

Isolasi Gen *Proteinase Inhibitor* dari Tanaman Kakao (*Theobroma cacao*, L.)

Oleh

Mayta Novaliza Isda, Musliar Kasim, Mansyurdin, Tetty Chaidamsari

Penggerek Buah Kakao (PBK) merupakan hama utama perkebunan kakao di Asia Tenggara termasuk Indonesia hingga saat ini belum ditemukan cara efektif untuk penanggulangannya adalah penggerek buah kakao (PBK) sehingga tanaman kakao kehilangan produksi lebih dari 80%. Sifat larva dari PBK ini, menggerek dinding buah sesaat berkembang didalam buah dan menggunakan nutrisi untuk pertumbuhannya sehingga menghambat perkembangan biji kakao. *Proteinase inhibitor (PIN)* adalah gen yang memiliki sifat ketahanan terhadap hama. Dengan menggali potensi gen ketahanan pada kakao seperti proteinase inhibitor (*PIN*), diharapkan dapat membantu upaya perakitan maupun seleksi klon kakao tahan PBK dalam upaya mendapatkan tanaman kakao toleran hama PBK. Tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi gen *PIN* dari biji kakao dan melihat tingkat ekspresi gen *PIN* terhadap klon kakao yang tahan dan tidak tahan terhadap PBK. Metode yang digunakan adalah isolasi dengan teknik PCR dan ekspresi dari gen *TcPIN* dari kulit buah kakao dengan RT-PCR. Hasil sequencing menunjukkan bahwa fragmen yang diamplifikasi adalah gen *TcPIN*. Dengan menggunakan primer yang sama, dilakukan uji ekspresi dari kulit buah kakao dari klon Ary 2 (klon tahan) dan klon Bal 209 (klon tidak tahan). Dari hasil RT-PCR dapat dikatakan bahwa jaringan kulit buah kakao baik dari klon Ary maupun klon Bal keduanya mengekspresikan gen *TcPIN* namun dari intensitas pita dan konsentrasi yang berbeda-beda dapat dikatakan bahwa tingkat ekspresi dari kedua klon tidak sama. Ditinjau dari ukuran buah, panjang buah 12 cm mempunyai konsentrasi dan intensitas pita yang lebih tinggi dibanding panjang buah 9 cm. Hal ini dapat dikatakan bahwa semakin panjang ukuran buah, ekspresi gen *TcPIN* semakin tinggi. Kesimpulan yang dapat diambil adalah ekspresi gen *TcPIN* pada kulit buah kakao Ary 2 lebih tinggi ekspresi gen *TcPIN* dari klon buah kakao Bal 209.

Kata kunci: PBK, *Proteinase Inhibitor*, Gen *TcPIN*, Ekspresi gen, Klon kakao

1. PENDAHULUAN

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu komoditas perkebunan dan sumber penerimaan devisa negara yang cukup penting. Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu komoditas perkebunan dan sumber penerimaan devisa negara yang cukup penting. Menurut Menteri Pertanian, Anton Apriyantono bahwa kakao sebagai komoditas utama di Indonesia sampai pada tahun 2006, devisa yang dihasilkan mencapai US\$ 7,2 miliar dengan total produksi sekitar 652.356 ton dari total area 992.446 hektar ha.

Berbagai provinsi di Indonesia sedang melakukan ekstensifikasi areal penanaman kakao sebagai usaha peningkatan produksi nasional. Salah satu provinsi yang melakukan ekstensifikasi adalah provinsi Sumatera Barat sebagai sentra produksi kakao di Indonesia bagian barat. Berdasarkan data terakhir dari Dinas Perkebunan Sumatera Barat, hingga akhir Maret 2007, realisasi pembukaan kebun kakao di wilayah Sumatera Barat mencapai luas 34.000 ha. Dinas Perkebunan Sumatera Barat menargetkan pada tahun 2010 luas perkebunan kakao di Sumatera Barat mencapai luas 108.098 ha. untuk 17 kabupaten dan kota. Provinsi Sumatera Barat seperti daerah Padang Pariaman dicanangkan sebagai sentra kakao Indonesia. Pada tahun 2006 di Padang Pariaman telah dilakukan penanaman seluas dua ribu hektar. Sampai tahun 2010 target penanaman di daerah ini sekitar 15 ribu hektar.

