

ISOLASI GEN KITINASE DARI *TRICHODERMA HARZIANUM* DALAM RANGKA PENGEMBANGAN KELAPA SAWIT TAHAN *GANODERMA*

Condro Utomo, A. Razak Purba, Endang Nurhayati¹,
Retno D. Setiowati dan Nancy D. Haro

ABSTRAK

Sepasang primer yang dirancang dari daerah homolog gen kitinase dari 4 species *Trichoderma* yang didepositkan di GenBank digunakan untuk mengaplikasi gen kitinase yang berasal dari *Trichoderma harzianum* PPKS. Sebagai primer forward dapat didesain sebagai Ktn 1F (5 TCACTCATGTCATCTACTC 3) dan sebagai primer reverse adalah Ktn 2R (5 AAAGAGATGAGCTCCTT 3). Hasil amplifikasi Polymerase chain reaction (PCR) menghasilkan pita DNA tunggal yang berukuran 1000 bp untuk *Trichoderma harzianum* PPKS. Hasil sekuensing dan konfirmasi di GenBank menunjukkan bahwa produk PCR yang disekuensi mempunyai homologi sebesar 97 % dengan gen kitinase dari *T. reesei* yang telah didepositkan di GenBank. "Multiple sequence alignment" digunakan untuk mengkonstruksi pohon phylogenetik dan ternyata *T. harzianum* PPKS menunjukkan mengelompok (Cluster) dengan *T. reesei* dan tidak mengelompok dengan *T. harzianum* yang didepositkan di GenBank

Kata kunci: *Trichoderma harzianum*, gen kitinase, PCR dan rancangan primer

ABSTRACT

A primer pair designed from the conserved sequences of the four chitinase genes of *Trichoderma* deposited in GenBank was used to amplify a partial chitinase gene of *Trichoderma harzianum* PPKS. As forward primer was designed as Ktn 1F (5 TCACTC ATGTCATCTACTC 3) and reverse primer was designed as Ktn 2R (5 AAAGAGATGA GCTCCTT 3). Polymerase chain reaction (PCR) by using these primers amplified a single PCR product of about 1000 bp for *Trichoderma harzianum* PPKS. Sequencing and confirmation to the GenBank indicated that PCR product was identified as chitinase gene with the homology to *T. reesei* chitinase gene was 97 %. Multiple sequence alignment was used to infer a phylogenetic tree and the generated tree showed that *T. harzianum* PPKS clustered to the *T. reesei* and it did not cluster to the *T. harzianum* deposited in GenBank.

Keywords: *Trichoderma harzianum*, chitinase gen, PCR and primer design

¹ Institut Pertanian Bogor

PENDAHULUAN

Penyakit busuk pangkal batang (BPB) yang disebabkan oleh jamur *Ganoderma* merupakan kendala utama dalam budidaya kelapa sawit di Asia Tenggara dimana penyakit ini menyerang sistem perakaran dan gejala penyakit yang ditimbulkannya hanya terlihat pada akhir infeksi sehingga tanaman yang sakit tidak mungkin lagi dapat diselamatkan. Kerugian serius terjadi pada generasi pertanaman lanjut seperti pada generasi pertanaman ketiga, dimana kematian tanaman akibat serangan penyakit ini dapat mencapai 60 % (20, 23) dan akan kurang berarti pada generasi pertanaman awal. Berbagai usaha untuk mengendalikan penyakit ini telah banyak dilakukan termasuk pengendalian secara kultur teknis, mekanik dan kimiawi, namun sejauh ini hasilnya kurang memuaskan. Idealnya pengendalian penyakit ini adalah melalui program pemuliaan tanaman dengan menemukan gen-gen yang tahan terhadap *Ganoderma* baik yang berasal dari inter atau intraspecies, namun demikian hingga saat ini tanaman yang dimaksud belum pernah ada. Untuk memecahkan persoalan dalam rangka mendapatkan bahan tanaman kelapa sawit yang tahan *Ganoderma* diperlukan pendekatan baru. Salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah dengan mengembangkan tanaman transgenik kelapa sawit tahan *Ganoderma*.

Salah satu kemungkinan sistem pertahanan tanaman terhadap serangan patogen jamur adalah yang berhubungan dengan enzim penghancur dinding sel atau yang dikenal dengan enzim kitinase

(21). Secara alami di dalam genom tanaman terdapat gen pengkode kitinase tetapi ekspresi gen untuk menghasilkan enzim ini di dalam tanaman kurang efektif atau bila terekspresi konsentrasinya relatif rendah. Berbagai kemungkinan enzim kitinase yang dihasilkan tanaman kurang efektif sebagai alat pertahanan diri terhadap serangan patogen jamur, antara lain 1) kitinase tanaman hanya efektif untuk ujung hifa yang relatif lebih lunak dan tidak mampu menghancurkan kitin yang lebih keras, 2) aktifitas sebagai zat anti jamur secara alamiah lemah, 3) hanya mampu menghambat perkembangan jamur-jamur tertentu, 4) tidak mempunyai efek terhadap beberapa patogen jamur penting (7,14).

