

Eksresi β -1,3 glukonase dan kitinase pada tanaman kopi arabika (*Coffea arabica* L.) tahan dan rentan karat daun

Expression of β -1,3 glucanase and chitinase of arabica coffee (Coffea arabica L.) resistant and susceptible against leaf rust disease

Asmini BUDIANTI¹⁾, I. SUSANTI²⁾, Surip MAWARDI³⁾, D.A. SANTOSO²⁾
& SISWANTO¹⁾

¹⁾ Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

²⁾ Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor

³⁾ Pusat Penelitian Kopi & Kakao, Jember 68118, Indonesia

Summary

Leaf rust disease caused by Hemileia vastatrix is considered to be one of the most important diseases on arabica coffee plantation. In order to understand the mechanism underlying resistance of arabica coffee against leaf rust disease, this research was aimed to study expression of β -1,3 glucanase (GLU) and chitinase (CHI) genes in the arabica coffee S1934 and BLP10 that have been reported respectively as a resistant and susceptible varieties to H. vastatrix. The two varieties were essayed against H. vastatrix, and an RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) using total RNAs from the S1934 and BLP10, both inoculated with H. vastatrix and uninoculated was carried out for studying the expression of GLU and CHI. Two primer pairs were designed to amplify the conserved region of GLU and CHI. Amplification products were sequenced and the nucleotide sequences were subjected to BlastX analysis. The result of bioassay confirmed that arabica coffee S1934 was resistant to H. vastatrix, while BLP10 was sensitive. β -1,3 glucanase was expressed in all of the four samples, the inoculated and uninoculated S1934, and BLP10 in different degree. S1934 expressed higher GLU compared to BLP10. In the inoculated S1934 the expression

of this gene was higher compared to that of the uninoculated one. Expression of CHI was detected only in the S1934, both inoculated and uninoculated. Sequence analysis confirmed that the RT-PCR products were exon regions of genes encoding β -1,3 glucanase dan chitinase respectively. Both of the cDNA fragment have been cloned in E.coli.

[Key words: *Hemileia vastatrix*, β -1,3 glucanase, chitinase, leaf rust,]

Ringkasan

Karat daun yang disebabkan oleh jamur *Hemileia vastatrix* merupakan salah satu penyakit penting pada perkebunan kopi arabika. Untuk memahami mekanisme ketahanan kopi arabika terhadap karat daun, penelitian ini bertujuan untuk mempelajari ekspresi gen β -1,3 glukonase dan kitinase pada varietas kopi arabika S1934 yang dilaporkan tahan karat daun dan varietas BLP10 yang termasuk rentan karat daun. Untuk itu kedua varietas diuji kembali ketahanannya terhadap *H. Vastatrix* melalui bioesai dan dilakukan RT-PCR menggunakan RNA total dari S1934 dan BLP10, baik yang diinokulasi dengan *H. vastatrix* maupun yang tidak diinokulasi, untuk mempelajari ekspresi gen *GLU* dan *CHI*.

Dua pasang primer spesifik dirancang untuk mengamplifikasi daerah konservatif kedua gen tersebut. Hasil amplifikasi disekuon dan dianalisis menggunakan program BlastX. Hasil bioesai mengkonfirmasi bahwa S1934 tahan terhadap *H. Vastatrix*, sedangkan BLP10 sensitif. β -1,3 glukukanase diekspresikan pada kedua varietas, baik yang diinokulasi maupun yang tidak diinokulasi, namun dengan tingkat ekspresi yang sedikit berbeda. Varietas S1934 mengekspresikan β -1,3 glukukanase lebih tinggi dibandingkan dengan BLP10. Ekspresi gen tersebut pada S1934 yang diinokulasi lebih tinggi dibandingkan dengan yang tidak diinokulasi. Sedangkan kitinase hanya diekspresikan pada varietas S1934. Hasil sekuensing dan analisis DNA mengkonfirmasi bahwa sekuen hasil RT-PCR merupakan bagian ekson dari gen penyandi β -1,3 glukukanase dan kitinase. Kedua fragmen tersebut telah diklon pada *E. Coli*.