Namun usaha peningkatan produksi kakao di Indonesia terkendala oleh adanya serangan penggerek buah kakao (PBK). Penggerek buah kakao (PBK) adalah masalah utama pada tanaman kakao di Asia Tenggara, termasuk Indonesia. Kehilangan produksi dapat mencapai hingga 80%, dan biji kakao yang berasal dari buah yang terserang mutunya menurun atau bahkan tidak laku dijual (Wardojo, 1992).

Hingga saat ini belum ada cara pengendalian yang efektif dan efisien terhadap hama yang penyebarannya sangat cepat tersebut (Santoso *et al.*, 2004). Salah satu pemecahan yang menjadi pusat perhatian saat ini adalah penyediaan bibit tanaman kakao yang tahan terhadap PBK. Untuk mencari alternatif baru pada tanaman kakao hasil transgenik yang dapat diterima masyarakat maka perlu memanfaatkan potensi gen ketahanan yang terdapat pada kakao itu sendiri. Peluang pemanfaatan gen ketahanan tersebut sangat memungkinkan seperti proteinase inhibitor (*PIN*) yang memiliki peranan

penting dalam sistem pertahanan tanaman terhadap predator dan patogen (Lawrence & Koundal, 2002). *PIN* diharapkan dapat membantu upaya perakitan maupun seleksi klon kakao tahan PBK dari beberapa sentra kakao di Indonesia.

Proteinase inhibitor (*PIN*) tanaman diketahui bersifat toksik terhadap predator dan patogen. Jika protein tersebut termakan 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 proteasenya, hama menjadi kekurangan nutrisi sehingga pertumbuhan dan perkembangannya menjadi terhambat. Karena sifat ketahanan hama yang dibawa oleh gen *PIN* adalah monogenik, maka pemanfaatannya untuk perakitan tanaman tahan hama sangat potensial. Peluang keberhasilan ekspresi gen *PIN* pada beberapa tanaman cukup tinggi.

Pada biji kakao telah ditemukan proteinase inhibitor sebagai storage protein (Thai *et al.*, 1991). Santosa (2001) telah melakukan pengembangan prosedur analisis ekspresi gen *PIN* pada tingkat DNA dari tanaman kakao UAH. Selanjutnya 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.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi gen *PIN* dari biji kakao dan melihat tingkat ekspresi gen *PIN* terhadap klon kakao yang tahan dan tidak tahan terhadap PBK.

2. METODOLOGI

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan antara lain, buah kakao tahan dan tidak tahan terhadap PBK, yang berasal dari kulit buah kakao dan biji kakao, pasangan primer F21 (5'ATGAAGACCGCAACAGCCGTA'3) dan R11 (5'ATGCTTCGGTTAACTTG3'), N₂ cair, N-setil-N,N,N-trimetil amonium bromida (CTAB), basa trizma, polivinil polipirrolidon (PVPP), dietil pirokarbonat (DEPC), NaCl, EDTA, LiCl, Na-asetat, etanol 70%, isopropanol, ddH₂O, etanol absolut, kloroform:isoamilalkohol (24:1), fenol:kloroform:isoamilalkohol (25:24:1), *loading buffer*, EtBr, Agarose, kit RT-PCR

Alat yang digunakan antara lain, PCR GeneAmp (*Polymerase Chain Reaction*) system 2400, sentrifus Eppendorf 5417R, sentrifus Beckman allegra 64R, mesin sekuen CEQ™ 8000 genetic Analysis System Beckman Coulter, pipet Gilson, pipet Eppendorf, pendingin Decby -70°C, spektrofotometer UV-VIS Beckman coulter-DU 530, UV T2201 Sigma. Polaroid fuji film FP-3000B, bak elektroforesis gel agarosa, adaptor 100 volt, autoklaf, oven *microwave*, pipet mohr, gelas piala, dan labu erlenmeyer.

