

## Kloning dan karakterisasi gen penyandi inhibitor proteinase dari kulit buah kakao

*Cloning and characterization of gene encoding proteinase inhibitor of cacao pod wall*

Mayta Novaliza ISDA<sup>1)</sup>, Musliar KASIM<sup>2)</sup>, MANSYURDIN<sup>3)</sup>,  
Tetty CHAIDAMSARI<sup>4)</sup> \*) & Djoko SANTOSO<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> Sekolah Pascasarjana Universitas Andalas, Padang 25163, Indonesia

<sup>2)</sup> Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Padang 25163, Indonesia

<sup>3)</sup> Fakultas MIPA, Universitas Andalas, Padang 25163, Indonesia

<sup>4)</sup> Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor 16151, Indonesia

### Summary

Attempts to increase cocoa production in Indonesia have been hindered by attack of CPB (*Conopomorpha cramerella*). There has been no effective measures to control this pest leading to development of cacao planting materials which resistant to the pod borer. One of genes functioning in plant defense system against insect pests such as caterpillar is Proteinase Inhibitor (PIN). This research aimed to isolate and characterize TcPIN gene of cacao pod wall. A clone of TcPIN was isolated with RT-PCR technique using total RNA of cacao pod wall and DNA primer designed based on the sequence Trypsin Inhibitor of cocoa bean accessible online. BlastX analysis of the sequence of the cDNA clone demonstrated that the  $\pm 600$  bp gene cloned with pGEM-T was PIN gene as indicated by highly homologous to Trypsin Inhibitor of *Theobroma microcarpum* resulted in 248 Score bits and E value  $1 e^{-64}$ . Two sequence alignment with the putative 21 kDa PIN of cacao seed indicated a moderately high homology. Contrasting these two sequences however found some non identical amino acids implying some variations.

[Key Words: *Theobroma cacao* L, TcPIN gene, cDNA clone, cocoa-pod borer].

\*) Penulis korespondensi

### Ringkasan

Usaha peningkatan produksi kakao di Indonesia terkendala antara lain oleh adanya serangan hama PBK (*Conopomorpha cramerella*). Untuk menanggulangi serangan PBK tersebut perlu adanya satu cara pengendalian yang efektif dan efisien, sehingga dapat mendorong usaha pengembangan bahan tanam yang tahan PBK. Salah satu gen membawa sifat ketahanan tanaman terhadap hama ulat adalah Proteinase Inhibitor (PIN). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi gen TcPIN dari kulit buah kakao. Klon cDNA TcPIN diisolasi dari kulit buah kakao dengan teknik RT-PCR menggunakan RNA total kulit buah kakao dan primer DNA yang dirancang atas dasar sekuen Inhibitor Tripsin biji kakao yang diakses lewat internet. Hasil analisis BlastX dari sekuen klon cDNA menunjukkan bahwa gen berukuran  $\pm 600$  pb yang telah diklon dengan pGEM-T tersebut adalah PIN karena memiliki homologi yang tinggi terhadap 21 kDa tripsin inhibitor dari *Theobroma microcarpum* yang menghasilkan Skor 248 bits dengan Nilai E  $1 e^{-64}$ . Penjajaran dua sekuen dengan PIN putatif 21 kDa yang berasal dari biji kakao menunjukkan tingkat homologi yang tinggi, dengan perbedaan nyata sehingga dapat terlihat bahwa keduanya tidak identik.

## Pendahuluan

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu komoditas perkebunan penting bagi Indonesia yang merupakan negara produsen terbesar ketiga setelah Pantai Gading dan Ghana. Untuk meningkatkan produksi kakao, pemerintah mencanangkan program revitalisasi perkebunan termasuk diantaranya perluasan areal dan peremajaan tanaman kakao. Luas lahan tanaman kakao Indonesia lebih kurang 992.448 ha dengan produktivitas rata-rata 900 Kg per ha (Indonesia, Departemen Perindustrian, 2007). Saat ini, Indonesia mengekspor 40% kakao ke Malaysia, 30% ke AS, 15% ke Singapura, dan 15% ke Eropa. Produksi kakao Indonesia tahun 2008 dibandingkan dengan tahun 2007 menurun 4% dari 500.000 ton menjadi 480.000 ton. Harga rata-rata kakao selama tahun 2008 sebesar US\$ 2.500 per ton dan pada tahun 2009 diperkirakan meningkat menjadi US \$ 2.900 per ton (Husaini, 2009). Sebagai salah satu komoditi ekspor nonmigas yang potensial, maka produksi kakao perlu terus ditingkatkan.

