindikasikan ada peran kitinase terhadap ketahanan kakao terhadap infeksi *Phytophthora palmivora*. Peningkatan aktivitas kitinase klon yang tahan umumnya lebih konsisten, begitu juga pada enzim peroksidase.

#### Summary

*Research based on morphology which is related to structural resistance such as stomata density and chemical resistance involving chitinase and peroxidase enzymes needs to be conducted. Hereafter, cacao resistant mechanism against Phytophthora palmivora can be realized. Research took place in June 2008 till February 2009 in Plant Disease Laboratory and Experiment Station of Kaliwining, Indonesian Coffee and Cacao Research Institute, Jember, East Java. Research on chitinase and peroxidase analysis took place in Inter University Center Laboratory of Bogor Agriculture University (IPB). Based on stomata observation of 10 clones, the stomata density in pod and leaf did not give high correlation to the resistance. Resistant cacao clone did not always low stomata*

---

Naskah diterima (*received*) 22 Desember 2009, disetujui (*accepted*) 16 Mei 2010.

1). Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Bali, Jl. Bay Pas Ngurah Rai Pasanggaran, Denpasar.

2). Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Bogor, Jl. Taman Kencana No. 1, Bogor.

3). Fakultas Pertanian IPB Bogor, Jl. Meranti Kampus IPB, Darmaga, Bogor.

\*) Alamat penulis (*Corresponding Author*) : rubiyo\_rb@yahoo.co.id

*density compared to susceptible ones. Cacao clone which was susceptible did not always have high stomata density in pod and leaf. The number of stomata did not give significant difference between resistant clones and susceptible ones. The activities of chitinase and peroxidase enzymes upon tested clones indicated that there was chitinase role in the resistance of cacao against the infection by P. palmivora fungi. The increase of chitinase activity fungus in resistant clones generally intensified consistently, and similiar with peroxidase enzyme.*

**Key words:** Chitinase activity, peroxidase, stomata, *Phytophthora palmivora*, cacao resistance.

## PENDAHULUAN

Penanaman bibit kakao yang tahan terhadap penyakit busuk buah akibat infeksi *Phytophthora palmivora* merupakan pemecahan jangka panjang penyakit ini. Simmonds (1994) menyatakan bahwa ketahanan buah kakao terhadap *P. palmivora* diperkirakan lebih bersifat horizontal daripada vertikal. Menurut Agrios (1997) ketahanan tanaman terhadap patogen yang menyerang dapat bersifat pasif (terbentuk tanpa rangsangan dari patogen) atau aktif (ekspresinya diimbaskan oleh serangan patogen), yang melibatkan mekanisme struktural dan biokimia. Duniway (1983) menyatakan bahwa ketahanan tanaman terhadap *Phytophthora* spp. meliputi ketahanan struktural, penghalang struktural terimbaskan, reaksi hipersensitif, dan produksi senyawa antimikroba.

Ketahanan buah kakao terhadap *P. palmivora* merupakan sistem multi-komponen yang terekspresi dalam dua tahap, dinyatakan sebagai ketahanan prapenetrasi dan pascapenetrasi. Ketahanan prapenetrasi berhubungan dengan faktor morfologi yang mempengaruhi perkembangan prapenetrasi dan penetrasi patogen, dan menentukan jumlah gejala bercak yang terjadi. Ketahanan pascapenetrasi berhubungan dengan mekanisme biokimia yang dapat mempengaruhi luas bercak yang berkembang setelah jaringan diserang patogen (Iwaro *et al.*, 1995). Fry (1982) menyatakan bahwa pada tanaman yang tahan walaupun patogen berhasil memenetrasi

jaringan inang, seringkali perkembangan selanjutnya terhambat.

Mekanisme ketahanan struktural dapat berupa sifat morfologi dan anatomi. Menurut Fry (1982), karakteristik struktural dapat mempengaruhi ketahanan inang terhadap patogen. Fulton (1989) memperkirakan morfologi buah kakao berpengaruh pada disposisi dan penyebaran efektif inokulum *P. palmivora*. Permukaan buah kakao dapat menjadi inkubator mikro bagi pertumbuhan spora *P. palmivora*. Karena spora patogen ini bersifat hidrofilik, spora dapat berada dalam lapisan air permukaan buah dan biasanya mengumpul pada bagian ujung buah. Tarjot (1974) menyatakan bahwa lendir di permukaan buah berpengaruh besar pada perkecambahan spora *P. palmivora*.