Pendahuluan

Salah satu masalah utama dalam pengembangan kopi arabika di Indonesia adalah penyakit karat daun yang disebabkan oleh jamur *H. vastatrix*. Di Indonesia, serangan penyakit ini dilaporkan dapat menurunkan produksi sampai 50 %, sedangkan di India penurunan produksi dilaporkan dapat mencapai 70 % (Kushalappa, 1989). Meskipun sejarah perkembangan penyakit ini sudah berlangsung lebih dari satu abad, namun sampai saat ini belum ada cara efektif untuk menanggulangnya. Upaya pengendalian secara kimiawi kurang disukai karena di samping memerlukan biaya cukup tinggi, juga meninggalkan residu yang berbahaya bagi konsumen. Salah satu alternatif pendekatan yang dipandang potensial untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan merakit tanaman kopi arabika yang tahan karat daun sekaligus berdaya hasil tinggi dengan mutu biji yang tinggi.

Pemuliaan konvensional di India telah menghasilkan beberapa galur yang relatif tahan terhadap karat daun yang kemudian diintroduksi ke Indonesia. Salah satu galur, S1934, kemudian dinyatakan sebagai varietas anjuran karena memiliki ketahanan terhadap karat daun meskipun telah ditanam di dataran tinggi Ijen selama 12 tahun (Mawardi, 1996). Selain tahan karat daun, varietas ini juga berdaya hasil cukup tinggi dan mempunyai potensi menyerbuk silang, namun mempunyai kelemahan banyaknya biji gajah yang dihasilkan. Untuk merakit tanaman kopi arabika yang tahan karat daun, berdaya hasil tinggi dan menghasilkan biji dengan kualitas yang tinggi diperlukan upaya untuk memindahkan gen yang mengontrol sifat ketahanan dari varietas S1934 ke varietas lain yang memiliki keunggulan menghasilkan biji berkualitas dan berdaya hasil tinggi. Secara konvensional, hal ini akan memerlukan waktu lama karena diperlukan beberapa kali persilangan balik untuk mengeliminir sifat-sifat yang tidak diinginkan.

Salah satu pendekatan alternatif yang dinilai sangat potensial untuk mengatasi masalah tersebut adalah rekayasa genetik, yang dapat ditempuh antara lain dengan jalan mengintroduksi gen ketahanan ke dalam genom tanaman kopi yang diinginkan. Gen tersebut dapat berasal dari berbagai sumber, baik tanaman maupun mikroorganisme seperti jamur dan bakteri. Namun untuk sampai pada tahapan tersebut diperlukan pemahaman mengenai mekanisme ketahanan yang terjadi dalam tanaman tersebut.

Mekanisme interaksi antara inang dengan parasit sangat menentukan tingkat ketahanan tanaman terhadap suatu penyakit. Menurut Prell & Day (2001) mekanisme

Ekspresi β -1,3 glukonase dan kitinase pada tanaman kopi arabika...

ketahanan tanaman dapat berupa hiper sensitifitas sel dengan cara pembentukan, lignin atau protein struktural, senyawa fito-aleksin dan sintesis protein PR (*pathogenesis related proteins*) seperti kitinase dan β -1,3 glukonase. Beberapa tanaman menghasilkan kedua enzim ini sebagai bagian dari sistem pertahanan melawan jamur patogen, karena keduanya dapat menghidrolisis komponen dinding sel jamur patogen (Giannakis *et al.*, 1998; Leubner-Metzger *et al.*, 1999). Kitinase menghidrolisis kitin, sedangkan β -1,3-glukonase menghidrolisis β -1,3-glukan. Model pertahanan tanaman yang melibatkan kitinase dan β -1,3-glukonase secara sinergis dikemukakan oleh Mauch & Staechen (1989). Produksi kitinase pada beberapa tanaman dapat bersifat konstitutif, namun pada beberapa tanaman lain bersifat *inducible* (Graham & Sticklen, 1993). Pemahaman mengenai mekanisme ketahanan tanaman terhadap suatu penyakit merupakan salah satu faktor penting yang diperlukan dalam usaha mengatasi serangan jamur tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi dan mempelajari ekspresi gen kitinase dan β -1,3 glukonase pada tanaman kopi arabika yang tahan dan rentan terhadap jamur *H. Vastatrix*, sebagai upaya untuk memahami mekanisme ketahanan tanaman kopi terhadap jamur patogen tersebut.

