Menara Perkebunan, 2004, 72(1), 1-10

Deteksi dan analisis sekuen gen inhibitor proteinase pada beberapa klon kakao harapan tahan penggerek buah kakao dari Sulawesi Selatan

Detection and sequence analysis of proteinase inhibitor gene in cacao clones putatively cacao pod borer-tolerant from South Sulawesi

Abdul Mollah S. JAYA[1)], Hajrial ASWIDINNOOR[2)] & Djoko SANTOSO[3) *]

[1)] Fakultas Pertanian dan Kehutanan, Universitas Hasanudin, Tamalanrea - Makasar
[2)] Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor
[3)] Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

Summary

Cacao is socially and economically an important commodity to Indonesia, in which the cacao plantations have been challenged with a threatening pest, cacao pod borer (CPB). This research aimed to identify and clone PIN (proteinase inhibitor), a gene carrying resistance of plant to some chewing pests like CPB. The methodology included several experiments. Detection of PIN in cacao was done by PCR using PIN-specific heterologous primers and cacao genomic DNA as templates. Cloning vector pGEM-T was utilized to clone the PCR products. Sequence analysis was conducted with BlastX and Blast Special programs from NCBI. Alignment analysis to determine genetic similarity was performed with ClustalW from EBI. Thirteen out of the 18 clones tested, were detected to have PIN homologs. Two DNA fragments from cacao clones putatively tolerant to CPB, MJ-1 and LW-1, were sequenced. One of them, MJ-1 was cloned. Sequence analyses of the fragments of both cacao clones, indicated that they have PIN homologs and a very closed genetic relation with 96% level of similarity.

[*Key words:* Proteinase inhibitor gene, cacao pod borer, *Theobroma cacao*]

* Penulis untuk korespondensi, Tel.+62-251-324048
E-mail:djsantoso@yahoo.com

Ringkasan

Kakao adalah komoditas yang secara sosial maupun ekonomi penting bagi Indonesia, dimana perkebunan kakao menghadapi masalah serius hama penggerek buah kakao (PBK). Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi dan mengklon *PIN* (inhibitor proteinase), gen yang membawa sifat ketahanan tanaman terhadap hama ulat seperti PBK. Metodologinya terdiri dari beberapa percobaan. Deteksi *PIN* di dalam kakao dikerjakan dengan PCR menggunakan primer heterologous yang spesifik terhadap *PIN* dan DNA genomik kakao sebagai templetnya. Vektor kloning pGEM-T digunakan untuk mengklon produk PCR. Analisis sekuen dilakukan dengan program BlastX dan Blast spesial dari NCBI. Analisis penjajaran (*alignment*) untuk menentukan kemiripan genetik menggunakan program ClustalW dari EBI. Tiga belas dari 18 klon kakao yang diuji, menunjukkan adanya homolog *PIN*. Dua DNA fragmen dari klon harapan tahan, MJ-1 dan LW-1 telah ditentukan sekuen nukleotidanya. Satu diantaranya, MJ-1 berhasil diklon. Analisis sekuen kedua klon tersebut menunjukkan identitas sebagai homolog *PIN* dan keduanya memiliki kemiripan genetik yang tinggi.

Pendahuluan

Perkebunan kakao memiliki peranan ekonomi dan sosial yang penting bagi Indonesia, khususnya propinsi Sulawesi Selatan, namun kelestariannya bisa terancam oleh serangan hama penggerek buah kakao, PBK (Biro Pusat Statistik, 2003; Sikumbang, 2002; Atmawinata, 1993). Sampai saat ini belum ada cara yang efisien untuk mengendalikan hama PBK. Selain mahal dan mencemari lingkungan, pemakaian pestisida kurang efektif karena hama target bersembunyi di dalam buah yang tidak terjangkau oleh penyemprotan. Pemakaian agensia biologis sering kurang konsisten hasilnya. Penerapan pangkas eradikasi kurang disukai oleh para pekebun karena mengurangi pendapatan pekebun kecil. Sementara itu, cara sarungisasi tergolong padat tenaga kerja yang kurang sesuai untuk perkebunan besar. Sulitnya pengendalian hama yang penyebarannya cepat ini, mendorong usaha penemuan tanaman kakao tahan PBK.