Namun demikian usaha peningkatan produksi kakao di Indonesia masih terkendala oleh adanya serangan penggerek buah kakao (PBK). Kehilangan produksi dapat mencapai hingga 80%, dan biji kakao yang berasal dari buah yang terserang mutunya menurun atau bahkan tidak laku dijual (Wardojo, 1992). Penggerek buah kakao (PBK) adalah masalah utama pada tanaman kakao di Asia Tenggara, termasuk Indonesia. Berdasarkan sifat larva PBK, hama ini sangat sulit penanggulangannya baik secara kimiawi maupun biologis. Berbagai upaya telah dilakukan untuk penanganan masalah serangan PBK

tersebut. Cara-cara penanggulangan PBK yang dapat dipandu dengan pengalaman petani diantaranya; (1) panen lebih awal, (2) panen semua buah menjelang akhir masa panen, (3) membersihkan sarasah di permukaan tanah, (4) mengurangi naungan, (5) mematickan kutu putih, kutu hijau dan *Apis* sp. yang menghasilkan embun madu, (6) menghindari penggunaan peptisida guna melestarikan musuh alami perlu diusahakan, (7) mengisolasi kebun kakao dari ladang-ladang kecil (Depparaba, 2002). Adanya sistem sarungnisasi (penyarungan buah) untuk penanggulangan hama PBK juga dilakukan di Sulawesi Tengah dan Nusa Tenggara Timur (Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, 2006). Namun sistem ini efektif pada musim buah sedikit karena pada saat itu hama PBK terakumulasi keberadaannya.

Hingga saat ini belum ada cara pengendalian yang efektif dan efisien terhadap hama PBK yang penyebarannya sangat cepat. Salah satu pemecahan yang menjadi pusat perhatian saat ini adalah penyediaan bahan tanam kakao tahan terhadap PBK. Salah satu gen ketahanan tanaman terhadap serangga hama adalah gen penyandi Proteinase Inhibitor. Enzim ini berperan untuk menghambat aktivitas protease serangga. Dengan demikian pengembangan tanaman tahan terhadap serangga hama terbuka peluang dengan memanfaatkan gen ketahanan *PIN* semacam ini (Lawrence & Koundal, 2002). *PIN* diharapkan dapat membantu upaya pemuliaan maupun seleksi klon kakao tahan PBK dari beberapa sentra kakao di Indonesia.

Proteinase inhibitor tanaman diketahui bersifat toksik terhadap predator dan patogen. Jika protein tersebut ter-

makan oleh hama, *PIN* akan berinteraksi dengan protease yang terdapat di dalam usus, selanjutnya terikat dan terkunci pada situs aktif (*active site*) protease (Terra *et al.*, 1996; Walker *et al.*, 1998). Oleh karena asam amino tidak dapat dihasilkan oleh proteasennya, hama menjadi kekurangan nutrisi sehingga pertumbuhan dan perkembangannya menjadi terhambat. Pada biji kakao telah ditemukan proteinase inhibitor sebagai protein penyimpanan (Tai *et al.*, 1991). Santosa (2001) telah melakukan pengembangan prosedur analisis ekspresi gen *PIN* pada tingkat DNA dari tanaman kakao UAH. Sedangkan usaha untuk mengkaitkan gen *PIN* dengan ketahanan terhadap PBK telah dianalisis di tingkat DNA pada tanaman yang diduga tahan PBK (Jaya *et al.*, 2004). Namun klon-klon dari tanaman tersebut mempunyai produksi yang rendah. Berdasarkan upaya dalam mendapatkan tanaman kakao tahan terhadap hama PBK, maka tujuan penelitian ini adalah mengisolasi dan karakterisasi gen *TcPIN* dari kulit buah kakao melalui hama larva PBK yang masuk menyerang buah kakao dan merusak isinya. Teknik yang digunakan adalah RT-PCR dengan primer spesifik dan RNA total dari kulit buah kakao.