Metode Percobaan

Isolasi RNA Biji dan Kulit Buah Kakao

RNA kakao diisolasi dengan metode Chaidamsari *et al* (2005). 1 gram sampel biji kakao digerus dengan bantuan N₂ cair serta PPVP 1,5 % kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifuse yang berisi 15 ml buffer ekstraksi dan 150µl β-merkptoetanol. Suspensi tersebut diinkubasi selama 1 jam pada suhu 65°C dan dikocok perlahan setiap 15 menit. Setelah itu didiamkan pada suhu ruang selama 5 menit, lalu diekstrak dengan Kloroform: Isoamilalkohol (24:1) sebanyak 15 ml kocok kuat-kuat sampai terbentuk emulsi selanjutnya disentrifuse 13.000 rpm selama 30 menit pada suhu 25°C, supernatan diambil dipindahkan ke dalam tabung sentrifuse baru. Kemudian diekstrak kembali dengan fenol:kloroform:isoamilalkohol (25:24:1) dan dua kali dengan Kloroform: Isoamilalkohol (24:1). Kemudian supernatan diambil lalu ditambah LiCl 10 M sampai konsentrasi 2 M dan disimpan dalam suhu 4°C selama semalam.

Setelah RNA diendapkan semalam kemudian disentrifuse 13.000 rpm pada 4°C selama 30 menit. Setelah itu supernatan dibuang dan pellet dilarutkan dalam 500 µl DEPC/MQ (ddH₂O) dan kemudian diekstraksi berturut-turut dengan fenol (pH 8), fenol : kloroform : isoamil alkohol (25:24:1), dan kloroform : isoamil alkohol (24:1) masing-masing dengan kecepatan 12.000 rpm pada 4 °C selama 15 menit. Setelah dipindahkan ke dalam tabung mikro baru bebas RNAase, supernatan dicampur dengan 0,1 volume Nasetat 3 M, pH 5,8 dan 3 volume etanol absolut, kemudian diinkubasi pada -70 °C selama semalam.

Setelah diinkubasi kemudian disentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm pada 4 °C selama 30 menit. Pelet kemudian dicuci dengan 70% etanol DEPC dingin sebanyak 200

µl dan disentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm pada 4 °C selama 2 menit. Setelah itu etanol dibuang dan disentrifus lagi untuk mengeringkan etanol, lalu dikeringkan lagi dengan SpeedVac dan dilarutkan dalam 30 µl MQ. RNA dianalisis kemurnian dan konsentrasinya. Uji kualitatif dilakukan melalui teknik elektroforesis RNA dalam gel agarosa 1%. Uji kuantitatif dilakukan dengan cara mengukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 260 nm.

Berdasarkan sekuen gen *PIN* yang didapat maka primer dirancang dengan melihat cds (*coding segmen*) yang dimiliki dari gen tersebut. Urutan gen yang akan disandikan menjadi protein disebut juga sebagai cds. Urutan basa gen *PIN* yang didapat dari bank data gen mempunyai cds yang diawali dari basa ke-31 sampai ke-696. Sehingga dibuat primer F21 sebagai *forward* dengan urutan basa (5'ATGAAGACCGCAACAGCCGTA'3) yang dimulai dari kodon awal dan primer R11 sebagai *reverse* dengan urutan basa (5'ATGCTTCGGTTAACAACCTTG3') yang berada pada kodon akhir.

Isolasi Gen *Proteinase Inhibitor (PIN)* dan Uji Ekspresi dengan RT-PCR

Isolasi dan uji ekspresi dilakukan dengan teknik RT-PCR menggunakan primer spesifik yang dirancang berdasarkan urutan basa gen *PIN* pada kakao yang telah dipublikasikan (bank data gen www.ncbi.nlm.nih.gov/X56509.1). Primer kemudian digunakan dalam RT-PCR untuk amplifikasi daerah gen *PIN*.