Hampir seluruh sentra kakao di Indonesia terserang PBK. Dari daerah-daerah yang terserang berat, ditemukan beberapa pohon kakao yang relatif tidak terserang oleh PBK. Pohon-pohon tidak terserang tersebut dapat dianggap sebagai klon harapan tahan PBK. Pemakaiannya dalam penyediaan bahan tanam tahan masih memerlukan pengujian lebih lanjut untuk memastikan apakah ketahanannya tersebut karena faktor genetik atau sekedar lolos (*escape*) karena faktor lingkungan (Iswanto, 2002).

Ada beberapa cara yang dapat dilakukan untuk menguji kembali ketahanan klon-klon harapan tersebut. Efikasi bibit klonal dari klon-klon harapan tahan terhadap hama tersebut dengan cara penanaman kembali di daerah serangan PBK hingga tanaman perbanyakan berbuah. Setelah itu dilakukan evaluasi tingkat serangan PBK terhadap buah kakao. Cara ini dapat memberikan indikasi langsung mengenai ketahanan tanaman terhadap hara tersebut. Namun demikian, hal ini memerlukan waktu yang relatif lama karena memerlukan proses perbanyakan tanaman dan waktu hingga tanaman dapat berbuah. Selain itu juga memerlukan lahan yang luas. Cara yang lebih efisien dapat ditempuh dengan menggunakan penanda molekuler. Penanda yang demikian dapat dikembang-kan atas dasar sekuen gen yang menentukan gen ketahanan hama semacam ini, seperti gen inhibitor proteinase, *PIN* (Park & Thornburg, 1996).

PIN diketahui memiliki peranan yang penting dalam sistem pertahanan tanaman terhadap predator dan patogen (Lawrence & Koundal, 2002). Apabila termakan oleh hama target, protein *Pin* akan berinteraksi dengan protease yang ada di dalam usus hama tersebut, terikat dan terkunci pada situs aktif (*active site*) protease (Terra *et al.*, 1996; Walker *et al.,*1998). Dengan demikian karena asam amino yang mudah diserap tidak dapat dihasilkan oleh proteasenya, hama menjadi kekurangan nutrisi tersebut sehingga pertumbuhan dan perkembangan menjadi terhambat. Karena sifat ketahanan hama yang dibawa oleh gen *PIN* adalah monogenik, pemanfaatannya untuk perakitan tanaman tahan hama sangat potensial. Ekspresi gen *PIN* dari *Arabidopsis* dalam tanaman poplar memberikan ketahanan terhadap hama *Chrysomela populi* L. (Delledonne *et al.*, 2001) klon kakao harapan tahan PBK. Deteksi Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi dan menganalisis *PIN* pada klon dilakukan dengan PCR menggunakan primer spesifik *PIN*. Analisis diarahkan untuk memperkirakan kemiripan dan kekerabatan klon-klon kakao atas dasar sekuen asam amino.

Bahan dan Metode

Klon-klon kakao harapan tahan dikoleksi dari beberapa daerah serangan PBK di Sulawesi Selatan. Dengan demikian diasumsikan memberikan harapan sebagai bahan tanam kakao tahan PBK. Klon-klon tersebut diantaranya adalah MJ-1 (dari kabupaten Majene), LW-1 (dari kabupaten Luwu), SP-1 (dari Soppeng), dan beberapa kabupaten lainnya di Sulawesi Selatan.

Isolasi DNA genomik

DNA genomik diisolasi dari jaringan biji ataupun daun kakao mengikuti metode yang dimodifikasi dari Khanuja *et al.* (1999) melalui preparasi inti sel yang dilakukan sesuai dengan Orozco-Castillo *et al*. (1994). DNA hasil isolasi yang memiliki kualitas baik digunakan untuk keperluan selanjutnya. Parameter untuk menentukan kualitas ini adalah kemurnian dan integritas. Kemurnian ditentukan dari pengujian spektrofotometri. Rasio serapan pada λ 260/230 lebih besar satu (Lewinsohn *et al.*, 1994) dan 260/280 lebih besar 1,6 dianggap murni Sambrook *et al*. (1989). Integritas DNA genomik ditetapkan dengan elektroforesis gel agarosa 1%.