Diperkirakan ketahanan terhadap patogen ini terletak pada beberapa lapisan sel parenkima di bawah epidermis. Enriquez & Soria (1999) menunjukkan bahwa setiap buah kakao yang tahan terhadap *M. roreri* mempunyai pengaturan tingkat seluler dari parenkim sub epidermis yang berbeda, yaitu mempunyai sel-sel yang kompak dan juga mengandung sejumlah besar senyawa fenolat dibandingkan buah rentan. Lignifikasi dinding sel merupakan suatu bentuk ketahanan tanaman terhadap penetrasi patogen. Pada dinding sel, lignin terdapat

dalam lamela tengah, dinding sel primer dan sekunder (Akai & Fukutomi, 1980). Menurut Friend (1979), lignifikasi merupakan salah satu mekanisme ketahanan mentimun terhadap *Cladosporium cucumerinum*. Penggabungan lignin ke dalam dinding sel tanaman memberikan kekuatan mekanik dan memungkinkan dinding sel lebih tahan terhadap degradasi enzim yang disekresikan oleh patogen (Goodwin & Mercer, 1990).

Tumbuhan memiliki berbagai mekanisme untuk melindungi dari infeksi berbagai patogen tanaman yang berpotensi merusak. Mekanisme yang ada antara lain dengan meningkatkan sintesis berbagai protein yang menghambat perkembangan patogen seperti kitinase dan peroksidase. Selain aktivitasnya yang dapat mendegradasi senyawa kitin dan berfungsi sebagai protein anti cendawan (Wang *et al.*, 2005), kitinase merupakan salah satu anggota dari *pathogenesis-related* (PR) protein yang ekspresinya meningkat sejalan dengan terjadinya infeksi pada jaringan tanaman. Menurut Oku (1994), peranan kitinase sebagai mekanisme ketahanan tanaman terhadap serangan patogen terjadi melalui dua cara, yakni (i) menghambat pertumbuhan hifa cendawan dengan secara langsung menghidrolisis dinding miselia cendawan dan (ii) melepaskan elisitor endogen yang dapat meningkatkan reaksi ketahanan sistemik (*systemic acquired resistance/SAR*) pada inang.

Peroksidase (PR-9) juga merupakan salah satu anggota PR protein (Lagrimini *et al.*, 1997). Oku (1994) menyatakan bahwa peroksidase berperan dalam proses oksidasi dan polimerisasi prekursor untuk biosintesis lignin, yaitu senyawa yang berfungsi sebagai barrier fisik untuk menghambat perkembangan patogen yang menyerang tanaman. Peroksidase juga bersifat menghambat pertumbuhan cen-

dawan dalam pengujian *in vitro* (Saikia *et al.*, 2006). Aktivitas peroksidase yang tinggi pada tanaman terinfeksi patogen berkorelasi dengan ketahanan tanaman yang lebih tinggi terhadap *Sclerotium rolfsii* pada kacang tanah (Pujihartati *et al.*, 2006b).

Penelitian yang dilakukan ini bertujuan untuk mengevaluasi perbedaan densitas stomata pada daun dan buah kakao serta ada tidaknya hubungan antara densitas stomata dengan respons ketahanan terhadap infeksi *P. palmivora*. Selain itu, aktivitas kitinase dan peroksidase pada klon kakao yang diketahui mempunyai perbedaan respons ketahanan terhadap infeksi *P. palmivora*, juga dievaluasi.

## BAHAN DAN METODE

Pengamatan kerapatan stomata berlangsung pada bulan Desember 2008 hingga Februari 2009, di Kebun Percobaan Kaliwining, Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, Jember, Jawa Timur dan Laboratorium Ekofisiologi Tanaman, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Pengujian aktivitas kitinase dan peroksidase pada daun kakao dilakukan pada Januari hingga Mei 2009, di Laboratorium Bioteknologi Tumbuhan, PAU Institut Pertanian Bogor.

### Pengamatan Stomata

Sepuluh klon kakao yang mewakili kelompok rentan hingga tahan ditentukan berdasarkan hasil penelitian sebelumnya (Rubiyo, 2009). Klon kakao tersebut adalah: ICCRI 3, GC 7, DR 2, TSH 858, ICS 13, Sca 6, DR1, DRC 15, DRC 16 dan ICS 60. Dua pasang daun yang masih segar pada posisi no. 2 dari pucuk dipilih dari klon kakao yang diuji. Bagian

permukaan bawah daun dioles secara merata dengan kuteks (cat kuku) yang telah diencerkan menggunakan aseton. Lapisan kuteks dibiarkan selama 15 menit sampai kering dan dikelupas dengan menggunakan selotip transparan agar stomata daun kakaonya terikut. Cetakan stomata (*imprint*) yang didapat ditempelkan pada gelas obyek dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100 x. Untuk mempermudah pengamatan stomata, gambar stomata difoto dengan menggunakan kamera Canon tipe Digital IXUS 60 dan gambar yang didapat digunakan untuk menentukan kepadatan stomatanya. Penghitungan stomata dilakukan sebanyak lima kali pada tiga bidang pandang yang berbeda. Parameter yang diamati terdiri dari kerapatan stomata setiap cm<sup>2</sup>, yang dilakukan 5 kali pada 3 bidang pandang sebagai ulangan. Data kepadatan dianalisis secara statistik dengan menggunakan SAS versi 9.