RNA yang didapat dijadikan cDNA terlebih dahulu agar dapat digunakan sebagai template dalam reaksi PCR. Sintesis cDNA dilakukan dengan cara, yaitu RNA yang didapat diambil sebanyak 1µg, kemudian ditambah 1µl dNTPs 10 µM, 1µl oligo-dT, ddH₂O sampai volume akhir 12 µl. Setelah itu diinkubasi 65°C selama 5 menit. Kemudian ditambah *mix* (buffer RT 4µl, 1µl DTT 0,1M, 1µl *RNase inhibitor*) kemudian inkubasi 42°C selama 2 menit, lalu ditambah enzim *reverse transcriptase* (reverd Aid), inkubasi dilanjutkan pada suhu 42°C selama 50 menit dan dilanjutkan dengan 70°C selama 15 menit. Reaksi PCR dilakukan dengan total volum 25µl yang di dalamnya terdapat 1 µl cDNA sebagai template, dNTPs 1 µl, ddH₂O 16,75 µl, bufer 10X 2,5 µl, MgCl₂ 0,25 µl, pasangan primer spesifik gen *PIN*, yaitu F21 (*forward*) dan R11 (*reverse*) masing-masing sebanyak 1 µl dan enzim taq polimerase 2 µl. Program terdiri dari pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 95°C selama 45 detik, *annealing* pada suhu 58°C selama 45 detik

dan *extension* 72°C selama 5 menit. Selanjutnya untuk melihat hasilnya, produk PCR dipisahkan dengan teknik elektroforesis pada gel agarosa 1%.

Sekuensing Fragmen Gen *PIN*

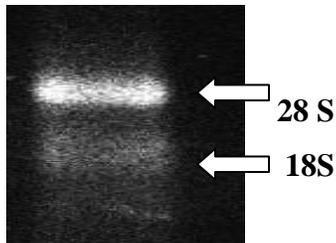
Sebelum dilakukan sekuensing, fragmen hasil RT-PCR dimurnikan terlebih dahulu dengan menggunakan Axyprep DNA gel Extraction kit. Prosedur ekstraksi dan purifikasi pita DNA dari gel sebagai berikut: Pita DNA dipotong dari gel agarose menggunakan skapel yang tajam dan bersih. Potongan gel ditimbang dalam tabung mikro 2 ml, kemudian ditambahkan 3 kali sampel volume buffer DE-A. Panaskan pada suhu 75 °C hingga larut 8-10 menit dan divortex sekitar 2-3 kali. Setelah larut tambahkan buffer DE-B dengan volume 0,5 dari buffer DE-A. Transfer larutan ke kolom dalam tabung 2 ml dan disentrifus pada kecepatan 11.000 rpm selama 2 menit pada suhu ruang 25 °C . Buang filtrat dari tabung 2 ml dan masukan lagi kolom ke tabung. Tambahkan dengan 500 µl buffer W1 dan disentrifus pada kecepatan 11.000 rpm selama 2 menit pada suhu ruang 25 °C. Buang filtrat dari tabung kembalikan kolom ke tabung. Lalu ditambahkan 700 µl buffer W2 dan disentrifus pada kecepatan 11.000 rpm selama 2 menit pada suhu ruang 25°C. Setelah itu dibuang filtrat dari tabung kemudian kembalikan kolom ke tabung dan disentrifus pada kecepatan 11.000 rpm selama 2 menit pada suhu ruang 25°C. Lalu pindahkan ke tabung mikro 1,5 ml dan tambahkan 25µl eluent tepat ditengah membran filter kolom. Diamkan lebih kurang 1 menit dalam suhu ruang. Setelah itu disentrifus pada kecepatan 11.000 rpm selama 2 menit pada suhu ruang 25 °C . Supernatan ini mengandung DNA yang telah dimurnikan Setelah itu fragmen DNA hasil elusi dimasukan ke dalam frezeer. Hasil ekstraksi dan purifikasi DNA kemudian diperiksa dengan gel agarose 1%.