PCR spesifik

Analisis PCR dilakukan dengan prosedur standar sebagaimana diuraikan sebelumnya (Santoso & de Maagd, 2003). Reaksi PCR dilakukan dengan primer heterologous spesifik gen *PIN* yang sebelumnya diuji untuk mendeteksi protein biji kakao 21 kDa (Santoso, 2001). Dalam volume reaksi PCR 25 µL mengandung 25 ng DNA genomik, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP) masing-masing 0,1 µM, pasangan primer *pin*CFR1 dan *pin*CFR2 masing-masing 1 pmol, dan enzim *Taq DNA polymerase* satu unit serta bufer PCR 1X. Program PCR terdiri dari Pre-denaturasi pada suhu 95˚C selama 5 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 95˚C 30 detik, penempelan primer pada suhu 50˚C selama 30 detik, dan pemanjangan 72˚C selama satu menit. Pada tahap terakhir proses PCR dilakukan pemanjangan akhir pada suhu 72˚C selama 5 menit. Selanjutnya sebanyak 10 µL produk PCR difraksionasi dengan teknik elektroforesis pada gel agarosa 1 – 1,4%.

Kloning fragmen DNA produk PCR

Kloning DNA fragmen produk PCR spesifik dilakukan menggunakan pGEM-T dan sel inang *E. coli* kompeten galur DH5α. Fragmen DNA murni sebanyak 1 µL diligasikan dengan vektor pGEM-T menggunakan enzim T4 DNA ligase pada suhu 4˚C selama satu malam. Sebanyak 5µL plasmid hasil ligasi ditambahkan ke dalam 50 µL sel *E. coli* kompeten. Suspensi dihomogenkan dan disimpan di dalam es selama 30 menit. Kontrol negatif disiapkan menggunakan sel kompeten tanpa plasmid. Kedua tabung *Eppendorf* diberi kejutan panas pada suhu 42˚C selama 90 detik dan segera didinginkan di dalam es selama 5 menit. Ke dalam *Eppendorf* ditambah 950 µL medium SOC, LB dengan glukosa

20 mM, kemudian diinkubasi pada 37˚C sambil digoyang secara perlahan selama 45– 60 menit. Sebanyak 100 µL suspensi sel transforman ditransfer ke dalam media LA (LB + 1% agar) yang mengandung X-Gal, IPTG dan ampisilin (Sambrook *et al.*, 1989) kemudian diinkubasi pada 37˚C selama semalam. Sel *E. coli* yang membawa plasmid rekombinan akan tumbuh membentuk koloni berwarna putih sedangkan yang tidak mengandung plasmid rekombinan akan berwarna biru. Koloni putih selanjutnya dikonfirmasi dengan PCR menggunakan primer universal M13 *foward* dan *reverse*. Hasil PCR koloni dielektroforesis pada 0,8 - 1% gel agarosa di dalam bufer 0,5 X TBE.

Sekuensing dan analisis homologi

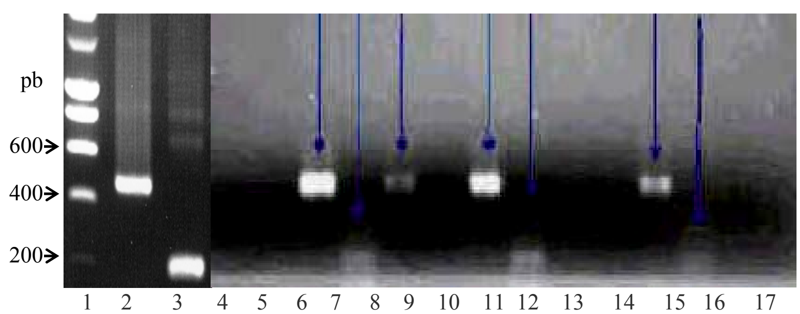
Sekuensing fragmen DNA genomik hasil amplifikasi PCR ataupun DNA terklon dilakukan di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta menggunakan prinsip *chain terminator* ddNTPs secara otomatis dengan mesin ABI Prism Sequencer.

Analisis homologi dari sekuen DNA spesifik yang diperoleh dilakukan dengan pendekatan teknik bioinformatika melalui program Blast yang dapat diakses pada situs NCBI:hhtp://www.ncbi.nlm.nih. ov/BLAST/ (Altschul *et al.*, 1997). Analisis kemiripan dilakukan dengan program ClustalW dari situs EBI: hhtp://www.ebi. ac.uk/egi-bin/ CLUSTALW/ (Higgins *et al.,* 1994).