#### **Bahan dan Metode**

##### *Isolasi RNA biji dan kulit buah kakao*

RNA kakao dari klon Ary dan klon Bal diisolasi dengan menggunakan metode Chaidamsari *et al.* (2005). Untuk mendapatkan RNA digunakan bufer ekstraksi sebagai deterjen, fenol kloroform sebagai pelarut organik serta litium klorida (LiCl). Uji kualitatif dilakukan melalui teknik elektroforesis RNA dalam gel

agarosa 1% yang ditambah dengan 1,5 mg/L etidium bromida, pada tegangan 25 voltase selama dua jam yang berperan untuk melihat pita hasil elektroforesis, sedangkan uji kuantitatif dengan melihat perbandingan serapan pada panjang gelombang 260 nm dengan 280 nm (Sambrook *et al.*, 1989).

##### *Design primer*

Primer dirancang menggunakan program primer3 yang tersedia pada situs web <http://frodo.mit.edu/>. Hal pertama yang dilakukan dalam perancangan primer adalah memasukkan data urutan basa DNA target, urutan dapat diketahui dengan mencari data gen *PIN* pada tanaman dikotil lain yang telah tersedia datanya di [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Perancangan menghasilkan beberapa primer dengan ukuran perkiraan fragmen hasil PCR yang bervariasi. Setiap primer disusun sedemikian rupa agar memenuhi kriteria (Rozen & Skaletsky, 1999). Hasil perancangan tersebut berupa urutan oligonukleotida dengan beberapa data yang penting untuk diketahui dalam pelaksanaan proses PCR, seperti,  $T_m$  (*melting temperature*), jumlah basa, kandungan GC dan yang lainnya.

##### *Isolasi dan kloning gen TcPIN pada pGEM-T- Easy*

Isolasi gen *TcPIN* dilakukan dengan RT-PCR menggunakan satu pasang primer spesifik yang komplemen ujung 5' *TcPIN* F21 (5' *A T G A A G A C C G C A A C A G C C C G T A ' 3* ) dan ujung 3' gen *TcPIN* R11 (5' *A T G C T T C G G T T A A C A A C T T G 3 ' )* sebagaimana diuraikan untuk gen *TcAPI* pada Santoso (2006). Setelah diisolasi dari gel, fragmen DNA hasil PCR dikloning

menggunakan vektor pGEM-T Easy. Volume ligasi yang digunakan adalah 10  $\mu$ L, terdiri atas: 3,5  $\mu$ L DNA insert hasil purifikasi *TcPIN* (~1.000 ng DNA insert), 0,5  $\mu$ L vektor pGEM-T Easy, 5  $\mu$ L bufer ligasi (Promega), dan 1  $\mu$ L enzim T4 ligase. Reaksi ligasi dilakukan pada suhu ruang selama satu jam, kemudian dilanjutkan pada suhu 4 °C semalam. Kemudian transformasi ke sel kompeten *E. Coli* (*XL1-Blue*). Selanjutnya dikulturkan 100  $\mu$ L pada medium LA yang mengandung ampicilin 200  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ L 100 mM IPTG dan 100  $\mu$ L 50 mg/mL X-Gal. Setelah diinkubasikan pada suhu 37°C semalam, maka dilakukan seleksi terhadap koloni yang tumbuh. Koloni yang dipilih adalah berwarna putih dan selanjutnya dilakukan PCR koloni dan membuat duplikat terhadap koloni terpilih tersebut. Program PCR terdiri dari initial denaturasi pada suhu 95°C selama empat menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan pada suhu 55°C selama satu menit, ekstensi pada suhu 72°C selama satu menit sebanyak 30 siklus, serta ekstensi final pada suhu 72 °C selama lima menit. Hasil PCR koloni selanjutnya diperiksa dengan gel agarose 1%.