Upaya untuk mengatasi ketidak-efektifan gen kitinase pada tanaman untuk menghasilkan zat anti jamur dapat dilakukan dengan transfer gen kitinase yang berasal dari jamur pengendali biologis seperti *Trichoderma*. Gen jamur pengkode enzim kitinase tersebut dapat menghasilkan enzim yang aktivitasnya setara dengan daya racun fungisida kimiawi (8, 10, 11, 12). Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa tak satupun dinding kitin hifa jamur patogen tahan terhadap enzim kitinase yang berasal dari jamur *Trichoderma* (9,10,11). Gen kitinase dari *T. harzianum* telah ditransfer ke beberapa tanaman untuk menginduksi resistensi tanaman terhadap jamur patogen, gen yang ditransfer dapat berfungsi dengan baik di dalam genom tanaman dan tanaman dapat beregenerasi tanpa hambatan. Tanaman transgenik yang disisipi gen kitinase terbukti tahan terhadap serangan patogen jamur adalah

tembakau dan kentang (13), brokoli (16), apel (3), kanola (5), ketimun (22), wortel (15), kacang tanah (16), sorgum (24) dan padi (4). Dengan demikian gen kitinase *T. harzianum* mempunyai potensi untuk diekspresikan di dalam genom kelapa sawit untuk memberikan ketahanan terhadap *Ganoderma*.

Penelitian ini bertujuan untuk mendesain pasangan primer dalam rangka untuk mengisolasi gen kitinase dari *T. harzianum* yang akan digunakan dalam pengembangan tanaman transgenik kelapa sawit tahan *Ganoderma*.

BAHAN DAN METODA

Ekstraksi DNA *T. harzianum*

DNA genomik dari *T. harzianum* diekstraksi berdasarkan metoda Orozco-Castillo dkk. (17) dengan modifikasi penambahan polivinilpolipirrolidon (PVPP) sebanyak 0,1 gr dan merkaptotanol selama penggerusan. Sebanyak 0.2 gr konidia dan miselia *T. harzianum* dihaluskan di dalam mortar dengan penambahan nitrogen cair beberapa kali. Hasil gerusan dimasukkan ke dalam tabung mikro 2 ml kemudian ditambahkan 1 ml bufer ekstraksi CTAB dan diinkubasi pada suhu 65 °C selama 30 menit dengan sekali-kali dikocok. Suspensi dicampur dengan larutan 1 ml kloroform : isoamilalkohol dan dikocok-kocok hingga merata selanjutnya disentrifugasi pada 11.000 rpm selama 5 menit. Pada tahap ini untuk memperoleh kemurnian DNA yang tinggi, supernatan dari suspensi ini dapat diperlakukan dengan campuran kloroform: isoamilal-

kohol sebanyak 2 atau 3 kali sebelum dilakukan pengendapan DNA hasil ekstraksi. Supernatan ditransfer ke dalam tabung mikro baru lalu ditambah 1 ml isopropanol dingin kemudian disentrifugasi pada 11.000 rpm selama 5 menit. Pelet DNA dilarutkan dengan 0,5 ml bufer TE dan ditambahkan 10 µl (20 µl) ribonuclease A, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam selanjutnya ditambah 1 ml ethanol absolute dan diinkubasikan selama 30 menit pada suhu -20 °C kemudian disentrifugasi pada 11.000 rpm selama 5 menit, pelet dicuci dengan 70 % ethanol dan dikeringkan. pelet dilarutkan dengan 50 µl bufer TE dan disimpan pada -20 °C sampai digunakan.

Kemurnian dan konsentrasi DNA ditetapkan dengan 2 cara, yaitu menggunakan spektrofotometer UV dan elektroforesis agarose. Larutan DNA contoh dipipet sebanyak 50 µl kemudian diencerkan dengan aquades menjadi 3 ml. Absorban diukur pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. pembacaan absorbansi = 1 berarti konsentrasi DNA adalah 50 µl/ml dan dianggap sebagai faktor konversi. Tingkat kemurnian DNA yang diukur UV spektrofotometer ditetapkan berdasarkan nilai perbandingan A260 dengan A280 yaitu sekitar 1,8-2,0 (19). Di samping itu juga dilakukan penetapan konsentrasi DNA contoh dengan elektroforesis agarose. Sebagai standar digunakan DNA yang telah diketahui konsentrasinya.

Desain primer dan amplifikasi PCR

Pasangan primer untuk mengisolasi gen kitinase didesain dengan menggunakan data sekuen (GenBank) dari

berbagai *Trichoderma* antara lain *T. hamatum* (AY258898), *T. viride* (AF208842), *T. virens* (AF050098) dan *T. reesei* (AB190216) kemudian ditentukan "start" kodon dan "stop" kodon, setelah itu dilakukan alignment dengan program MegAlign (DNASstar) untuk mencari daerah-daerah homolog. Amplifikasi PCR untuk mendapatkan gen kitinase dilakukan dengan menggunakan total campuran reaksi PCR (25 µl) mengandung 100 ng DNA genomik, bufer PCR, dNTPmix dengan konsentrasi 10 mM, 1 µl untuk masing-masing primer forward dan reverse serta sebanyak 1 unit *Taq* polymerase. Reaksi amplifikasi dilakukan menggunakan alat *GeneAmp PCR System 2400*, dengan tahapan sebagai berikut 2 menit pada 94 °C, diikuti dengan siklus termal sebanyak 40 kali terdiri dari 45 detik untuk denaturasi pada 94°C, 90 detik untuk annealing pada 55 °C dan 90 detik untuk ekstension pada 72°C diikuti dengan ekstension akhir selama 10 menit pada 72 °C. Fragmen DNA dari hasil amplifikasi PCR sebanyak 10 µl dicampur dengan 1 µl loading bufer dan dipisahkan dengan menggunakan elektroforesis 1,5% selama 80 menit dengan voltase 50 V. Hasil elektroforesis direndam dalam larutan ethidium bromide selama 45 menit dan divisualisasikan dengan UV transiluminator dan didokumentasi dengan camera polaroid.