Hasil dan Pembahasan

Deteksi gen TcPIN *dengan PCR*

Pemakaian dua pasangan primer *nested* dalam deteksi ini adalah untuk memastikan spesifisitas dari amplifikasi DNA dengan PCR. Pasangan primer *pin-F*, *pin-R1* dan *pin-R2* yang digunakan secara teoritis akan menghasilkan pita DNA dengan ukuran sekitar 160 bp untuk pasangan *pin*-FR1 dan 470bp untuk pasangan *pin*-FR2. Elektroforesis dari hasil PCR beberapa klon kakao ditampilkan pada Gambar 1.



Gambar 1. PCR DNA genomik kakao. Lini 1, 2-17 adalah *Smart ladder*, and MJ1-tahan, MJ1-tahan, LW4-peka, LW4-peka, LW1-tahan, LW1-tahan, PN3-peka, PN3-peka, PN6-tahan, PN6-tahan, MM2-peka, MM2-peka, MM1-tahan, MM1-tahan, MJ2-peka dan MJ2-peka, masing-masing dengan pasangan primer *pin*-FR2 dan *pin*-FR1.

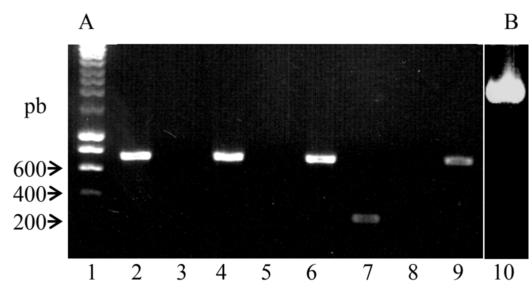
Figure 1. PCR of cacao genomic DNA. Lanes 1, 2-17 are Smart ladder, *resistant-MJ1, -MJ1, susceptible-LW4, -LW4, resistant-LW1, LW1, susceptible -PN3, -PN3, resistant-PN6, -PN6, susceptible -MM2, -MM2, resistant-MM1, -MM1, susceptible -MJ2, MJ2 with primer pairs of pin-FR2 and pin-FR1 respectively.*

Amplifikasi DNA genomik kakao menggunakan PCR dengan primer spesifik *PIN* menghasilkan pita-pita DNA yang intensitasnya bervariasi. Secara umum PCR DNA namun intensitasnya relatif sangat lemah. Dari 18 sampel DNA tanaman kakao yang diuji, diperoleh 13 sampel teramplifikasi baik oleh kedua pasang primer *pin*-FR1 maupun *pin*-FR2 dengan amplikon yang intensitasnya relatif kuat (sebagian ditunjukkan pada Gambar 1). Bervariasinya intensitas pita DNA ini mungkin karena tingkat kemurnian DNA yang tidak sama, jumlah *copy* gen, atau afinitas primer dengan templet berbeda-beda. Untuk memastikan lebih lanjut mana yang benar perlu dilakukan pengujian. Hasil ini mengindikasikan bahwa gen target penyandi protein 21kDa yang diekspresikan pada biji kakao dapat dijadikan dasar dalam perancangan primer heterologous spesifik *PIN* (Santoso, 2001). Selain itu primer tersebut dapat digunakan untuk mendeteksi *PIN* kakao harapan tahan asal Sulawesi Selatan yang diuji.

klon-klon harapan tahan PBK, memberikan pita DNA yang relatif kuat sedangkan PCR klon-klon kontrol yang peka tidak memberikan pita DNA atau menghasilkan pita

Kloning fragmen DNA kakao

Beberapa tanaman kakao sampel menghasilkan amplikon dari analisis PCR dengan menggunakan primer heterologous spesifik *PIN*. Fragmen DNA dari amplikon MJ-1, harapan tahan diklon ke vektor pGEM-T menggunakan *E. coli* kompeten sebagai sel inang. Fragmen DNA yang akan diklon dimurnikan dengan kit ekstraksi gel QIAEX II dari QIAGEN dan diperiksa dengan elektroforesis pada gel agarosa. Plasmid rekombinan yang dihasilkan dari koloni putih diperiksa keberadannya dengan PCR menggunakan pasangan primer universal M13 *forward* dan *reverse*. Elektroforesis pada gel agarosa hasil PCR tersebut terlihat seperti pada Gambar 2A, menunjukkan bahwa sebagian besar meng-



Gambar 2. Profil elektroforesis dari klon terseleksi. Lini 1, 2-9 (A), dan 10 (B) adalah *Smart Ladder*, hasil PCR dengan primer universal FR M13 dari koloni putih yang tumbuh pada media seleksi, dan plasmid rekombinan hasil miniprep.