#### *Identifikasi dan analisis klon plasmid rekombinan*

Miniprep/isolasi DNA plasmid dilakukan terhadap koloni terpilih dengan ukuran yang sesuai dan telah dikulturkan semalam pada medium LB cair dan diinkubasikan pada suhu 37°C dengan pengocokan 200 rpm. Prosedur dalam melakukan miniprep DNA plasmid yang digunakan adalah prosedur Roche. Kemudian diinkubasikan pada suhu 37 °C

selama satu jam dan diperiksa hasilnya pada gel agarose 1%.

Selanjutnya untuk memeriksa keberadaan DNA insert dapat dilakukan dengan pemotongan menggunakan enzim EcoRI sehingga dapat diketahui ukuran insert yang digunakan. Volume reaksi untuk digesti adalah 10  $\mu$ L yang terdiri atas: 3  $\mu$ L DNA plasmid hasil miniprep, 1  $\mu$ L NEB bufer, 1  $\mu$ L enzim EcoRI, dan 5 $\mu$ L MQ. Kemudian diinkubasikan pada suhu 37 °C selama satu jam dan diperiksa hasilnya pada gel agarose 1%.

#### *Penentuan dan analisis sekuen DNA*

Fragmen DNA produk RT-PCR gen *TcPIN* disekuen di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta menggunakan primer universal M13F dan M13R. Hasil sekuensing yang berupa urutan basa (nukleotida) dari fragmen DNA selanjutnya dapat dianalisis beberapa program bioinformatika. Untuk membandingkan dengan semua database yang telah diketahui pada NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), data sekuen dianalisis dengan program pencarian BLAST (Altschul *et al.*, 1997). Selanjutnya terhadap sekuen-sekuen tersebut dilakukan alignment dengan menggunakan program alignment multi sekuen ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

### **Hasil dan Pembahasan**

#### *Profil elektroforesis RNA total dari kulit buah kakao*

Isolasi RNA dari biji dan kulit buah kakao dengan ukuran panjang buah 9 cm dan 12 cm. Pemilihan ukuran buah tersebut sesuai dengan Wardoyo *dalam*

Depparaba (2002) yang menyatakan bahwa buah kakao dengan usia sangat muda dan panjang 5-7 cm tidak pernah terserang PBK. Buah kakao mulai terserang PBK pada panjang 9 cm dan PBK lebih menyukai buah kakao yang panjangnya lebih dari 9 cm (Sulistiyowati *et al.*, 2003). Selain itu digunakan biji kakao sebagai kontrol karena telah dipastikan bahwa gen *PIN* secara natural terekspresi pada biji kakao. Pengukuran absorbansi RNA kulit buah kakao (klon tahan PBK dan tidak tahan PBK) dan biji (Tabel 1). Berdasarkan data serapan masing-masing sampel, RNA total yang berhasil diisolasi memiliki kemurnian yang relatif tinggi, dilihat dari nisbah  $A_{260}/280$  yang mempunyai nilai 1,647-2,095 (Sambrook *et al.*, 1989). Adapun perolehan RNA total tertinggi adalah jaringan biji kakao.

Selain kemurnian, keutuhan (integritas) RNA juga merupakan parameter lainnya yang sering digunakan dalam pengujian kualitas RNA. Profil elektroforesis (Gambar 1) menunjukkan bahwa RNA total dari masing-masing sampel mempunyai intensitas pita yang sama baiknya. Hal ini ditunjukkan adanya dua pita dengan intensitas yang relatif tajam dan kuat. Kedua pita ini masing-masing adalah RNA ribosomal 28S dan 18S. Kedua jenis RNA ribosomal ini sangat distingtif karena kelimpahannya di dalam RNA total adalah terbesar. Dengan demikian apabila kuantitas kedua jenis RNA tersebut baik, maka RNA jenis lainnya di dalam RNA total tersebut juga relatif baik. Kualitas RNA total yang baik sangat menentukan keberhasilan kerja dalam percobaan-percobaan selanjutnya seperti, pemurnian mRNA, sintesis cDNA, RT-PCR, dan microarray.