Pengamatan stomata pada kulit buah dilakukan dengan menggunakan klon kakao dan metode cetakan stomata yang sama dengan pengamatan stomata pada daun. Kerapatan stomata di permukaan kulit buah dilakukan dengan menggunakan buah kakao berumur tiga bulan setelah antesis. Bagian permukaan kulit buah dioles dengan kuteks hingga merata dan setelah kering dikelupas dengan selotip transparan agar stomata buahnya terikut. Pengamatan stomata dilakukan dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100 x. Penghitungan stomata dilakukan sebanyak lima kali pada tiga bidang pandang yang berbeda.

### **Analisis Total Protein Terlarut**

Ekstraksi protein dari jaringan daun kakao dilakukan dalam kondisi lingkungan bersuhu sekitar 4°C. Contoh daun (0,5 g bobot basah) digerus dalam larutan penyangga fosfat (50 mM, pH 7) yang telah

didinginkan, dengan perbandingan antara daun dan larutan 1:4 (b/v). Ekstrak daun disentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dipisahkan dan ditentukan kandungan total protein terlarut (TPT) dengan menggunakan metode Pujihartati *et al.* (2006a).

Untuk penetapan TPT digunakan pereaksi A (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dalam NaOH 0,1 M), pereaksi B (CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0,5% dalam Na-K-tartarat 1%), pereaksi C (dibuat ketika akan digunakan, 50 ml pereaksi A ditambah 1 ml pereaksi B) dan pereaksi D (*foline ciocalteau* yang dilarutkan dalam H<sub>2</sub>O dengan perbandingan 1:1). Satu ml supernatan hasil ekstraksi protein ditambahkan ke dalam 5 ml pereaksi C, divorteks dan didiamkan pada suhu ruang selama 10 menit. Ke dalam campuran ditambahkan pereaksi D 5 ml dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Setelah inkubasi, absorbansi campuran dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm. Total protein terlarut ditetapkan dengan kurva standar menggunakan bovin serum albumin (BSA). Kadar protein jaringan ditentukan dengan membagi nilai TPT dengan bobot contoh yang digunakan setelah memperhitungkan volume bufer pengekstraksi.

Aktivitas kitinase dalam ekstrak kasar protein dari daun sehat dan terinfeksi *P. palmivora* untuk 10 klon kakao, dianalisis berdasarkan kemampuannya untuk mendegradasi substrat dimer p-nitrofenil N-asetil β-D glukosaminida (pNP-NacGluc) mengikuti prosedur yang digunakan oleh Pujihartati *et al.* (2006a). Sebanyak 100 μl ekstrak kasar protein dicampur dengan 10 μl substrat pNP-NacGluc 5 mM, divorteks dan diinkubasi selama 0 dan 3 jam. Setelah inkubasi, reaksi dihentikan dengan menambahkan 25 μl trikloro asetat (TCA) 20%, divorteks dan disentrifugasi dengan

kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit. Ke dalam 0,3 ml supernatan yang didapat ditambahkan 0,7 ml NaOH 0,5 mM. Campuran diinkubasi selama 30 menit dan nilai absorbansinya diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 405 nm. Aktivitas kitinase dihitung berdasarkan banyaknya pNP (mM) yang dibebaskan per jam per mg protein (mM pNP/jam/mg protein).

### Analisis Aktivitas Ensim

Pengukuran aktivitas kitinase dan peroksidase daun dilakukan pada 10 klon kakao seperti pada pengamatan stomata yang dipanen dari Kebun Percobaan Kaliwining Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, di Jember, Jawa Timur. Daun sehat berumur sekitar 3 minggu (warna hijau muda) dipilih dan diberi tanda. Salah satu daun dari pasangan terpilih diinokulasi dengan menempelkan potongan agar (diameter 0,5 cm) yang mengandung miselia *P. palmivora*. Permukaan daun ditutup dengan kapas basah dan daun disungkup dengan kantong plastik transparan. Bagian ujung kantong plastik diikat dengan karet untuk menjaga kelembaban lingkungan mikro sehingga miselia *P. palmivora* dapat tumbuh dan berkembang. Tujuh hari sesudah inokulasi, contoh daun yang terinfeksi oleh *P. palmivora*, dengan gejala bercak kecoklatan dipetik dan diberi label sesuai dengan klonnya, disimpan dalam kotak pendingin serta dibawa ke laboratorium untuk dianalisis. Contoh daun sehat (daun yang tidak diinokulasi) juga dipetik dengan perlakuan yang sama dan digunakan sebagai pembanding (kontrol).