Fragmen gen *PIN* yang telah dimurnikan kemudian disekuen di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman Jakarta. Hasil sekuensing kemudian dianalisis BLASTX (www.ncbi.nih.gov).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Gen *PIN* dari Biji Kakao

RNA diperlukan untuk mengisolasi gen spesifik pada jaringan tertentu. Pada penelitian ini diperlukan RNA total dari biji kakao dengan tujuan untuk mendapatkan gen *PIN* dari jaringan tersebut. RNA total dari biji kakao berhasil diisolasi dengan baik, dilihat dari hasil analisis elektroforesis gel agarosa 1,2% dalam 0,5X larutan penyangga TBE dengan voltase 25 volt selama 1,5 jam. Pada Gambar 1. terlihat bahwa RNA yang dihasilkan mempunyai integritas yang baik. Pita yang terbentuk dalam gel agarose merupakan rRNA yang berukuran 28S dan 18S, sesuai dengan literatur yang menyebutkan bahwa hasil isolasi RNA dikatakan baik apabila dalam elektroforesis gel agarose menghasilkan 2 pita RNA ribosom (rRNA), yaitu 28S dan 18S yang merupakan rRNA sitoplasma utama pada tanaman.



Gambar 1. Hasil elektroforesis RNA total biji kakao

Hasil pengukuran secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 260 dan 280 nm diperoleh absorban masing-masing sebesar 0,490 dan 0,239. Berdasarkan hasil tersebut maka dengan menggunakan 1 gram sampel biji kakao didapatkan konsentrasi RNA total sebesar 2940 ng/ μ l dan nisbah absorban (A) 260/280 sebesar 2,050. dapat dikatakan hasil isolasi RNA total biji kakao mempunyai konsentrasi dan kemurnian yang tinggi, seperti yang dijelaskan Sambrook *et al* (1989) bahwa hasil isolasi RNA dikatakan murni jika mempunyai nilai A260/280 sebesar 1,8-2,0. Tingginya nilai rasio A260/280 menunjukkan bahwa RNA tersebut terbebas dari kontaminan protein. Sehingga RNA yang dihasilkan dapat digunakan untuk percobaan berikutnya.

RNA total biji kakao yang sudah didapatkan selanjutnya digunakan untuk mengisolasi gen *PIN*. Biji kakao digunakan pada penelitian ini karena berdasarkan laporan Thai *et al* (1991) bahwa gen *PIN* ada pada biji kakao, gen ini mengkode protein

yang berukuran 21 kDa dengan homologi yang cocok dengan inhibitor tripsin pada kedelai (kumitz) dari proteinase inhibitor. Protein tersebut diakumulasi selama perkembangan biji dan tidak didegradasi selama perkecambahan benih pada kakao.

cDNA dari Biji Kakao

RNA total biji kakao yang sudah didapatkan selanjutnya digunakan untuk mengisolasi gen *PIN*. Biji kakao digunakan karena berdasarkan laporan Thai *et al* (1991) bahwa gen *PIN* ada pada biji kakao, gen ini mengkode protein yang berukuran 21 kDa dengan homologi yang cocok dengan inhibitor tripsin pada kedelai (kumitz) dari proteinase inhibitor. Protein tersebut diakumulasi selama perkembangan biji dan tidak didegradasi selama perkecambahan benih pada kakao.

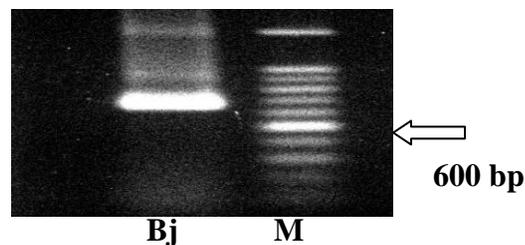
Gen *PIN* diisolasi menggunakan teknik RT-PCR untuk mengisolasi gen-gen yang spesifik dari kromosom eukariot diperlukan cDNA (Watson *et al* 1987). cDNA merupakan DNA yang berkomplemen dengan mRNA (Dale 1994), sedangkan mRNA adalah transkrip dari gen-gen yang terekspresi yang membawa pesan berupa informasi genetik dari DNA ke dalam bentuk protein (Darnell *et al* 1990). Sehingga cDNA berbeda dengan DNA genom karena cDNA mewakili bagian dari suatu gen yang terekspresi (Davis *et al* 1986).