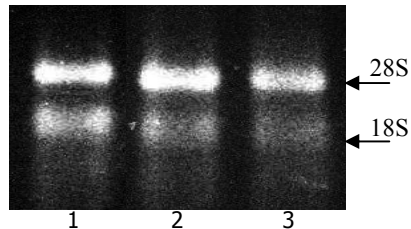
#### Kloning fragmen gen *TcPIN* dengan *pGEM-T-Easy*

Fragmen DNA hasil RT-PCR yang memiliki ukuran sekitar 600 pb (data tidak ditunjukkan), setelah dimurnikan dari gel agarosa kemudian direkombinasikan dengan vektor kloning *pGEM-T Easy*. Setelah seleksi pada media yang sesuai, dan dilanjutkan penapisan untuk mendapatkan rekombinan yang membawa gen *TcPIN* (*true recombinant*), kemudian dilakukan PCR koloni terhadap beberapa koloni bakteri yang tumbuh pada media seleksi yang mengandung antibiotika ampisilin. Seleksi transforman melalui warna koloni yang terbentuk tidak selalu sesuai dengan teori yang disebutkan sebelumnya. Artinya bahwa, tidak semua koloni berwarna putih pasti membawa fragmen gen sisipan dan sebaliknya belum tentu semua koloni berwarna biru merupakan koloni negatif (tidak membawa fragmen). Hal tersebut dapat disebabkan oleh karakteristik dari fragmen gen hasil PCR yang diklon ke dalam *pGEM-T Easy*. Sebagai contoh, koloni biru dapat dihasilkan dari produk PCR yang diklon pada *frame* yang sama dengan

Tabel 1. Data spektrofotometri RNA total kakao.

Table 1. Spectrophotometric data of cacao total RNA.

Sampel <i>Sample</i>	$A_{260/280}$	RNA ng/ $\mu$ L
Buah 9cm <i>Fruit 9 cm</i>	1,647	168
Buah 12cm <i>Fruit 12 cm</i>	2,095	264
Biji ( <i>seed</i> )	2,050	2940

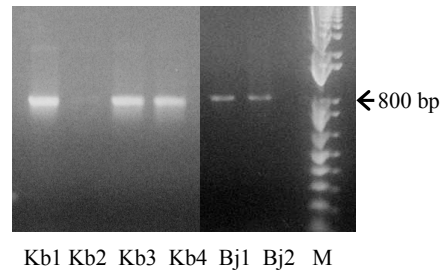


Gambar 1. Profil elektroforesis RNA total kakao. Lajur 1-3 berturut-turut dari buah 9 cm, 12 cm dan biji.

Figure 1. Electrophoresis profile of cacao total RNA. Lane 1-3 are from fruits of 9, 12 cm and seed, respectively.

gen *LacZ*. Produk PCR tersebut biasanya memiliki tiga basa sama yang berulang pada beberapa bagian fragmen, termasuk memiliki basa adenin yang berulang pada bagian ujungnya (Promega, 1999). Produk PCR yang demikian tidak memiliki kodon stop pada bagian fragmennya, sehingga akan ditranslasi bersamaan dengan gen *LacZ* dan menghasilkan koloni berwarna biru.

Pada PCR koloni terlihat bahwa koloni Kb1, Kb2, Kb3, Kb4, Bj1 dan Bj2 merupakan koloni positif (Gambar 2). Koloni-koloni setiap klon kulit buah kakao yang paling terang pitanya selanjutnya dikulturkan dalam medium NB cair yang mengandung ampicilin 100 ppm. Setelah dikulturkan semalam pada suhu 37°C, dilakukan isolasi plasmid dari setiap kultur yang diperoleh menggunakan *high pure plasmid isolation kit* (Roche). Hasil isolasi plasmid dicek pada gel agarosa 1%. Koloni positif atau koloni yang membawa fragmen gen *TcPIN* ditunjukkan dengan terbentuknya pita berukuran 800 bp. Apabila dicermati lebih lanjut, ukuran fragmen gen *TcPIN* yang sebenarnya adalah 600 bp dan terjadi penambahan



Gambar 2. Hasil PCR koloni *TcPIN* asal kulit buah (Kb) dan biji (Bj) kakao. M marker DNA 1kb plus ladder.