Aktivitas peroksidase dalam ekstrak kasar protein daun kakao ditentukan dengan metode yang dikembangkan oleh Kar & Mishra (1976) dan digunakan Pujihartati *et al.* (2006b). Ekstrak kasar protein (100  $\mu$ l) dari daun yang diuji ditambahkan

ke dalam larutan 2,5 ml pirogalol 0,2 M. Setelah homogen, ke dalam campuran ditambahkan 250  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1%) dan nilai absorbansi campuran sesudah reaksi diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm setiap 30 detik dalam periode 0–150 detik. Dalam pengukuran absorbansi digunakan blanko campuran larutan yang sama tetapi tanpa ekstrak kasar protein, yang diganti dengan larutan penyangga fosfat dengan volume yang sama. Aktivitas peroksidase dihitung sebagai peningkatan nilai absorbansi per satuan waktu per bobot protein ( $\Delta A_{420}$ /menit/mg protein) pada kondisi analisis.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kerapatan Stomata

Stomata merupakan lubang alami tempat masuknya *P. palmivora* dalam proses infeksi. Namun demikian, dalam penelitian ini di antara 10 klon kakao yang berbeda responsnya terhadap infeksi *P. palmivora* diamati tidak ada perbedaan kerapatan stomata. Sepuluh klon kakao yang diuji mempunyai kerapatan stomata pada permukaan daun dan buah yang tidak berbeda nyata (Tabel 1). Klon kakao ICCRI 3 dan ICS 13 yang tergolong agak tahan memiliki kerapatan stomata terkecil, yaitu masing-masing 82,1 dan 83,8 stomata/cm<sup>2</sup>. Klon kakao lainnya memiliki kerapatan stomata yang berkisar antara 100,3–131,0 stomata/cm<sup>2</sup> (Tabel 1).

Hasil pengamatan juga menunjukkan adanya perbedaan morfologi stomata pada permukaan daun berbagai klon kakao yang diuji. Pada umumnya, stomata pada permukaan daun kakao klon ICS 13 dan ICCRI 3 yang tergolong agak resisten terlihat lebih menonjol ke permukaan daun. Sebaliknya kakao klon GC 7 yang tergolong sangat rentan dan TSH 858 yang agak rentan umumnya mempunyai stomata agak masuk

ke dalam permukaan daun. Perbedaan morfologi stomata tersebut diduga dapat berperan dalam ketahanan prapenetrasi. Penetrasi *P. palmivora* secara langsung ke dalam daun atau buah kakao adalah melalui stomata atau lubang alami lainnya sedangkan secara tidak langsung melalui degradasi dinding sel daun atau buah kakao (Tarjot, 1972; Iwaro *et al.*, 1999; Philip-Mora, 1999).

Permukaan buah kakao diketahui memiliki alur primer, yang diperkirakan dapat mempengaruhi penyebaran, deposisi, dan pertumbuhan prapenetrasi inokulum. Akan tetapi berdasarkan hasil penelitian ini permukaan buah dan stomata daun tidak bisa dijadikan tolok ukur sebagai variabel ketahanan 10 klon kakao yang diuji terhadap *P. palmivora*. Ciri morfologi buah tidak berkorelasi dengan ketahanan pasca penetrasi, ini menunjukkan kemungkinan peran mekanisme biokimiawi (Iwaro *et al.*, 1997).

Hasil analisis regresi (Gambar 1) menunjukkan adanya korelasi negatif antara jumlah stomata pada buah dengan luas bercak yang disebabkan oleh infeksi *P. palmivora* pada beberapa klon kakao ( $R^2 = 0,038$ ) dan pada stomata daun ( $R^2 = 0,1519$ ). Hal ini mengindikasikan bahwa tidak terjadi korelasi antara luas bercak dengan kerapatan stomata klon kakao baik terhadap stomata daun maupun stomata pada buah kakao, sehingga variabel ini tidak bisa digunakan sebagai tolok ukur ketahanan terhadap penyakit busuk buah yang disebabkan oleh infeksi *P. palmivora*.

### Aktivitas Kitinase

Hasil pengamatan aktivitas kitinase terhadap klon kakao (Tabel 3) menginformasikan bahwa pada umumnya peningkatan aktivitas terdapat pada daun kakao yang sehat. Aktivitas kitinase cukup tinggi pada

daun sakit dihasilkan oleh klon ICS 60 (3,27) dan GC 7 (3,07). Klon Sca 6 yang dikategorikan klon agak tahan memiliki kandungan kitinase cukup tinggi (0,65) dibandingkan dengan klon yang lainnya. Apabila fungsi kitinase digunakan sebagai indikator fungsi ketahanan terhadap penyakit ini, enzim tersebut mampu berfungsi dengan baik. Hal ini ditunjukkan oleh aktivitas kitinase pada daun yang sakit meningkat 80% sehingga diduga ada peran kitinase dalam aspek pertahanannya terhadap infeksi penyakit busuk buah pada daun klon Sca 6. Peningkatan aktivitas kitinase tertinggi adalah ICS 13 (9700%) dan terkecil TSH 858 (19,2%) walau demikian peningkatan aktivitas kitinase ini tidak konsisten dengan informasi ketahanan seperti disebutkan dalam Tabel 1. GC 7, DRC 16 dan DR 2 yang diketahui rentan sampai sangat rentan terhadap *P. palmivora* memiliki peningkatan aktivitas kitinase 3-14 lipat dibandingkan Sca 6.