Selanjutnya cDNA digunakan sebagai template untuk mengamplifikasi gen *PIN* dari biji kakao. Reaksi PCR dibutuhkan sepasang primer. Primer yang digunakan pada penelitian ini merupakan primer spesifik yang dibuat untuk mengamplifikasi gen *PIN* pada biji kakao. Primer ini dibuat berdasarkan sekuen gen *PIN* yang didapat dari bank data gen (www.ncbi.nih.gov).

Berdasarkan sekuen gen *PIN* yang didapat maka primer dirancang dengan melihat cds (*coding segmen*) yang dimiliki dari gen tersebut. Urutan gen yang akan disandikan menjadi protein disebut juga sebagai cds. Urutan basa gen *PIN* yang didapat dari bank data gen mempunyai cds yang diawali dari basa ke-31 sampai ke-696. Sehingga dibuat primer F21 sebagai *forward* dengan urutan basa (5'ATGAAGACCGCAACAGCCGTA'3) yang dimulai dari kodon awal dan primer R11 sebagai *reverse* dengan urutan basa (5'ATGCTTCGGTTAACAACCTTG3') yang berada pada kodon akhir. Dengan menggunakan teknik RT-PCR yang dilakukan dengan suhu *annealing* 58°C dan 35 siklus

maka diharapkan dengan pasangan primer tersebut akan didapatkan amplifikasi fragmen gen *PIN* dengan ukuran sebesar 662 bp.

Hasil RT-PCR dielektroforesis dengan gel agarose 1% kemudian diperoleh pita sesuai dengan prediksi, yaitu menghasilkan pita yang berukuran 600 bp (Gambar 2). Hasil ini menunjukkan bahwa fragmen gen *PIN* pada biji kakao dapat diamplifikasi dengan pasangan primer spesifik. Hal ini juga secara tidak langsung menggambarkan adanya ekspresi gen *PIN* pada biji kakao, namun perlu pembuktian lebih lanjut dengan analisis BLASTX.



Gambar 2. Hasil RT-PCR cDNA biji kakao; (Bj) merupakan fragmen gen *PIN* yang berukuran 600 bp dan (M) marker 100bp.

Sekuen Fragmen Gen *PIN* dari Biji Kakao

Urutan basa yang didapatkan dari hasil sekuensing kemudian dianalisis BLASTX. BLASTX merupakan alat pembandingan suatu sekuen yang dicari dengan sekuen yang telah diketahui dengan cepat yang dapat menjelaskan apakah sekuen tersebut memiliki similaritas cukup signifikan. Analisis BLASTX yang dilakukan terhadap urutan basa gen *PIN*.

Tabel 1. Hasil analisis BLASTX urutan basa fragmen gen *PIN*

Gen yang bersesuaian	skor (bit)	<i>e-value</i>
<i>T.cacao</i> mRNA for 21 kDa seed protein homolog to soybean trypsin	377	$2e^{-101}$
<i>T. cacao</i> putative 21 kDa trypsin inhibitor gene, complete cds	340	$3e^{-90}$
<i>T. cacao</i> clone 34-4 trypsin inhibitor gene partial cds	309	$8e^{-81}$
<i>T. bicolor</i> clone 5-2 trypsin inhibitor gene partial cds	248	$2e^{-62}$

Berdasarkan analisis BLASTX dengan melihat parameter skor lebih dari 150 dan *e-value* yang kurang dari 10^{-4} maka tingkat homologi yang dihasilkan cukup baik. Semakin tinggi skor (bits) maka tingkat homologinya semakin baik, semakin rendah *e-*

value maka semakin baik pula tingkat homologinya. Selain nilai skor dan e-value, tingkat homologi juga dapat dilihat dari garis berwarna merah pada grafik hasil BLASTX. Dapat dikatakan hasil isolasi fragmen gen *PIN* dari biji kakao telah berhasil dilakukan dengan baik karena fragmen hasil amplifikasi merupakan gen *PIN* penyandi protein berukuran 21 kDa pada biji kakao.