Figure 2. Electrophoretic profile of selected clones. Lanes 1, 2-9(A), and 10 (B) are Smart ladder, PCR with M13 FR universal primer of the white colonies grown on selection media, and the recombinant plasmid.

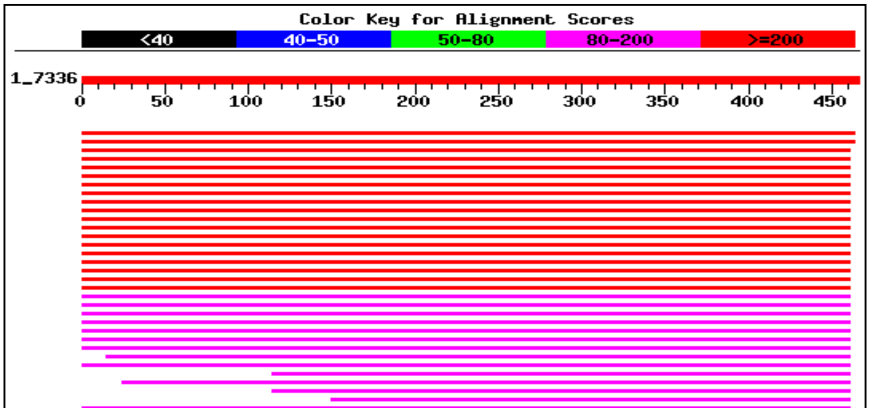
hasilkan amplikon sesuai dengan yang diperkirakan. Dari hasil PCR koloni putih diperoleh plasmid rekombinan dari klon positif yang mengandung fragmen gen *TcPIN* seperti terlihat pada Gambar 2B. Fragmen DNA yang terklon selanjutnya disekuensing untuk dianalisis.

Analisis sekuen fragmen DNA

Sekuensing DNA terklon dari klon harapan tahan PBK MJ-1 menghasilkan sekuen nukleotida 465 pasangan basa. Sedangkan sekuensing langsung dengan produk PCR klon harapan tahan LW-1 menghasilkan sekuen nukletida 60 pb lebih pendek, atau 405 pb. Sekuen LW-1 lebih pendek dari sekuen MJ-1, karena sekuensing dilakukan langsung dari DNA produk PCR dimana primer sekuensing sama dengan primer amplifikasi. Dengan demikian ada kekurangan sekitar 60 bp yang tidak dapat terbaca termasuk sekuen primer tersebut. Untuk menentukan identitas sekuen dari klon MJ-1, dilakukan analisis BlastX. Hasil analisis ini ditunjukkan pada Gambar 3. Data tersebut membuktikan bahwa sekuen dari klon MJ-1 mencerminkan hasil yang cenderung menyerupai sekuen asam amino atau protein dari gen target yaitu protein biji kakao 21kDa yang menjadi dasar dalam perancangan primer spesifik yang digunakan (Tai *et al.,* 1991, Santoso 2001). Hasil yang sangat mirip juga diperoleh ketika sekuen entri dari klon LW-1 (data tidak ditunjukkan). Hasil analisis menunjukkan distribusi perbandingan sekuen nukleotida tanaman kakao LW-1 dan MJ-1 dengan beberapa *Theobroma* termasuk spesies kakao dan tanaman lain yang memiliki gen *PIN* yang ada di *data base*. Hal ini menunjukkan bahwa sekuen nukleotida LW-1 dan MJ-1 adalah mirip dengan *PIN* dari berbagai jenis tanaman.

Gambar 3 menunjukkan bahwa sekuen asam amino klon kakao MJ-1 dengan *Theobroma* yang lain dan spesies tanaman lainnya yang ada pada *data base* memiliki distribusi perbandingan sangat tinggi. Hasil BlastX memperlihatkan kecenderungan tingkat homologi yang relatif tinggi yang berkisar pada daerah sekuen $\geq$ 200 bp. Secara teoritis kisaran skor $\geq$ 50 bits dengan *E-value* $\geq$ e-04 pada analisis blast menunjuk-kan tingkat kemiripan yang tinggi (Claveri *et al.,* 2003; Santoso 2001).