Figure 2. Results of colony PCR of cocoa pod wall (Kb) and seed (Bj) *TcPIN*. M is 1 kb ladder DNA marker.

ukuran sekitar 200 bp, hal ini karena PCR koloni dilakukan dengan menggunakan primer universal yang komplemen dengan daerah pada vektor pGEM-T yang mengapit situs kloning majemuk (MCS).

Plasmid dari koloni setiap klon kulit buah kakao dan biji selanjutnya ditentukan urutan basanya menggunakan primer universal M13F dan M13R berturut-turut (GTAAACGACGACGGCCAGT dan GGAAACAGCTATGACCATG). Setelah dilakukan sekuensing, untuk memastikan bahwa gen yang diisolasi adalah gen *PIN* maka dilakukan analisis BLASTX. Di dalam program bioinformatika online, input sekuen DNA ditranslasikan oleh program tersebut kemudian hasil translasi dibandingkan dengan sekuen protein yang ada di Bank Gen (*Genebank Data Base*).

#### Identifikasi dengan BlastX

Hasil analisis menggunakan program BLASTX ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Tabel 2), memperlihatkan penjajaran dasar dengan sekuen protein dari gen yang ada di Bank Gen, serta menunjukkan

bahwa gen yang telah diisolasi dan diklon dari kulit buah kakao menyandi protein yang memiliki tingkat kesamaan struktur primer (sekuen) dengan protein *Putative 21 kDa trypsin inhibitor Theobroma bicolor*. Hasil analisis terhadap protein ini memberikan Skor 256 bits dengan Nilai E sama dengan  $6 e^{-67}$ . Sedangkan analisis dengan protein *Putative 21 kDa trypsin inhibitor Theobroma microcarpum* dan *Putative 21 kDa trypsin inhibitor Theobroma cacao* dengan skor dan nilai yang sedikit lebih rendah. Hasil ini membuktikan bahwa, fragmen DNA yang telah diisolasi dari kulit buah kakao dan diklon dengan vektor pGEM-T menyandikan Inhibitor Proteiase dari kakao (*Theobroma cacao*) sehingga dapat dituliskan dengan *TcPIN*. Secara teoritis kisaran skor  $\geq 150$  bits dengan *E-value*  $\geq e^{-04}$  pada analisis Blast menunjukkan tingkat kemiripan yang tinggi (Claveri *et al.*, 2003).

#### Homologi inhibitor tripsin biji kakao

Proteinase Inhibitor (PIN) berukuran 21 kDa kakao pertama kali dilaporkan oleh Tai *et al.* (1991), berfungsi sebagai protein penyimpanan pada biji kakao. Untuk mengetahui karakteristik dalam hal tingkat homologinya dengan PIN biji

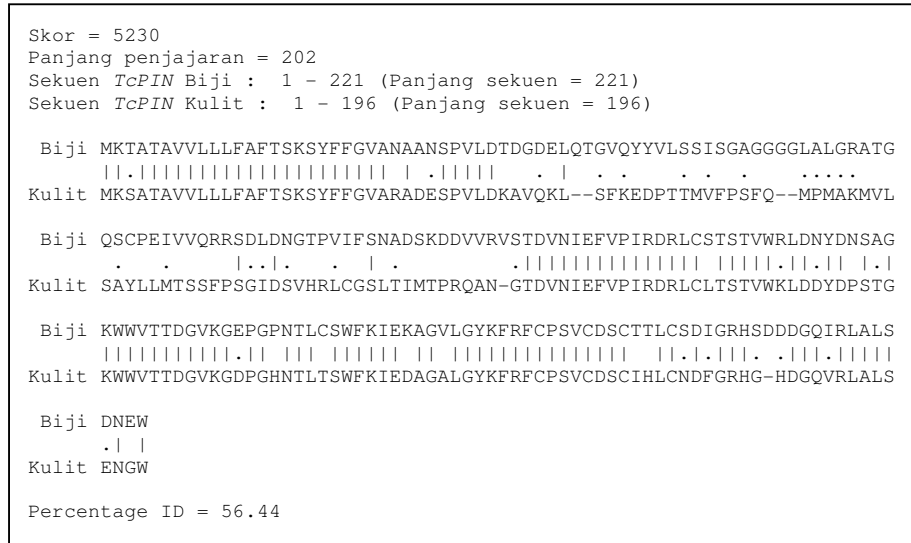
kakao tersebut, maka dilakukan analisis penjajaran dua sekuen ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Gambar 3). Data ini menunjukkan bahwa PIN dari kulit buah kakao memiliki tingkat homologi (*identity* = ID) cukup tinggi > 56% dengan PIN dari biji kakao. Namun demikian, perbedaannya juga signifikan yaitu, sekitar 43,56% sehingga sangat logis untuk memprediksi bahwa kedua protein yang berasal dari jaringan yang berbeda dari tanaman kakao memiliki fungsi yang tidak sepenuhnya sama. Hal tersebut karena secara fisiologis, metabolisme biji berfungsi sebagai jaringan penyimpanan (*sink tissue*), maka sangatlah logis bahwa metabolit yang dikandung dalam biji sebagai cadangan makanan, *food reserve* atau metabolit tersimpan. Menurut Tai *et al.* (1991) bahwa PIN yang ditemukan dalam jumlah yang besar di biji merupakan protein tersimpan.