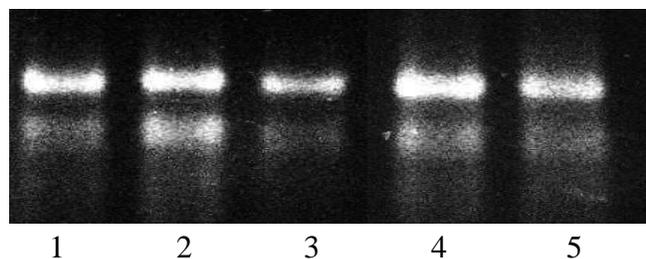
Uji Ekspresi gen *PIN* Kulit Buah Kakao Tahan dan Tidak Tahan PBK

Isolasi RNA dari kulit dilakukan pada kedua klon dengan panjang buah 9 dan 12 cm. Pemilihan panjang buah disesuaikan dengan literatur yang menyatakan bahwa buah kakao dengan panjang 5-7cm dan yang sangat muda tidak pernah terserang PBK (Wardoyo, 1994 dalam Depparaba, 2002), buah kakao mulai terserang PBK pada panjang 9 cm dan PBK lebih menyukai buah kakao yang panjangnya lebih dari 9 cm (Sulistyowati *et al.*, 2003). Oleh karena itu akan dilihat bagaimana ekspresi gen *PIN* pada buah yang panjangnya 9 cm dan 12 cm. Selain itu digunakan biji sebagai kontrol karena telah dipastikan bahwa gen *PIN* terekspresi pada biji kakao. Hasil pengukuran absorbansi RNA jaringan kulit kakao pada kedua klon dapat dilihat di Tabel 2.

Tabel 2 .Data hasil pengukuran absorbansi RNA dengan spektrofotometer UV

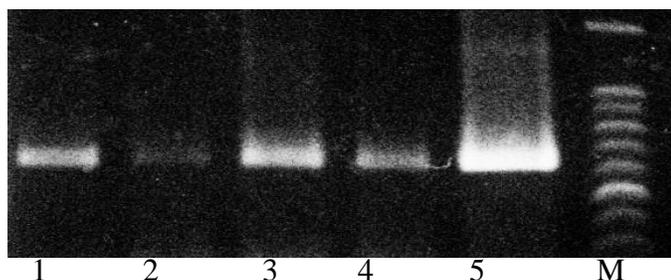
Sampel	$\frac{A_{260}}{280}$	[RNA] (ng/μl)
Ary 9cm	2,019	618
Ary 12cm	1,970	498
Bal 9cm	1,647	168
Bal 12cm	2,095	264
Biji	2,050	2940

Berdasarkan masing-masing RNA yang berhasil diisolasi dapat dikatakan bahwa RNA tersebut mempunyai kemurnian yang tinggi, dilihat dari nisbah A260/280 yang mempunyai nilai 1,647-2,050. Hasil elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 3. Ini menunjukkan bahwa RNA dari masing-masing sampel mempunyai intensitas pita yang sama, tetapi hanya RNA kulit klon Ary 2 dengan panjang buah 12 cm yang mempunyai perbedaan intensitas pita. Terlihat bahwa intensitas pita klon tersebut separuh lebih sedikit, sehingga RNA yang diperlukan untuk mensintesis cDNA dua kali lebih besar dibanding dengan yang lainnya.