Selanjutnya untuk mengetahui tingkat kekerabatan antara klon kakao uji (MJ-1 dan LW-1) dengan kakao lain dan spesies tanaman lain yang ada pada *data base*, dilakukan analisis ClustalW dalam bentuk dendogram. Analisis kekerabatan (filo-genetik) untuk asam nukleat dan protein blast tentang tingkat kemiripan dari MJ-1, LW-1 yang sama-sama tahan sebagai tanaman uji dan beberapa spesies kakao lain dan spesies tanaman lain yang ada pada data base relatif tinggi. Hal ini memperlihatkan bahwa tingkat kemiripan gen antar spesies yang dianalisis menggambarkan tingkat kekerabatan, ada yang sangat dekat, agak dekat, dan ada pula yang jauh tidak berdekatan kekerabatan. Klon MJ-1 dan LW-1 masih dalam satu kekerabatan yang sangat dekat dibandingkan dengan spesies dari di base. Data ini memberikan suatu asumsi bahwa gen *TcPIN* yang ada pada MJ-1 masih kerabat dengan *TcPIN* pada LW-1, demikian pula dengan *PIN* dari data base yang lebih dekat dibandingkan dengan spesies-spesies tanaman lain *CpPIN*, *AtPIN*, *IbPIN*, *StPIN*, *CrPIN* dan *GmPIN* Selanjutnya untuk melihat kemiripan antara sekuen *TcPIN* dari klon harapan tahan PBK



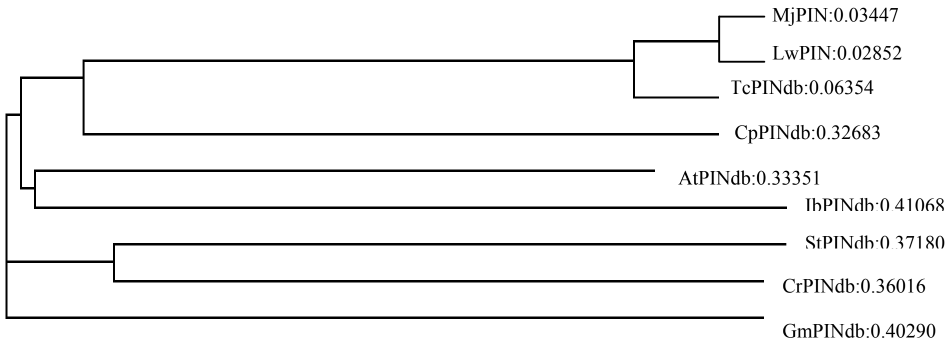
Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E value
gi|21909|emb|CAA39860.1| 21 kDa seed protein [Theobroma cacao	268	3e-71
gi|19171719|gb|AAL85654.1| trypsin inhibitor [Theobroma cacao]	266	1e-70
gi|2654440|gb|AAC63057.1| Lemir [Lycopersicon esculentum]..	106	2e-22
gi|37625527|gb|AAQ96377.1| miraculin-like protein [Solanum .	102	2e-21
gi|12083240|gb|AAG48779.1| putative lemir (miraculin) prote.	96	3e-19
gi|5689166|dbj|BAA82842.1| miraculin homologue [Taraxacum o	95	5e-19
gi|5689164|dbj|BAA82841.1| miraculin homologue [Youngia jap.	93	3e-18
gi|688430|dbj|BAA05474.1| tumor-related protein [Nicotiana .	86	2e-16
gi|23198316|gb|AAN15685.1| putative trypsin inhibitor [Arab.	78	6e-14
gi|7438251|pir|S74136 latex proteinase inhibitor - papaya	75	5e-13
gi|1708872|sp|P80691|LSPI_CARPA Latex serine proteinase inh.	72	5e-12
gi|11596180|gb|AAG38518.1| miraculin-like protein 2 [Citrus.	71	8e-12
gi|6538776|gb|AAF15901.1| putative proteinase inhibitor [Ni.	66	3e-10

Gambar 3. Hasil BlastX dengan entri sekuen fragmen DNA dari klon harapan MJ-1.

Figure 3. The result of BlastX with entry of the DNA sequence of MJ-1 cacao clone.