Kitinase diketahui turut berperan dalam mekanisme ketahanan terhadap infeksi *P. palmivora* karena dapat menghidrolisis ikatan  $\beta$ -1,4 di antara sub-unit N-asetilglukosamina (NacGLE) pada polimer kitin (Neuhaus, 1999). Enzim kitinase mempunyai peran penting dalam kontrol biologi berbagai patogen dengan mendegradasi senyawa kitin yang ada pada dinding sel cendawan (El-Katatny *et al.*, 2001). Zang *et al.* (2001) menjelaskan bahwa senyawa kitin diketahui merupakan salah satu penyusun dinding sel hifa *S. rolfii* yang menginfeksi tanaman kacang tanah. Degradasi senyawa pada ujung hifa diharapkan juga dapat menghambat perkembangan normal hifa dan selanjutnya dapat mengganggu proses infeksi cendawan ini pada tanaman inangnya. Selain itu kitinase juga dilaporkan ikut berperan dalam proses pelepasan elisitor yang mampu memicu reaksi ketahanan sistemik (*systemic*

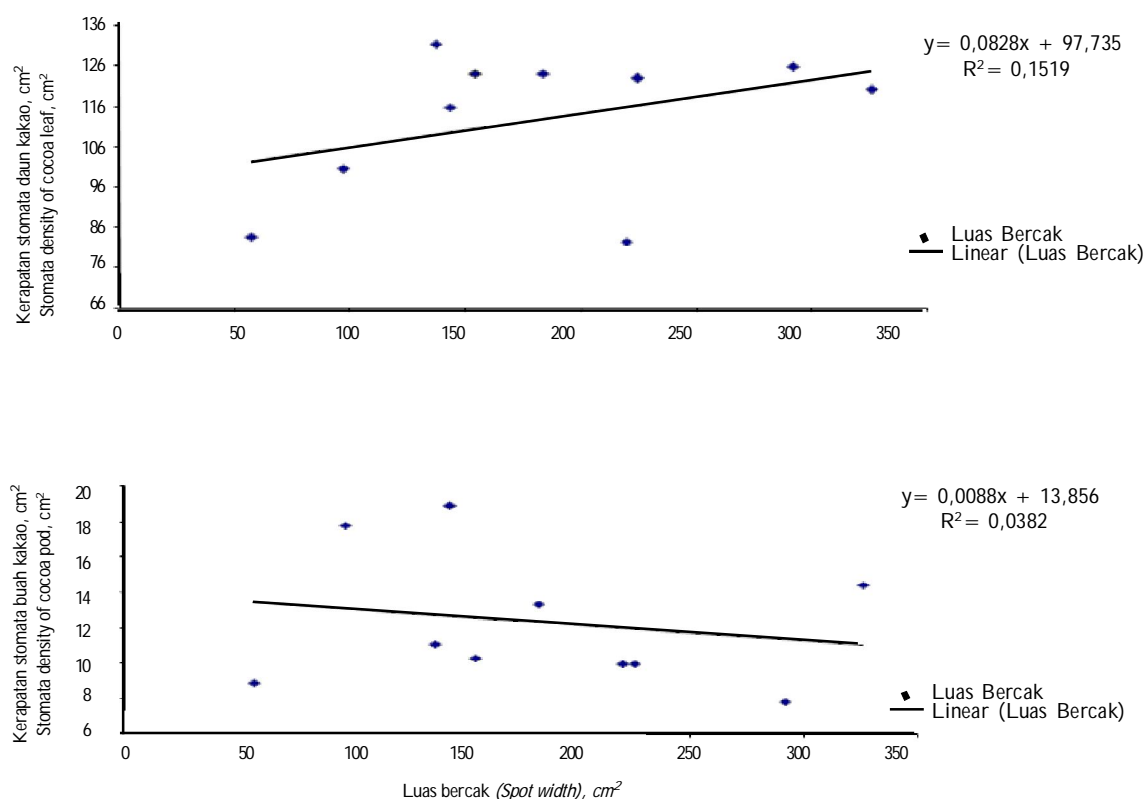
Tabel 1. Kerapatan stomata pada permukaan daun dan buah pada sepuluh klon kakao