Bahan dan Metode

Bahan tanaman, plasmid, galur bakteri dan uredospora H. Vastatrix

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun muda kopi arabika varietas S1934 dan BLP10 yang

telah berkembang penuh. Kedua varietas kopi dan stok uredospora *H. Vastatrix* diperoleh dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao, Jember. Vektor kloning yang digunakan adalah pGEM-T (Promega), sedangkan sebagai inang untuk kloningnya digunakan *E. Coli* DH5 α .

Bioesai H. Vastatrix

Stok uredospora *H. Vastatrix* matang disuspensikan dalam akuades (1mg/mL) sampai homogen. Daun muda yang akan diuji diletakkan pada bak plastik yang diberi busa basah dan ditutup kaca bening untuk menjaga kelembaban. Inokulasi *H. Vastatrix* dilakukan secara tetes menggunakan mikropipet (10 μ L/tetes) hingga permukaan daun bagian bawah penuh dengan tetesan uredospora. Untuk kontrol, tetesan uredospora diganti dengan akuades. Inkubasi pertama dilakukan pada ruang kultur gelap bersuhu 21°C selama 48 jam. Setelah itu daun dikemas dalam kotak plastik bening berisi busa basah dan dipindahkan dari lokasi lapang ke laboratorium selama 32 jam pada suhu kamar. Inkubasi berikutnya dilakukan pada ruang kultur dengan 12 jam pencahayaan dan suhu 21 °C pada malam hari dan 25 °C pada siang hari. Contoh daun yang diinokulasi dan tidak diinokulasi dari masing-masing varietas diambil untuk isolasi RNA pada hari ke-6 dan hari ke-9 setelah inokulasi, sedang sisanya diamati sampai hari ke-30.

Isolasi RNA total

Isolasi RNA total dari daun yang diinokulasi uredospora *H. Vastatrix* dan kontrol negatifnya dilakukan pada hari ke-6 dan ke-9 setelah perlakuan, menggunakan

metode Chang *et al.* (1993) dengan sedikit modifikasi. Daun kopi digerus dalam lumpang porselen bersama nitrogen cair dan polivinilpolipirolidon (PVPP), kemudian dihomogenisasi dengan bufer ekstraksi (CTAB 2 %; EDTA pH 8 20 mM; Tris-HCl pH 8 100mM; NaCl 1,26 M) pada suhu 65°C selama 30 menit. Setelah didinginkan pada suhu kamar, campuran diekstraksi dua kali dengan 1 volume kloroform: isoamilalkohol (24:1) dan disentrifugasi pada 12.900 x g, 4°C selama 15 menit. Ke dalam supernatan (fase atas) ditambahkan ¼ volume LiCl 10M. Setelah diendapkan semalam pada suhu -4°C, campuran disentrifugasi pada 10.600 x g selama 30 menit. Endapan RNA dilarutkan dalam 500 µL SSTE dan diekstraksi kembali dengan 1 volume kloroform : isoamilalkohol (24:1). Setelah sentrifugasi, supernatan dipisahkan, ditambah 2 volume etanol dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu -20°C. Campuran disentrifugasi kembali 15 menit pada 10.600 x g dengan suhu 4°C. Endapan RNA dikeringkan, disuspensikan dalam 30 µL DEPC treated water dan disimpan dalam freezer (-20 °C). RNA hasil isolasi dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif dengan elektroforesis pada gel agarosa 1% dan dengan mengukur absorbansinya pada λ260, λ230 dan λ280.