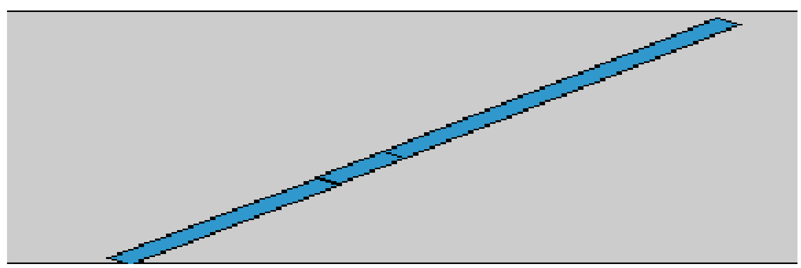
LW-1 dan MJ-1 dilakukan analisis Blast Spesial terhadap sekuen *TcPIN* dari kedua klon tersebut. Hasil analisis menunjukkan bahwa gen *PIN* yang terkandung pada kedua klon tersebut memiliki tingkat kemiripan sangat tinggi yakni mencapai sekitar 96%. Dengan *Score bits* 671, *E value* mencapai sempurna 0,0.

Pada Gambar 5 terlihat bahwa sekuen nukleotida dari gen *TcPIN* LW-1 dengan *TcPIN* MJ-1 yang masing-masing merupakan klon harapan tahan PBK teridentifikasi mengandung gen penyandi proteinase inhibitor yang memiliki tingkat kemiripan yang sangat tinggi. Hasil analisis di tingkat DNA ini dan sebelumnya mengindikasikan bahwa proteinase inhibitor terkait dengan ketahanan kakao terhadap PBK.



Gambar 4. Analisis homologi dengan ClustalW dari sekuen *PIN* beberapa spesies dan kakao klon harapan tahan PBK MJ1 (MjPIN) dan LW1 (LwPIN). Tc dari kakao tidak diketahui sifat tahan PBK.

Figure 4. Alignment analysis with ClustalW of the PIN *sequences of several plant species and CPB-tolerant cacao clones MJ1 and LW1. Tc is cacao with unknown CPB resistance.*



Score = 671 bits (349), Expect = 0.0, Identities = 374/386 (96%), Gaps = 2/386 (0%), Strand = Plus/Plus

```
Query: 87 gggttcaatattacgtcttgtcatcgatatcgggtgctggggtggagggctagccctag 146
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:  5 gggttcaatattacgtcttgtcatcgatatcgggtgctggggtggagggctagccctag 64
Query: 147gaagggctacangtcaaagctgcccagaaattgttgtccaaagacgatccgaccttgaca 206
          ||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:  65gaagggctacaggtcaaagctgcccagaaattgttgtccaaagacgatccgaccttgaca 124
Query: 207atggtactcc-tgtaatcttttcaaatgcggatagcaaagatgatgttgtcc-gcntatc 264
          |||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| || ||||
Sbjct: 125atggtactccctgtaatcttttcaaatgcggatagcaaagatgatgttgtcccgcgtatc 184
Query: 265tactgatgtaaacatanagttcgttcccatcagagacagactctgctcaacgtcaactgt 324
          |||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 185tactgatgtaaacatagagttcgttcccatcagagacagactctgctcaacgtcaactgt 244
Query: 325gtggaggcttgacaattatgacaactcggcaggcaaatggtgggtgacaactgatggggt 384
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 245gtggaggcttgacaattatgacaactcggcaggcaaatggtgggtgacaactgatggggt 304
Query: 385taaaggtgaacctggtcctaacactttgtgcngttggtttaanattganaaggccggagt 444
          |||||||||||| |||||||||||||||||| |||||||||| ||||| |||||||||||
Sbjct: 305taaaggtgaaccaggtcctaacactttgtgcagttggtttaagattgagaaggccggagt 364
Query:  445 actcggntacnaattcangttctgtc 470
            |||||| ||| |||||| ||||||||
Sbjct:  365 actcggttacaaattcaggttctgtc 390
```

Gambar 5. Hasil Blast spesial sekuen fragmen *TcPIN* dari klon harapan tahan PBK LW-1 dan MJ-1.

Figure 5. The special Blast result from the TcPIN fragments of the LW-1 and MJ-1 clones.