Table 1. Leaf and pod stomata density of 10 cacao clones

| Klon kakao<br>Cacao clone | Respons terhadap <i>P. palmivora</i> *)<br>Response to <i>P. palmivora</i> | Kerapatan Stomata (stomata/cm <sup>2</sup> )<br>Stomata Density (stomata/cm <sup>2</sup> ) |            |
|---------------------------|--|--|------------|
|                           |  | Daun (Leaf)  | Buah (Pod) |
| DR 1                      | Agak rentan ( <i>Quite susceptible</i> )                                   | 115.48 a   | 17.78 a    |
| ICS 13                    | Agak tahan ( <i>Quite resistant</i> )                                      | 83.75 a  | 10.22 a    |
| TSH 858                   | Agak rentan ( <i>Quite susceptible</i> )                                   | 120.14 a   | 7.78 a     |
| ICCRI 3                   | Tahan ( <i>Resistant</i> )   | 82.14 a  | 8.89 a     |
| Sca 6                     | Agak tahan ( <i>Quite resistant</i> )                                      | 125.73 a   | 18.89 a    |
| ICS 60                    | Agak rentan ( <i>Quite susceptible</i> )                                   | 122.97 a   | 10.00 a    |
| DRC 15                    | Sangat rentan ( <i>Very susceptible</i> )                                  | 100.27 a   | 11.11 a    |
| DR 2                      | Rentan ( <i>Susceptible</i> )  | 131.01 a   | 10.00 a    |
| GC 7                      | Sangat rentan ( <i>Very susceptible</i> )                                  | 123.87 a   | 14.44 a    |
| DRC 16                    | Sangat rentan ( <i>Very susceptible</i> )                                  | 123.97 a   | 13.33 a    |

Keterangan (Notes): Angka dalam kolom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada aras 0,05 (Number in column followed by the same letter are not significantly different by DMRT test 0.05).

\*) Berdasarkan pengamatan yang telah dilakukan sebelumnya (based on previous observation) (Rubiyo, 2009) (Observation (Rubiyo, 2009)).



Gambar 1. Hubungan kerapatan stomata daun (atas) dan buah (bawah) dengan luas bercak yang disebabkan oleh infeksi *P. palmivora*.

Figure 1. Correlation of leaf (top) and pod (bottom) stomata density and spot width caused by *P. palmivora* infection.

*acquired resistance/SAR*) pada inang sehingga menghambat perkembangan penyakit (Oku, 1994).

### Aktivitas Peroksidase

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dari ekstrak kasar protein dari daun kakao yang sehat dan daun terinfeksi (Tabel 3), terdapat perbedaan aktivitas peroksidase. Klon DRC 16, DRC 15 dan DR 1 merupakan klon sangat rentan terhadap infeksi *P. palmivora*. Diketahui hasil analisis peroksidase terhadap daun yang sehat maupun daun yang terinfeksi memberikan nilai yang sama, artinya klon DRC 16 dan DRC 15 tidak memiliki kemampuan untuk meningkatkan peroksidase guna pertahanan akibat adanya infeksi patogen tersebut. Klon GC 7 yang juga termasuk kelompok sangat rentan menghasilkan peningkatan aktivitas peroksidase (PPr) 100%. Ada kecende-

runan peningkatan aktivitas peroksidase meningkat selaras dengan aras ketahanan klon kakao, walaupun ada pengecualian bahwa ICS 60 yang agak rentan justru memiliki peningkatan aktivitas yang sangat besar.

Hal ini diduga peran aktif enzim peroksidase pada tanaman kakao dapat digunakan sebagai alat pertahanan menghambat perkembangan patogen yang menginfeksi jaringan tanaman tersebut. Beberapa penelitian yang telah dilakukan terhadap tanaman lain menunjukkan adanya penghambatan oleh peroksidase terhadap pertumbuhan cendawan dalam pengujian *in vitro* (Saikia *et al.*, 2006). Pujihartati *et al.* (2006) melaporkan bahwa aktivitas peroksidase yang tinggi pada tanaman terkait dengan ketahanan yang lebih tinggi terhadap patogen pada tanaman kacang tanah. Peroksidase termasuk PR-9, telah

Tabel 2. Kandungan dan aktivitas kitinase ( $\mu\text{M}$  pNP/mg protein/jam) pada daun kakao sehat dan terinfeksi *P. palmivora*

Table 2. Chitinase content and activity ( $\mu\text{M}$  pNP/mg protein/hour) on healthy cacao leaves and infected by of *P. palmivora*

| Klon kakao<br><i>Cacao clone</i> | Kandungan kitinase<br><i>Chitinase content</i> |                                      | Peningkatan<br>aktivitas kitinase<br>(%)<br><i>Chitinase Increases</i><br>(%) |
|----------------------------------|--|--------------------------------------|---|
|                                  | Daun sehat<br><i>Healthy leaves</i>            | Daun sakit<br><i>Infected leaves</i> |   |
| DR1                              | 0.05   | 0.09                                 | 80  |
| ICS 13                           | 0.01   | 0.98                                 | 9700  |
| TSH 858                          | 0.73   | 0.87                                 | 19  |
| ICCRI 3                          | 0.02   | 1.41                                 | 6950  |
| Sca 6                            | 0.65   | 1.17                                 | 80  |
| ICS 60                           | 0.18   | 3.27                                 | 1717  |
| DRC 15                           | 0.55   | 0.41                                 | -26   |
| DR 2                             | 0.59   | 2.14                                 | 263   |
| GC 7                             | 0.24   | 3.07                                 | 1179  |
| DRC 16                           | 0.08   | 0.75                                 | 838   |