Perancangan primer β-1,3-glukanase dan kitinase

Primer spesifik dirancang untuk amplifikasi daerah konservatif gen kitinase dan β-1,3-glukanase melalui tahapan sebagai berikut. Pertama, dilakukan inventarisasi sekuen kitinase dan glukanase dari protein atau mRNA (*coding sequence*) pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> atau [\[www.ebi.ac.uk\]\(http://www.ebi.ac.uk\). Koleksi sekuen terpilih diujarkan \(*alignment*\) untuk mendapatkan daerah yang tinggi homologi sekuennya \(*conserved region*\) menggunakan program *Bioedit ClustalW* \(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>\). Daerah dengan homologi tinggi ini digunakan sebagai acuan perancangan primer menggunakan program *Primer3* \(<http://www.biotools.umassmed.edu/>\) dengan mempertimbangkan persyaratan primer yang ideal.](http://</p></div><div data-bbox=)

Ekspresi β-1,3 glukanase dan kitinase

Untuk mempelajari ekspresi β-1,3 glukanase dan kitinase pada kopi arabika S1934 dan BLP10 yang diinokulasi dan tidak diinokulasi (kontrol) dilakukan RT-PCR dengan templat RNA total. RT-PCR dilakukan menggunakan primer spesifik yang telah dirancang sebelumnya dengan kit *Access RT-PCR Synthesis Kit* (Promega). Program PCR untuk kitinase adalah satu siklus inisiasi (94 °C, 4 menit) dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari: denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit; *annealing* (penempelan) pada suhu 51°C, selama 1 menit; pemanjangan pada suhu 72°C selama 3 menit; serta 5 menit ekstensi pada suhu 72°C. Sedangkan untuk β-1,3 glukanase, dilakukan program PCR yang sama kecuali suhu penempelan 58 °C. Hasil PCR diverifikasi dengan elektroforesis pada gel agarosa 1 %.

Sekuensing dan analisis DNA produk RT-PCR

Untuk mengkonfirmasi kebenaran fragmen DNA hasil RT-PCR masing-masing sebagai daerah konservatif gen penyandi β-1,3 glukanase dan kitinase, fragmen DNA tersebut diisolasi dan dimurnikan dari gel,

Ekspresi β -1,3 glukonase dan kitinase pada tanaman kopi arabika...

kemudian disekuon menggunakan primer yang sama dengan yang digunakan dalam RT-PCR. Sekuensing dilakukan di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman di Jakarta. Sekuen yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan program BlastX.

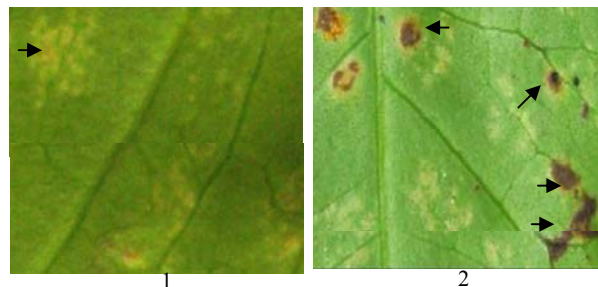
Hasil dan Pembahasan

Bioesai H. vastatrix

Hasil bioesai menunjukkan bahwa pada varietas BLP10 gejala infeksi mulai teramati pada hari ke-12 setelah inokulasi, berupa klorosis (bercak-bercak kuning) pada sebagian daun, tetapi tidak terjadi pada S1934. Pada hari ke-14, gejala penyakit yang ringan teramati pada daun kopi S 1934, sedangkan BLP10 memperlihatkan gejala lanjut penyakit yang ditunjukkan dengan terjadinya nekrosis (sel-sel mati) pada sebagian permukaan daun (Gambar 1). Setelah hari ke-20 satu persatu daun layu sehingga tidak dapat teramati perkembangan penyakit selanjutnya, kecuali pada tiga daun yang tersisa. Pada hari ke-30 nekrosis dan

klorosis terjadi secara merata pada permukaan daun BLP10, salah satunya bahkan menunjukkan stadium lanjut dengan pembentukan uredospora yang berupa butiran-butiran kecil berwarna jingga pada beberapa bagian daun yang sebelumnya klorosis.