DNA sekuensing, data analisis dan konstruksi phylogenetik

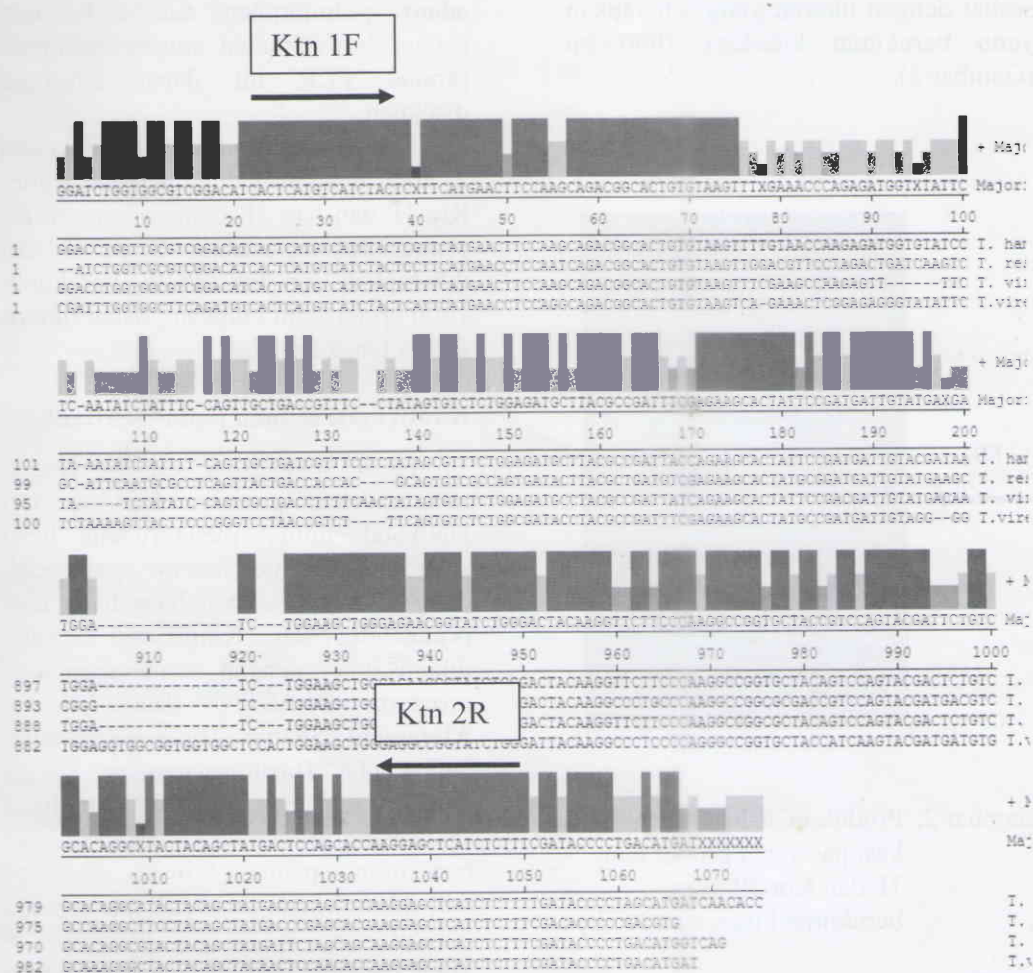
Produk PCR langsung disekuensing dari dua arah dengan menggunakan pasangan primer untuk menghasilkan

produk PCR tersebut dimana sebelum dilakukan sekuensing produk PCR dimurnikan dan dibuang primer-dimernya dengan PCR purification kit kemudian PCR produk dikirim ke lembaga Eijkman (Jakarta) untuk disekuensing. Data sekuen dikirim ke GenBank dan dianalisis dengan program BLASTN (1) untuk determinasi gen target yang diharapkan. phylogenetik dikonstruksi dengan menggunakan metoda Clustal V algorithm (MegAlign; DNA-star) dan sebagai pembandingan data sekuen digunakan berbagai *Trichoderma* antara lain *T. hamatum* (AY258898), *T. viride* (AF208842), *T. virens* (AF050098), *T. reesei* (AB190216), *T. harzianum* (AY618901), *T. pseudokoningii* (AB041756) dan *T. atroviride* (AF188920) dan sebagai outgroup digunakan sekuen kitinase dari *Candida albicans* (CAU36490).