Tabel 3. Kandungan dan aktivitas peroksidase ( $\mu\text{M}$  pNP/mg protein/jam) pada daun kakao sehat dan terinfeksi *P. Palmivora*  
 Table 3. Peroxidase content and activity ( $\mu\text{M}$  pNP/mg protein/hour) on healthy cacao leaves and infected by *P. palmivora*

| Klon kakao<br><i>Cacao clone</i> | Kandungan peroksidase<br><i>Chitinase peroxidase</i> |                                      | Peningkatan aktivitas<br>peroksidase (%) (PPr)<br><i>Peroxidase<br/>increase percentage (%)</i> |
|----------------------------------|--|--------------------------------------|---|
|                                  | Daun sehat<br><i>Healthy leaves</i>                  | Daun sakit<br><i>Infected leaves</i> |   |
| DR1                              | 0.003  | 0.003                                | 0   |
| ICS 13                           | 0.000  | 0.006                                | 500   |
| TSH 858                          | 0.002  | 0.004                                | 100   |
| ICCRI 3                          | 0.000  | 0.003                                | 200   |
| Sca 6                            | 0.003  | 0.008                                | 166.66  |
| ICS 60                           | 0.000  | 0.013                                | 1200  |
| DRC 15                           | 0.002  | 0.002                                | 0   |
| DR 2                             | 0.001  | 0.004                                | 300   |
| GC 7                             | 0.002  | 0.004                                | 100   |
| DRC 16                           | 0.003  | 0.003                                | 0   |

berhasil dikarakterisasi dari sejumlah tanaman tingkat tinggi antara lain tembakau (Lagrimini *et al.*, 1987) dan kentang (Espelie *et al.*, 1986).

Keterlibatan peroksidase dalam tahapan polimerisasi lignin diduga secara langsung berkaitan dengan meningkatnya ketahanan fisik tanaman terhadap infeksi patogen maupun kerusakan fisik (Chitoor *et al.*, 1999). Dinding sel yang terlignifikasi merupakan penghalang yang dapat mencegah pergerakan hara sehingga patogen dapat mengalami kelaparan. Prekursor lignin berpengaruh toksik pada patogen. Semua perubahan dinding sel setelah infeksi dapat meningkatkan ketahanan, dengan menghentikan patogen secara langsung atau dengan memperlambat proses penetrasi sehingga tanaman dapat mengaktifkan mekanisme pertahanannya.

## KESIMPULAN

1. Kerapatan stomata pada daun maupun buah tidak berpengaruh terhadap ketahanan kakao.

2. Peningkatan aktivitas kitinase dan peroksidase pada klon kakao yang diuji mengindikasikan ada kecenderungan peran kitinase dalam ketahanan kakao terhadap infeksi *P. palmivora*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agrios, G.N. (1997). *Plant Pathology*. Academic Press. New York. 4<sup>th</sup> Ed. 803 p.
- Akai, S. & M. Fukutomi (1980). Preformed internal physical defenses. p 80-93 *In*: J.A. Bailey & B.J. Deverall (Eds). *Dynamic of Host Defence*: Academic Press. Sydney.
- Akrofi, A.Y. & I. Y. Opoku (2000). Managing *Phytophthora megakarya* pod root disease. Ghana experience. *Proc. 3<sup>rd</sup> Int.Seminar of International Permanent Working Group for Cocoa Pest and Diseases*. Kota Kinabalu, Sabah Malaysia. 16-17<sup>th</sup> October.
- Chittor, J.M.; J.E. Leach & F.F. White (1999). Induction of peroxidase during defense against pathogens. p171-188. *In*: S.K. Datta & S. Muthu-krishnan (Eds.). *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. Science.