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa meskipun persentase daun yang terinfeksi untuk kedua varietas hampir sama, yaitu 71,3 % pada S1934 dan 83,3 % pada BLP10, namun kondisi gejala penyakit yang ditimbulkannya sangat berbeda. Intensitas/ jumlah bercak pada daun S 1934 sangat rendah yaitu rata-rata hanya tiga bercak per daun, sebaliknya bercak yang terjadi pada BLP10 jauh lebih tinggi, yaitu 39,5 per daun (Tabel 1). Oleh karena itu sesuai ketentuan Eskes & Toma-Braghini (1981) kopi arabika S1934 tergolong varietas tahan, sedangkan BLP10 termasuk dalam kategori agak rentan. Hasil percobaan ini mengkonfirmasi hasil sebelumnya bahwa kopi arabika S1934 termasuk varietas tahan sedangkan BLP10 termasuk rentan (Mawardi, 1996; Siswanto, 2002). Sehingga penggunaan kedua varietas



Gambar 1. Gejala bercak pada daun kopi S 1934 (1) dan BLP 10 (2), 14 hari setelah inokulasi dengan *H. vastatrix*.

Figure 1. *Lesion symptom on leaves of S1934 (1) and BLP 10 (2), 14 days after inoculation with H. vastatrix.*

Tabel 1. Hasil bioesai daun kopi arabika varietas S1934 dan BLP10 dengan dan tanpa inokulasi (kontrol) *H. vastatrix* pada 20 hari setelah inokulasi.

Table 1. Bioassay results of arabica coffee S1934 and BLP10, inoculated and uninoculated with *H. vastatrix*, 20 days after inoculation.

Perlakuan (<i>Treatment</i>)	Persentase infeksi <i>Percent of infection</i>	Rata-rata jumlah bercak/daun <i>Average of lesion number/leaf</i>	Tingkat ketahanan <i>Level of resistance</i>
S 1934 kontrol (<i>control</i>)	0	0	-
BLP 10 kontrol (<i>control</i>)	0	0	-
S 1934 inokulasi (<i>inoculation</i>)	5 (71,3 %)	3	1 – 3 tahan (<i>resistant</i>)
BLP 10 inokulasi (<i>inoculation</i>)	5 (83,3 %)	39,5	6 - 7 agak rentan <i>susceptible</i>

tersebut untuk mempelajari peran kitinase dan β -1,3 glukonase dalam mekanisme ketahanan terhadap karat daun merupakan pilihan yang tepat.

Eksresi β -1,3-glukanase dan kitinase

Kualitas RNA yang tinggi merupakan salah satu syarat penting dalam studi ekspresi maupun kloning suatu gen. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa kualitas dan kuantitas RNA yang dihasilkan cukup tinggi, yang ditunjukkan oleh integritas RNA ribosom yaitu rRNA 28S dan rRNA 18S (Gambar 2A). Hasil pengukuran spektrofotometer RNA yang dihasilkan juga menunjukkan kuantitas dan kemurnian yang memadai untuk penelitian selanjutnya (data tidak dicantumkan).

Perancangan primer menggunakan 35 sumber protein dan ORF (*open reading frame*) β -1,3 glukonase berbagai tanaman, dan dari 31 sumber enzim dan ORF (*open reading frame*) kitinase berbagai tanaman

menghasilkan pasangan primer untuk β -1,3 glukonase (β glu-F dan β glu-R) dan kitinase (χ -F dan χ -R) dengan susunan nukleotida sebagaimana disajikan pada Tabel 2. Pasangan primer digunakan dalam RT-PCR untuk mempelajari ekspresi kedua gen tersebut pada kedua varietas yang diinokulasi dan yang tanpa inokulasi. Hasil RT-PCR untuk β -1,3 glukonase dan kitinase disajikan pada Gambar 2.