Kesimpulan dan Saran

1. Dari 18 tanaman kakao sampel yang diuji dengan analisis PCR menggunakan primer heterologous spesifik *PIN*, 13 klon teridentifikasi positif mengandung homolog *PIN* yang diduga berperan dalam sistem ketahanan tanaman di lapangan.
2. Satu dari 13 amplikon yakni MJ-1 telah berhasil diklon melalui vektor pGEM-T
3. Tingkat kemiripan antara fragmen gen *TcPIN* dari klon harapan tahan PBK LW-1 dengan klon MJ-1 sangat tinggi, sebesar 96 %.
4. Diperlukan analisis lebih lanjut untuk memastikan bahwa *TcPIN* berperan dominan terhadap resistensi kakao terhadap PBK.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai melalui Program RUTi II dari Kementerian Negara Riset dan Teknologi Indonesia.

Daftar Pustaka

Altschul, Stephen F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, T. Zang, Z. Zang, W. Miller & D.J. Lipwan (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program. *Nucleic Acids Res.,* **25,** 3389-3402.

Atmawinata, O. (1993). Hama penggerek buah kakao (PBK) suatu ancaman terhadap kelestarian perkebunan kakao di Indonesia. *Warta Puslit Kopi dan Kakao Jember,* **15,** 1-3.

Biro Pusat Statistik (2003). *Statistik Perkebunan Provinsi Sulawesi Selatan Tahun 2002*. Jakarta, BPS.

Claveri, J.M. & C. Notredame (2003). *Bioinformatics For Dummies*. 2nd ed., New York, Wiley Publ. Inc., p, 215-238.

Delledonne, M., G. Allegro, B. Belenghi, A. Balestrazzi, F. Picco, A. Levine, S. Zelasco, P. Calligari & M. Confalonieri (2001). Transformation of white poplar (*Populus alba* L.) with a novel *Arabidopsis thaliana* cysteine proteinase inhibitor and analysis of insect pest resistance *Mol. Breed.,* **7,** 35–42.

Dinas Perkebunan Provinsi Sulawesi Selatan (2001*). Laporan perkembangan organisme pengganggu tumbuhan (OPT) Sulawesi Selatan*. Makassar, Dinas Perkebunan Provinsi.

Higgins, D., J. Thompson, T. Gibson (1994). CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence aligment through sequence weighing, position-specific gap penalties and weigh matrix choise. *Nucleid Acid Res.,* **22,** 4673-4680.

Iswanto, A. (2002). The prospect from local selection of improved planting material conservation and sustainable production of cacao in Indonesia. *In* ACIAR Cacao Symposium, 21 –22 June 2001.

Khanuja, S.P.S., A.K. Shasany, M.P. Darokar & S. Kumar (1999). Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essensial oils. *Plant Mol. Biol. Rep.,* **17,** 1-7.

Lawrence, P.K. & K.R. Koundal (2002). Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects*. J. of Biotech*., **5,** 93-109.

Lewinsohn E., C.L. Steele & R. Croteau (1994) Simple isolation of functional RNA from woody stems of Gymnosperms. *Plant Mol. Biol. Rep* **12:** 20-25.

Orozco-Castillo, K.T. Chalmena, B. Wough & W. Powell (1994). Detection of genetic diversity and selective gene introgenession in coffee using RAPD Marker. *Theor. Appl. Genet.,* **87,** 934-935.

Park, S. & R.W. Thornburg (1996). Loss of Specific Sequences in a Natural Variant of Potato Proteinase Inhibitor II Gene Results in a Loss of Wound-Inducible Gene Expression. *Agric. Chem. Biotech.,* **39,** 104-111.

Sambrook, J., E.F. Fristsch & 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 21kDa pada kakao UAH Indonesia. *Menara Perkebunan,* **69** (1), 10-17.

Santoso, D.& RA. de Maagd (2003). *Molecular and genetic engineering studies toward improvement of cocoa bean production*. Internal Report of RUTI.

Sikumbang, Z. (2002). Development and prospect of cocoa in Indonesia. CCD. *In International Cocoa Conference and Cocoa Dinner*. Makassar, October 24-25, 2002.

Terra, W.R., C. Ferreira & B.P. Jordao (1996). Digestive enzymes. *In* Lehane M. J. (ed). Billin London, Chapman and Hall, 1996, p.153-194.

Tai, H., L. McHenry, P.J. Fritz & D.B. Furtek (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.

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.