- Duniaway, J.M. (1983). Role of physical factors in development of *Phytophthora* Diseases. p. 175-188. **In:** D.C. Erwin, S.B. Gracia & P.H. Tsao (eds) *Phytophthora, Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. APS. St. Paul, Minnesota.
- El-Katatny, M.; M.H. Gudelj; K.H. Robra; M.A. Elnaghy & G.M. Gobitz (2001). Characterization of chitinase and endo-beta-1,3-lucanase from *Trichoderma arzanum* Rifai T24 involved in control of phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56, 137–143.
- Fry, W.E. (1989). *Principles of Plant Disease Management*. Academic Press, New York. 376p.
- Goodwin, T.W. & E.I Mercer (1990). *Introduction to Plant Biochemistry*. Pergamon Press, Oxford. 677p.
- Iwaro, D.A.; T.N Sreenivasan & P. Uma-haran (1995). Differential reaction of cocoa clones to *Phytophthora palmivora* infection. *CRU, Univ. West Indies, Trinidad*, 79–85.
- Iwaro, D.A; T.N. Sreenivasan & P. Uma-haran (1997). *Phytophthora palmivora* resistance in cocoa (*Theobroma cacao*): Influence of pod morphological characteristics. *Plant Pathology*, 46, 557–565.
- Iwaro, D.AI; T.N. Sreenivasan & P. Umaharan (1998). Cocoa resistance to *Phytophthora*: Effects of pathogen species, inoculation depths, and pod maturity. *European J. Plant Pathol.*, 46, 557–565.
- Jacob, V.J. & Toxopeus (1971). The effect of pollinator parent on the pod value of hand pollinated pod of *Theobroma cacao* L. *Int. Cacao Res. Conf.*, Tafo, Ghana, 556–564.
- Lagrimini, L.M.; R.J. Joly; J.R. Dunlap & T.T.Y. Liu (1997). The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. *Plant. Mol. Biol.* 33, 887-895.
- Muller, R.A. (1974). Integrated control methods. p. 259–265. **In:** P.H. Gregory (Eds.) *Phytophthora Disease of Cocoa*. Longman, London.
- Neuhaus, J.M. (1999). Plant chitinase (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). p. 77–105. **In:** S.K. Datta & S. Muthukrishnan (Eds.). *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. CRC Pr. London.
- Oku, H. (1994). *Plants Pathogenesis and Disease Control*. Lewis Pub. CRC Press. Tokyo.
- Philips-Mora, W. (1999). Studies on resistance to black pod disease (*Phytophthora palmivora* Butler) at CATIE. *Proc. Int. Workshop on the Contribution of Disease Resistance to Cocoa Variety Improvement*: 41-50. Salvador, Bahia, Brasil. 24–26<sup>th</sup> November.
- Pudjihartati E.; S. Ilyas & Sudarsono (2006b). Aktivitas pembentukan secara cepat spesies oksigen aktif, peroksidase, dan kandungan lignin kacang tanah terinfeksi *Sclerotium rolfsii*. *Hayati*, 13, 166–172.
- Pudjihartati, E.; Siswanto; S. Ilyas & Sudarsono (2006a). Aktivitas enzim kitinase pada kacang tanah yang sehat dan yang terinfeksi *Sclerotium rolfsii*. *Hayati*, 13, 73–78.
- Rocha, H.M. (1974). Breeding cacao for resistance to *Phytophthora palmivora*. p. 211–218. **In:** P.H. Gregory (Ed.) *Phytophthora Disease of Cocoa*: Longman London.
- Rubiyo; A. Purwantara; Sri-Sukanto & Sudarsono (2008). Isolation of indigenous *Phytophthora palmivora* from Indonesia, their morphological and pathogenicity characterizations. *Pelita Perkebunan*, 24, 37- 49.
- Rubiyo (2009). *Kajian Genetika Ketahanan Tanaman Kakao (Theobroma cacao L.) Terhadap Penyakit Busuk Buah (Phytophthora palmivora) di Indonesia*.

- Disertasi*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, 168 p.
- Saikia, R.; P. Kumar; D.K. Arora; D.K. Gogoi & R. Azad (2006). *Pseudomonas aeruginosa* inducing rice resistance against *Rhizoctonia solani* Folia: production of salicylic acid and peroxidase. *Microbiol.*, 51, 375–380.
- Soria, J. (1974). Sources of resistance to *Phytophthora palmivora*. p. 197–202. **In:** P.H. Gregory (Ed.) *Phytophthora Disease of Cocoa*. Longman, London.
- Simmonds, N. W. (1994). Horizontal resistance to cocoa disease. *Cocoa Growers Bul.*, 47, 42–52.
- Toxopeus, H. (1999). Search for *Phytophthora* pod rot resistance and ESca 12pe at the Cocoa Research Institute of Negeria during the 1960s. p. 159–166. **In:** *Proc. of Workshop on the Contribution of Disease Resistance to Cocoa Variety Improvement*. Salvador, Bahia, Brasil. 24–26<sup>th</sup> November.
- Tarjot, M. (1972). Etude anatomique de la cabosse de cacaoyer en relation avec Lattaque du *Phytophthora palmivora*. *Proc. IV Int. Cacao Research Conf.* p. 379–397. St Augustine, Trinidad. 8–18<sup>th</sup> January.
- Tarjot, M. (1974). Physiology of fungus. p. 103–116. **In:** P.H. Gregory (Ed) *Phytophthora Disease of Cocoa*. Longman, London.
- Wood, G.A.R. (1985). Establishment. p. 119–165. **In:** G.A.R. Wood & R.A. Lass (Eds). *Cocoa*. Longman, London.
- Wirianata, H. (2004). *Ketahanan Tanaman Kakao Terhadap Penyakit Busuk Buah*. Disertasi. S3 UGM Yogyakarta.
- Wang S.; J. Wu; P. Rao; T.B. Ng & X. Ye (2005). A chitinase with antifungal activity from the mung bean. *Protein Expr. Purif.*, 40, 230–236.
- Zhang, M.; H.A. Melouk; K. Chenault & Z. El Rassi (2001). Determination of cellular carbohydrates in peanut fungal pathogens and bakers yeast by capillary electrophoresis and electrochromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5265–5269.
- Zedooks (1997). *Desease Resistance Testing in Cocoa*. INGENIC. UK. 58p.

\*\*\*\*\*