Gambar 3. Hasil elektroforesis RNA total dari jaringan kulit kakao; 1,3=klon Ary dengan panjang buah 9 dan 12 cm; 2,4=klon Bal dengan panjang buah 9, 12 cm; 5=biji kakao

Hasil RT-PCR yang dilakukan dengan menggunakan primer spesifik gen *PIN*. Terlihat bahwa jaringan kulit kakao baik dari klon Ary 2 maupun klon Bal 209 keduanya mengekspresikan gen *PIN* (Gambar 4), namun dilihat dari intensitas pita dan konsentrasi yang berbeda-beda dapat dikatakan bahwa tingkat ekspresi dari kedua klon tidak sama. Ditinjau dari ukuran buah, panjang buah 12 cm mempunyai konsentrasi dan intensitas pita yang lebih tinggi dibanding panjang buah 9 cm. Hal ini dapat dikatakan bahwa semakin panjang ukuran buah, ekspresi gen *PIN* semakin tinggi.



Gambar 4. Hasil elektroforesis RT-PCR jaringan kulit kakao 1,3=klon Ary dengan panjang buah 9 dan 12 cm; 2,4=klon Bal dengan panjang buah 9, 12 cm; 5=biji kakao, M= marker 100bp.

4. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Fragmen gen *PIN* dari biji kakao yang berukuran 580 bp telah berhasil diisolasi. Dan dari hasil analisis dengan program BLAST (www.ncbi.nih.gov/BLAST) fragmen tersebut mempunyai homologi yang tinggi dengan protein 21 kDa pada biji kakao.
2. Berdasarkan hasil ekspresi pada kulit buah kakao dengan RT-PCR menunjukkan klon kakao yang tahan terhadap PBK mempunyai ekspresi gen *PIN* lebih kuat dibanding

klon yang tidak tahan terhadap PBK. Diduga gen *PIN* mempunyai pengaruh ketahanan terhadap PBK.

DAFTAR PUSTAKA

- Chaidamsari T. 2005. *Biotechnology for Cacao Pod Borer Resistance in Cacao*. *Plant Research International*. The Netherlands : Wageningen University.
- Dale JW. 1994. *Molecular Genetic of Bacteria*. England: John Wiley and Sons.
- Darnell *et al.* 1990. *Molecular Cell Biology*. New York: Scientific American Books.
- Davis LG *et al.* 1986. *Basic Methods in Molecular Biology*. New York: Elsevier Science Publishing.
- Depparaba F. 2002. Penggerek buah kakao (*Conopomorpha cramerella* Snellen) dan penanggulangannya. *Jurnal Litbang Pertanian*. 21:2.
- Jaya AMS. 2005. Identifikasi dan kloning fragmen gen proteinase inhibitor (*PIN*) pada beberapa tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) harapan tahan penggerek buah kakao (*Conomorpha cramerella* Snellen) di Sulawesi Selatan. [tesis]. Bogor: IPB.
- Lawrence, P.K. & K.R. Koundal . 2002. "Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects". *Journal of Biotechnology* 5: 93-109.
- Santoso D *et al.* 2004. Activity of *Bacillus thuringiensis* toxins against cocoa pod borer larvae. *Pest Manag Sci* 60:735–738 (online: 2004)
- Sambrook *et al.* 1989. *Molecular Cloning: Laboratory Manual*. New York : Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Terra WR, Ferreira C dan Jordao BP. 1996. Digestive enzyme. *Lehane MJ (ed) Billin London, Chapman and Hall*. 153-194.
- Thai *et al.* 1991. Nucleid acid sequence of 21 kDa cocoa seed protein with homology to the soybean trypsin inhibitor (Kumitz) family of protease inhibitor. *Plant Mol. Biol* 16:913-915.
- 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 Biochemistry and Molecular Biology* 28: 173-180.
- Wardojo, S. "(1992) Major pests and diseases of cocoa in Indonesia." In: Keane PJ and Putter CAJ (eds) *Cocoa Pest and Disease Management in Southeast Asia and Australasia* FAO Plant Production and Protection, paper No 112 Rome: FAO, pp 63-67.
- Watson *et al.* 1987. *Molecular Biology of the Gene*. USA: The Benjamin Publishing Company.