HASIL

Primer desain dan PCR produk

Hasil "alignment" keempat data sekuen gen kitinase dari *T. hamatum* (AY258898), *T. viride* (AF208842), *T. virens* (AF050098), *T. reesei* (AB190216) menunjukkan adanya daerah sekuen yang homolog. Daerah sekuen homolog relatif panjang (lebih dari 15 basa) sehingga dapat didesain primer dimana untuk primer forward dapat didesain sebagai Ktn 1F (5 TCACTCATGTCATCTACTC 3) dan sebagai primer reverse adalah Ktn 2R (5 AAAGAGATGAGCTCCTT 3) (Gambar 1).

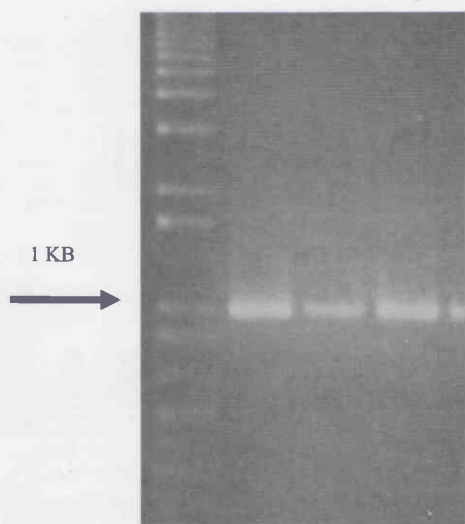


Gambar 1. Hasil alignment dari keempat *Trichoderma* menghasilkan daerah homologi dan dipergunakan untuk mendesain primer Ktn 1F dan Ktn 2R (anak panah)

Hasil amplifikasi PCR dari pasangan primer ini diperkirakan berukuran 1000 bp. Amplifikasi pasangan primer Ktn 1F dan Ktn 2R pada temperatur annealing 55 C° menghasilkan produk PCR tunggal

Isolasi Gen Kitinase dari *Trichoderma harzianum* dalam rangka pengembangan Kelapa Sawit Tahan *Ganoderma*

sesuai dengan ukuran yang diharapkan yaitu berukuran kira-kira 1000 bp (Gambar 2).



Gambar 2. Produk PCR hasil amplifikasi pasangan primer Ktn 1F dan Ktn 2R yang berukuran kira-kira 1000 bp

Hasil amplifikasi pasangan primer ini baik sekali, ditandai dengan tidak

adanya polimorfisme dan hasil ikutan primer-dimer sangat minim sehingga produk PCR ini dapat langsung disekuensi.

Sekuensing produk PCR dilakukan 2 arah dengan menggunakan primer Ktn 1F dan Ktn 2R dengan konsentrasi primer masing-masing 2 pmol dan diharapkan produk PCR berukuran 1000 bp tersebut langsung dapat dibaca secara lengkap.

Konfirmasi sekuen pada GenBank.

Hasil sekuensing diolah dengan menggunakan program EditSeq dari DNASTar untuk mengurutkan hasil sekuen dari primer reverse agar cocok dengan urutan sekuen basa hasil dari primer forward. Konfirmasi sekuen dilakukan dengan menggunakan program BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool) pada situs NCBI (1). Hasil sekuensing secara lengkap setelah menggabungkan hasil sekuensing primer forward dan reverse berukuran sepanjang 936 bp, disajikan dan dikonfirmasi ke GenBank sebagai berikut:

Total panjang hasil sekuensing = 936 bp

```
GAACCTCCAATCAGACGGCACTGTGTAAGTTGGGCGTTCCTAGACTGATCAGTCGC
ACTCATGCGCCTCAGTTACTGACCACCACGCAGTGTGCGCCAGTGATACTTACGCTGA
TGTCGAGAAGCACTATGCTGATGATTG TATGAAGCCCCAACCCC TTGAGTGACTGTG
AACCTGTGCCTTGATATCATGCTTACA CCCACGTTAGCCTGGAACGATGTCGGCACC
AACTTGATGGCTGTGCTAAGCAACTGTTCAAGTTGAAGAAGGCCAACCGAAAACC
TGAAGGTCATGCTTTCCATCGGCGGCTG GACCTACTCCACCAACTTCGCCTCTGCAG
CGAGCACGGATGCGAACCGAAAGAGATTGCGCTCAACTGCCATTACGTACATGAAG
GATTGGGGCTTCGACGGTATCGACATC GACTGGGAGTACCCTGCCGACAGCACCCA
GGCCTCCAACATGATTCTTCTGTTGAAGGAAGTCCGATCTCAGCTTGACGCCTACGC
CGCACAGCACGCCCTGGCTACCACTTCCTTCTCTCCATTGCTGCGCCGGCCGGCGA
```


AGTCAACTACTCCCTCCTGCGCATGGCCGAT CTCGGCCAAGTCCTCGACTATGTAA
CCTCATGGCCTACGACTATGCCGATC TTGGAGCAACGCCTCCGGACACGACGCCA
ACCTGTATCACAACCCGCGAGAACCCCAAC GCGACACCCTTCAACACTGATGATGCT
GTGAAGGCCTACATCAACG GAGGTGTTCCCGCAAGCAAGATTGTCCTTGGTATGCC
CATCTACGGCCGATCCTTTGAGTCCACCT CTGGCATTGGCCAGCCTTTCAACGGAAT
CGGGTCTGGAAGCTGGGAGAACGGTGTCTGGGACTACAAGGCCCTGCCCAAGGCCG
GCGCGACCGTCCAGTAGCATGACGTCGCCAAG