Secara fisiologis kulit buah kakao berfungsi sebagai tempat perlindungan biji kakao dari kerusakan fisik dan biologis. Selain struktur fisik, menurut Chaidamsari *et al.*, 2007, diduga sistem perlindungan buah kakao dari gangguan luar terutama oleh hama seperti PBK dan penyakit. Bahwa ada perbedaan antara struktur primer antara PIN dari kulit buah kakao dengan PIN biji kakao diduga karena

Tabel 2. Hasil analisis BLASTX dari gen yang diisolasi dari kulit buah kakao.

Table 2. Result of BlastX analysis of the gene isolated from cacao pod wall.

Protein yang bersesuaian	Score (Bits)	E Value
Putative 21 kDa trypsin inhibitor [ <i>Theobroma bicolor</i> ]	256	$6e^{-67}$
Putative 21 kDa trypsin inhibitor [ <i>Theobroma microcarpum</i> ]	246	$5e^{-64}$
Albumin	246	$5e^{-64}$
Trypsin inhibitor [ <i>Theobroma sylvestre</i> ]	231	$1e^{-59}$



Gambar 3. Analisis penajajaran dua sekuen dari protein PIN asal kulit buah dan biji kakao.  
Figure 3. Pairwise output of two sequence alligment of PIN from cacao seed and pod wall .

terkait dengan adanya sedikit perbedaan pada fungsinya, yaitu PIN biji kakao lebih berfungsi sebagai protein tersimpan sedangkan PIN dari kulit buah kakao berfungsi juga di dalam sistem pertahanan dari buah kakao. Untuk membuktikan dugaan ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara terpisah.

### Kesimpulan

1. Dengan teknik RT-PCR menggunakan primer spesifik telah berhasil diklon *TcPIN* dengan ORF lengkap dari kulit buah kakao.
2. *TcPIN* kulit buah kakao menyandi protein ini memiliki tingkat homologi cukup tinggi dengan yang berasal dari biji kakao.
3. PIN diduga memiliki fungsi pertahanan

buah kakao terhadap serangan PBK namun hal ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara terpisah.

### Ucapan Terimakasih

Penelitian ini dibiayai oleh Departemen Pertanian melalui program KKP3T (Kerja Sama Kemitraan Penelitian Pertanian dengan Perguruan Tinggi) tahun 2007-2008.

### Daftar Pustaka

- Altschul, S.F., L.M. Thomas, A.S. Alejandro, Z. Jinghui, Z. Zheng, M. Webb & J.L. David (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nuc. Acids Res.*, 25, 3389-3402.



*Kloning dan karakterisasi gen penyandi inhibitor.....*

- Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian (2006). Sarungisasi kakao di Kabupaten Donggala berhasil tingkatkan produktivitas kakao. Jakarta, Litbang Pertanian.
- Chaidamsari, T. (2005). Biotechnology for cocoa pod borer resistance in cocoa. *Disertasi*. Netherland, Wageningen University
- Chaidamsari, T., A. Soesilo, Juliarni, R.A. de Maagd & D. Santoso (2007). Cellular characterization of cocoa fruit development in relation to pod bore resistance. *In: International Conference on Molecular Biology of Life Sciences*, Malang, 19-21 November 2007.
- Claveri, J.M. & C. Notredame (2003). *Bioinformatics for Dummies*. Ed ke-2. New York, John Wiley Publ.
- Indonesia, Departemen Perindustrian (2007). *Gambaran Sekilas Industri Kakao*. [http://www.depperin.go.id/gambaran\\_sekilas\\_industri\\_kakao.pdf](http://www.depperin.go.id/gambaran_sekilas_industri_kakao.pdf) [02/02/2009].
- Depparaba, F. (2002). Penggerek buah kakao (*Conopomorpha cramerella* Snellen) dan penanggulangannya. *J. Litbang Pertanian*, 21 (2), 69-74.
- Husaini, A. (2009). Pengusaha Kakao Minta PPN Tetap 0%. *Harian Kontan tanggal 10 Januari 2009* <http://www.kontan.co.id/> Pengusaha
- Jaya, A.M.S., H. Aswidinnoor & D. Santoso. (2004). Deteksi dan analisis sekuen gen inhibitor proteinase pada beberapa klon kakao harapan tahan penggerek buah kakao dari Sulawesi Selatan. *Menara Perkebunan*, 72(1), 1-10.
- Lawrence, P.K. & K.R. Koundal (2002). Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *J. Biotech.*, 5, 93-109.
- Promega (1999). *pGEM<sup>®</sup>-T and pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems (Technical Manual No.042)*. Wisconsin, Promega Corporation.
- Reece, R.J. (2004). *Analyses of Genes and Genomes*. England, John Willey & Sons Ltd.
- Rozen, S. & H. Skaletsky (1999). Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. *Method In Mol Biol.*, 132, 365-385.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Santoso, D. (2001). Pengembangan pelacak DNA spesifik gen melalui bioinformatika: Identifikasi gen penyandi protein biji 21 kDa pada kakao UAH Indonesia *Menara Perkebunan*, 69 (1), 10-17.
- Santoso, D. (2006). Molecular And Genetic Engineering Studies Toward Improvement Of Cacao Bean Production. Bogor, Indonesian Biotechnology Research Institute for Estate Crops. 133p
- Sulistiyowati, E., Y.D. Junianto, S. Sukamto, S. Wiryadiputra, L. Winato & N. Primawati (2003). Analisis status penelitian dan pengembangan PHT pada pertanaman kakao. *Dalam Simposium Nasional Penelitian PHT Perkebunan Rakyat*. Bogor, 17-18 September 2003.
- Terra, W. R., C. Ferreira, B. P. Jordao & R. J. Dillon (1996). Digestive enzymes. *In: M. J. Lehane & P. F. Billingsley Biology of the Insect Midgut*. London, Chapman & Hall London. 153-186.
- Tai, H., L. McHenry, P. J. Fritz & D.B. Furtak. (1991). Nucleid acid sequence of a 21 kDa cocoa seed protein with homology to the soybean trypsin inhibitor (Kumitz) family of protease inhibitors. *Plant Mol. Biol.*, 16, 913-915.

Isda et al.

Walker, A. J., L. Ford, M.E.N. Majerus, I.E. Geoghegan, A.N.E. Birch, J.A. Gatehouse & A.M.R. Gatehouse. (1998). Characterisation of the midgut digestive proteinase activity of the two-spot ladybird (*Adalia bipunctata* L.) and its sensitivity to proteinase inhibitors. *Insect Biochem. & Mol. Biol.*, **28**, 173-180.

Wardojo, S. (1992) Major pests and diseases of cocoa in Indonesia. *In*: P.J. Keane & C. A. J. Putter (eds). *Cocoa Pest and Disease Management in Southeast Asia and Australia* FAO Plant Production and Protection, paper No 112. Rome, FAO. p 63-67.