BLASTN 2.2.15 [Oct-15-2006]

RID: 1164195278-17955-58407699758.BLASTQ4

Taxonomy reports

	Score (bits)	E Val ue
gi 51988012 dbj AB190216.1 Hypocrea jecorina chi46 gene for 46	1600	0.0
gi 13516884 dbj AB041756.1 Trichoderma pseudokoningii chit-P...	884	0.0
gi 13516872 dbj AB041750.1 Trichoderma virens chit-G2 gene f...	884	0.0
gi 60328159 gb AY758408.1 Hypocrea lixii strain T12 bacteria...	430	4e-117
gi 6630949 gb AF188925.1 AF188925 Trichoderma viride strain T...	420	4e-114
gi 6630947 gb AF188924.1 AF188924 Trichoderma viride strain A...	420	4e-114
gi 54794008 gb AY605867.1 Trichoderma cerinum strain MA 3646...	414	2e-112
gi 6630945 gb AF188923.1 AF188923 Hypocrea rufa strain GJS 89...	412	9e-112
gi 54794004 gb AY605865.1 Trichoderma cerinum strain MA 2991...	410	3e-111
gi 54794002 gb AY605864.1 Trichoderma cerinum strain MA 2988...	410	3e-111
gi 13516882 dbj AB041755.1 Trichoderma viride chit-VIRI gene...	398	1e-107
gi 13516874 dbj AB041751.1 Trichoderma harzianum chit-HAR1 g...	398	1e-107
gi 499084 emb X79381.1 THECH42 T.harzianum (IMI 206040) ech-42 g	396	5e-107
gi 6630953 gb AF188927.1 AF188927 Trichoderma viride strain G...	396	5e-107
gi 409393 gb L14614.1 TRREDOCHI Trichoderma harzianum endochiti	396	5e-107
gi 999375 gb S78423.1 chit42=endochitinase [Trichoderma harzian	394	2e-106
gi 54794006 gb AY605866.1 Trichoderma cerinum strain MA 3638...	394	2e-106
gi 1223923 gb U49455.1 THU49455 Trichoderma harzianum endochitin	394	2e-106
gi 6630939 gb AF188920.1 AF188920 Trichoderma atroviride stra...	389	1e-104
gi 54794000 gb AY605863.1 Trichoderma cerinum strain DAOM 23...	389	1e-104
gi 92911763 gb DQ462415.1 Trichoderma sp. w512 chitinase (ech-4	387	5e-104
gi 13516880 dbj AB041754.1 Trichoderma hamatum chit-HAM gene...	387	5e-104
gi 13516878 dbj AB041753.1 Trichoderma harzianum chit-HAR3 g...	379	1e-101
gi 52630745 gb AY602988.1 Trichoderma tomentosum strain zd 2...	371	3e-99
gi 6630937 gb AF188919.1 AF188919 Trichoderma viride strain A...	365	2e-97
gi 22086220 gb AF399275.1 Hypocrea strictipilis strain CBS 3...	365	2e-97
gi 6630943 gb AF188922.1 AF188922 Hypocrea rufa strain GJS 89...	361	3e-96
gi 13516876 dbj AB041752.1 Trichoderma harzianum chit-HAR2 g...	347	4e-92
gi 22086213 gb AF399273.1 Trichoderma oblongisporum strain C...	345	2e-91
gi 54793996 gb AY605861.1 Trichoderma tomentosum strain CBS ...	341	3e-90
gi 22086226 gb AF399277.1 Trichoderma tomentosum strain CBS ...	341	3e-90

**Isolasi Gen Kitinase dari *Trichoderma harzianum* dalam rangka pengembangan Kelapa Sawit
Tahan *Ganoderma***

gi|51988012|dbj|AB190216.1| Hypocrea jecorina chi46 gene for 46 kDa chitinase, complete cds = T. reesei
Score = 1600 bits (807), Expect = 0.0Identities = 888/911 (97%), Gaps = 3/911 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query	4	AGTTGGGCGTTCTAGACTGATCA-GTCGCACTCA-TGCGCCTCAGTTACTGACCACCAC	61
Sbjct	702	AGTTGGACGTTCTAGACTGATCAAGTCGATTCAATGCGCCTCAGTTACTGACCACCAC	761
Query	62	GCAGTGTGCGCCAGTGATACTTACGCTGATGTCGAGAAGCACTATGCTGATGATTGTATGA	121
Sbjct	762	GCAGTGTGCGCCAGTGATACTTACGCTGATGTCGAGAAGCACTATGCGGATGATTGTATGA	821
Query	122	AGCCCCAACCCCTTGAGTGACTGTGAACCTGTGCCTTGATATCATGCTTACACCCACGTT	181
Sbjct	822	AGCCCCTACCCCTTGAGTGATTGTGCACCTGTGCCTTATAATCATGCTTACACCCACGCT	881
Query	182	AGCCTGGAACGATGTCGGCACCAACTTGTATGGCTGTGCTAAGCAACTGTTCAAGTTGAA	241
Sbjct	882	AGCCTGGAACGATGTCGGCACCAACTTGTACGGCTGTGCCAAGCAACTGTTCAAGTTGAA	941
Query	242	GAAGGCCAACCGAAACCTGAAGGTCATGCTTCCATCGGCGGCTGGACCTACTCCACCA	301
Sbjct	942	GAAGGCCAACCGAAA-CCTGAAGGTTATGCTTCCATCGGCGGCTGGACCTATTCTACCA	1000
Query	302	ACTTCGCCTCTGCAGCGAGCACGGATGCGAACCGAAAGAGATTGCGCTCAACTGCCATTA	361
Sbjct	1001	ACTTCGCCTCTGCAGCGAGCACGGATGCGAACCGAAAGAGATTGCGCTCAACTGCCATTA	1060
Query	362	CGTACATGAAGGATTGGGGCTTCGACGGTATCGACATCGACTGGGAGTACCCTGCCGACA	421
Sbjct	1061	CGTACATGAAGGACTGGGGCTTCGACGGTATCGACATCGACTGGGAGTACCCTGCCGACA	1120
Query	422	GCACCCAGGCCCTCCAACATGATTCTTCTGTTGAAGGAAGTCCGATCTCAGCTTGACGCCT	481
Sbjct	1121	GCACCCAGGCCCTCCAACATGATTCTTCTGTTGAAGGAAGTCCGATCTCAGCTTGACGCCT	1180
Query	482	ACGCCGCACAGCACGCCCTGGCTACCACTTCCTTCTCTCCATTGCTGCGCCGGCCGGCG	541
Sbjct	1181	ACGCCGCACAGCACGCCCTGGCTACCACTTCCTTCTCTCCATTGCTGCGCCGGCCGGCG	1240
Query	542	AAGTCAACTACTCCCTCCTGCGCATGGCCGATCTCGGCCAAGTCCTCGACTATGTTAACC	601
Sbjct	1241	AAGTCAACTACTCCCTCCTGCGCATGGCCGATCTCGGCCAAGTCCTCGACTATGTTAACC	1300
Query	602	TCATGGCCTACGACTATGCCGGATCTTGAGCAACGCCTCCGGACACGACGCCAACCTGT	661
Sbjct	1301	TCATGGCCTACGACTATGCCGGATCTTGAGCAACGCCTCCGGACACGACGCCAACCTGT	1360
Query	662	ATCACAACCCGAGAACCCCAACGCGACACCCCTCAACACTGATGATGCTGTGAAGGCCT	721
Sbjct	1361	ATCACAACCCGAGAACCCCAACGCGACACCCCTCAACACTGATGATGCTGTGAAGGCCT	1420
Query	722	ACATCAACGGAGGTGTTCCCGCAAGCAAGATTGTCCTTGGTATGCCCATCTACGCCGAT	781
Sbjct	1421	ACATCAACGGAGGTGTTCCCGCAAGCAAGATTGTCCTTGGTATGCCCATCTACGCCGAT	1480


```

Query 782 CCTTTGAGTCCACCTCTGGCATTGGCCAGCCTTTCAACGGAATCGGGTCTGGAAGCTGGG 841
      |||
Sbjct 1481 CCTTTGAGTCCACCTCTGGCATTGGCCAGCCTTTCAACGGAATCGGGTCTGGAAGCTGGG 1540

Query 842 AGAACGGTGTCTGGGACTACAAGGCCCTGCCAAGGCCGGCGCGACCGTCCAGTAGCATG 901
      |||
Sbjct 1541 AGAACGGTGTCTGGGACTACAAGGCCCTGCCAAGGCCGGCGCGACCGTCCAGTAGCATG 1600

Query 902 ACGTCGCCAAG 912
      |||
Sbjct 1601 ACGTCGCCAAG 1611
  
```

Hasil konfirmasi dengan menggunakan BLASTN tersebut menunjukkan bahwa PCR produk yang disekuensi adalah sesuai dengan target dan benar dengan homologi sebesar 97 % dengan gen kitinase dari *T. reesei* yang telah didepositkan di GenBank.

Penentuan intron dan exon gen kitinase

Gen lengkap kitinase dari *Trichoderma* yang didepositkan di GenBank berukuran sekitar 1300-1400 bp seperti pada, *T. viride* (AF208842, 1400 bp), *T. virens* (AF050098, 1400 bp), *T. reesei* (AB190216, 1400 bp), *T. harzianum* (AY618901, 1300 bp), *T. pseudokoningii* (AB041756, 1400 bp) dengan masing-masing hanya mempunyai 3 intron sehingga memudahkan

untuk menentukan perkiraan lokasi intron. "Putative" intron diidentifikasi berdasarkan konsensus sekuen pada "splicing junction" pada 5' GT(AG)(AT)GT dan 3' (CT)AG yang ada pada jamur (2, 6). Untuk memudahkan visualisasi, intron akan disajikan dengan huruf kecil sedangkan exon akan disajikan dengan huruf besar (Gambar 3). "Putative" exon diprediksi dengan menerjemahkan kodon ke dalam asam amino dengan menggunakan program EditSeq (DNASTar). Hasil sekuensing dari gen kitinase tersebut menunjukkan adanya 2 intron dengan ukuran berkisar 65-68 bp dan pada exon setelah diterjemahkan ke dalam asam amino menghasilkan sebanyak 267 asam amino (Gambar 3).

N L Q S D G T V

AACCTCCAATCAGACGGCACTGTgtaagttggcgcttctagactgatcagtcgcactcatgcgcctcagttact

V A S D T Y A D V E K H Y A D D

gaccaccacgcagTGTCGCCAGTGATACTTACGCTGATGTCGAGAAGCACTATGCGGATGA

S

W N D

TTgtatgaagccccaacccttgagtactgtgaacctgtgccttgatatcatgcttacaccacgtagCCTGGAACGA

V G T N L Y G C A K Q L F K L K K A N

TGTCGGCACCAACTTGATGGCTGTGCTAAGCAACTGTTCAAGTTGAAGAAGGCCAA

R N L K V M L S I G G W T Y S T N F A

CCGAAACCTGAAGGTCATGCTTTCCATCGG CGGCTGGACCTACTCCACCAACTTCG

Isolasi Gen Kitinase dari *Trichoderma harzianum* dalam rangka pengembangan Kelapa Sawit Tahan *Ganoderma*

S A A S T D A N R K R F A S T A I T Y
 CTCTGCAGCGAGCACGGATGCGAACCGAAAGAGATTCGCCTCAACTGCCATTACGTA
M K D W G F D G I D I D W E Y P A D S
 CATGAAGGATTGGGGCTTCGACGGTATCGACATCGACTGGGAGTACCCTGCCGACAG
T Q A S N M I L L L K E V R S Q L D A
 CACCCAGGCCTCCAACATGATTCTTCTGTTG AAGGAAGTCCGATCTCAGCTTGACGC
Y A A Q H A P G Y H F L L S I A A P A
 CTACGCCGCACAGCACGCCCTGGCTACCACTTCCTTCTCTCCATTGCTGCGCCGGCC
G E V N Y S L L R M A D L G Q V L D Y
 GGCGAAGTCAACTACTCCCTCCTGCGCATGGC CGATCTCGGCCAAGTCCTCGACTAT
V N L M A Y D Y A G S W S N A S G H D
 GTTAACCTCATGGCCTACGACTATGCCGGA TCTTGAGCAACGCCTCCGGACACGAC
A N L Y H N P Q N P N A T P F N T D D
 GCCAACCTGTATCACAACCCGCGAGAACCCCAACGCGACACCTTCAACACTGATGAT
A V K A Y I N G G V P A S K I V L G M
 GCTGTGAAGGCCTACATCAACGGAGGTG TTCCCGCAAGCAAGATTGTCCTTGATG
P I Y G R S F E S G I G Q P F N G I G S
 CCCATCTACGGCCGATCCTTTGAGTCCACC TCTGGCATTGGCCAGCCTTTCAACGGAA
G S W E N G V W D Y K A L P K A G A
 TCGGGTCTGGAAGCTGGGAGAACGGTGTCTGGGACTACAAGGCCCTGCCAAGGCC
T V Q Y D D V M T S P
 GGCGCGAACCGTCCAGTACGCATGACGTCGCCAAG

Gambar 3. Sekuen exon dan intron gen kitinase *T. harzianum* PPKS dan terjemahan kodonnya menjadi asam amino (huruf tebal)

Konstruksi pohon phylogenetik

Sebelum dilakukan konstruksi pohon phylogenetik, panjang sekuen untuk daerah "responding" harus sama panjang untuk masing-masing *Trichoderma* maupun *Candida albicans* yaitu berukuran kira-kira 936 bp, hal ini untuk menghindari

terjadinya bias dalam konstruksi pohon phylogenetik. Dalam phylogenetik ternyata *T. harzianum* PPKS menunjukkan mengelompok (Cluster) dengan *T. reesei* dengan homologi sebesar 97 % dan tidak mengelompok dengan *T. harzianum* yang didepositkan di GenBank (Gambar 4).



Gambar 4. Pohon phylogenetik dari sekuen basa gen partial kitinase *Trichoderma* yang dikonstruksi dengan menggunakan Clustal method with the PAM 250 dan sebagai outgroup digunakan *Candida albicans*. Nomor di bawah menunjukkan "Substitution events"

DISKUSI

Ekspresi dari gen kitinase pada berbagai tanaman transgenik telah terbukti dapat menghambat dan menekan perkembangan patogen jamur yang menyerang. Dengan menggunakan pasangan primer Ktn 1F dan Ktn 2R dihasilkan gen kitinase dari *T. harzianum* PPKS berukuran 936 bp atau sekitar 75 % dari gen lengkap kitinase (gen lengkap kitinase *Trichoderma* berukuran sekitar 1300-1400 bp) sehingga perlu dilanjutkan untuk memperoleh gen lengkap kitinase dari *T. harzianum* PPKS dalam rangka pengembangan tanaman transgenik kelapa sawit tahan *Ganoderma*. Selanjutnya gen lengkap kitinase tersebut akan dikonstruksi dalam plasmid dengan orientasi yang benar agar gen yang disisipkan ke dalam genom kelapa sawit dapat mengekspresikan enzim kitinase yang dapat melisis miselia *Ganoderma*. Dalam pohon phylogenetik

T. harzianum PPKS mengelompok dengan *T. reesei* dengan homologi sebesar 97 % dan terpisah dengan *T. harzianum* yang ada di GenBank, ini menunjukkan bahwa *T. harzianum* PPKS ada kemungkinan besar sebenarnya adalah *T. reesei*.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi Republik Indonesia atas dana RUT XI dalam pembiayaan penelitian ini.

DAFTAR PUSATAKA

1. ALTSCHUL, S. F., T. L. MADDEN, A. A. SCHÄFFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, W. MILLER and D. J. LIPMAN (1997). „Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new

Isolasi Gen Kitinase dari *Trichoderma harzianum* dalam rangka pengembangan Kelapa Sawit Tahan *Ganoderma*

- generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
2. BALLANCE, D. J. (1986). Sequences important for gene expression in filamentous fungi. *Yeast* 2, 229-236.
 3. BOLAR, J. P., J. L. NORELLI, G. E. HARMAN, S. K. BROWN and H. S. ALDWINCKLE (2001). Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. *Transgenic Res.* 10, 533-543.
 4. DATTA, K., J. TU, N. OLIVA, I. I. ONA, R. VELAZHAHAN, T. W. MEW, S. MUTHUKRISHMAN and S. K. DATTA. (2001). Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. *Plant Sci.* 5: 405-414.
 5. GRISON, R., B. GREZES-BESSET, M. SCHNEIDER, N. LUCANTE, L. OLSEN, J. J. LEGUAY and A. TOPPAN. (1996). Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. *Nat. Biotechnol.* 14: 643-646.
 6. HAHN, M., NEEF, U., STRUCK, C., GÖTTFERT, M. and MENDGEN, K. (1997). A putative amino acid transporter is specifically expressed in haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. *Mol. Plant-Microbe Inter.* 10, 438-445.
 7. JOOSTEN, M. H. A., J., VERBAKEL, H. M., NETTEKOVEN, M. E., VAN LEEUWEN, J., VANDER VOSSSEN, R. T. M. and DE WIT, P. J. G. M. (1995). The phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* is not sensitive to the chitinase and beta-1,3-glucanase defense proteins of its host, tomato. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46, 45-49.
 8. LORITO, M., A. DI PIETRO, C. K. HAYES, S. L. WOO and G. E. HARMAN. (1993a). Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. *Phytopathology* 83, 721-728.
 9. LORITO, M., G. E. HARMAN, C. K. HAYES, R. M. BROADWAY, A. TRONSMO, S. L. WOO and A. DI PIETRO (1993b). Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83:302-307.
 10. LORITO, M., C. K. HAYES, A. DI PIETRO, S. L. WOO and G. E. HARMAN. (1994a). Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3-beta-glucosidase and an N-acetyl-beta-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 84, 398-405.
 11. LORITO, M., C. PETERBAUER, C. K. HAYES and G. E. HARMAN.

- (1994b). Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology* 140, 623-629
12. LORITO, M., S. L. WOO, M. D'AMBROSIO, G. E. HARMAN, C. K. HAYES, C. P. KUBICEK, and F. SCALA. (1996). Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9, 206-213
13. LORITO, M. (1998). Chitinolytic enzymes and their genes, p. 73-99. In G. E. Harman, and C. P. Kubicek (ed.), *Trichoderma and Gliocladium*, vol. 2. Taylor and Francis Ltd., London, United Kingdom.
14. MAUCH, F., B. MAUCHMANI and T. BOLLER. (1988). Antifungal hydrolases in pea tissue. 2. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and beta-1,3 glucanase. *Plant Physiol.* 88, 936-942
15. MELCHERS, L. S. and M. H. STUIVER. (2000). Novel genes for disease-resistance breeding. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 147-152.
16. MORA, A. and E. D. EARLE. (2001). Combination of *Trichoderma harzianum* endochitinase and a membrane-affecting fungicide on control of *Alternaria* leaf spot in transgenic broccoli plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 306-310
17. OROZCO-CASTILLO, K. J. CHALMERS, WAUGH R. and POWELL W. (1994). Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 87, 934-940.
18. ROHINI, V. K. and S. K. RAO. (2001). Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with tobacco chitinase gene: variable response of transformants to leaf spot disease. *Plant Sci.* 160: 889-898.
19. SAMBROOK, J., FRITSCH E. F. and MANIATIS T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2 ed. Vol. I-III. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. USA.
20. SINGH, G. (1991). *Ganoderma* the scourge of oil palm in the coastal areas. *Planter* 67, 421-444.
21. STASKAWICZ, B. J., F. M. AUSUBEL, B. J. BAKER, J. G. ELLIS and J. D. G. JONES. (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268, 661-667
22. Tabei, Y., S. KITADE, Y. NISHIZAWA, N. KIKUCHI, T. KAYANO, T. HIBI and K. AKUTSU. (1998). Transgenic cucumber plant harbouring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinera*). *Plant Cell Rep.* 17: 159-164.
23. TURNER, P. D. (1981). *Oil Palm Diseases and Disorders*. Oxford University Press, Kuala Lumpur, 281 pp.

Isolasi Gen Kitinase dari *Trichoderma harzianum* dalam rangka pengembangan Kelapa Sawit Tahan *Ganoderma*

24. WANISKA, R. D., R. T. VENKATESHA, A. CHANDRASHEKAR, S. KRISHNAVENI, F. P. BEJOSANO, J. JEOUNG, J. JAYARAJ, S. MUTHUKRISHMAN and G.H. ILIANG. (2001). Antifungal proteins and other mechanisms in the control of sorghum stalk rot and grain mold. J. Agric. Food Chem. 49: 4732-4742.