Dari Gambar 2 nampak bahwa β -1,3 glukonase terekspresi pada ke-4 sampel yang dianalisis, yaitu baik pada varietas S1934 yang diinokulasi dan yang tidak diinokulasi maupun pada BLP10 yang diinokulasi dan yang tidak diinokulasi. Hal ini menunjukkan bahwa β -1,3 glukonase diekspresikan secara konstitutif pada kedua varietas kopi arabika, baik tanaman yang tahan maupun tanaman yang rentan. Namun demikian, dari Gambar 2A terlihat bahwa akumulasi transkrip RNA pada tanaman yang tahan lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman yang rentan. Perbedaan akumulasi transkrip RNA juga

Ekspresi β -1,3 glukonase dan kitinase pada tanaman kopi arabika...

Tabel 2. Sekuen nukleotida primer yang digunakan untuk amplifikasi daerah konservatif *GLU* dan *CHI*.

Table 2. Nucleotide sequences of primers used for amplification of conserved region of *GLU* and *CHI*.

Enzim <i>Enzyme</i>	Kode primer <i>Primer code</i>	Sekuen Nukleotida <i>Nucleotide sequence</i>
β -1,3 glukonase <i>β-1,3 glucanase</i>	β glu-F	5'-GCCAACCIGTCTCCGATACA-3'
	β glu-R	5'-GCAGTTGGAAATGAAGTCAG-3'
kitinase <i>chitinase</i>	chi-F	5'-GGCCAGACACCAGAATTGA-3'
	chi-R	5'-TCCACITTIGATATGAAAGTC-3'

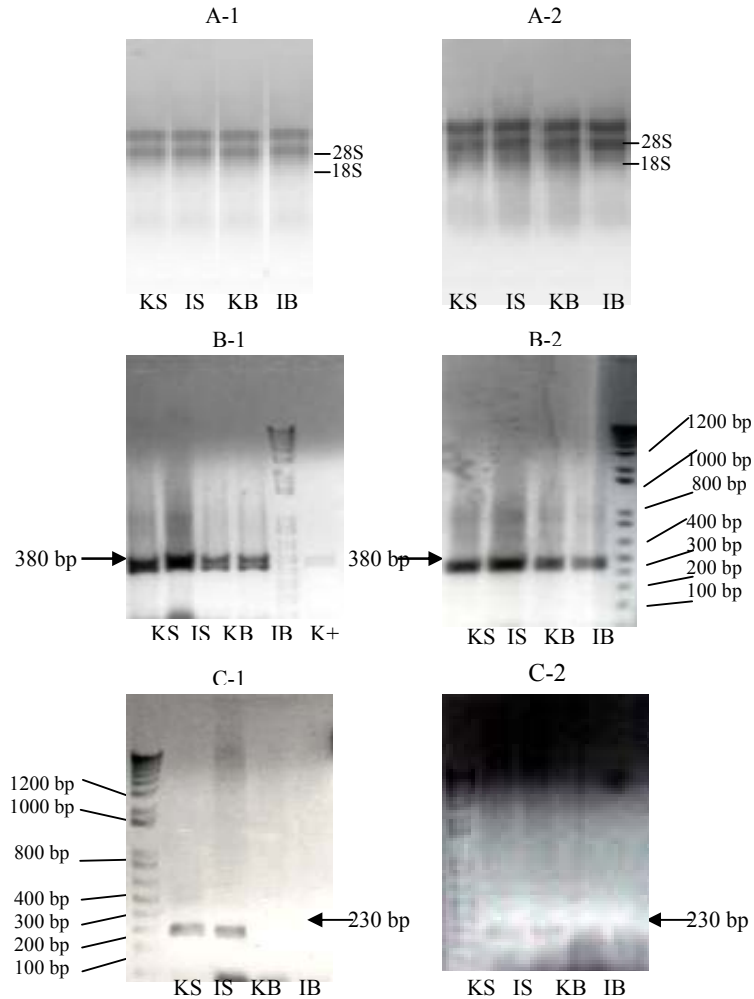
nampak antara tanaman yang diinokulasi dibandingkan dengan yang tidak diinokulasi, namun perbedaannya tidak sebesar perbedaan antara tanaman tahan dan tidak tahan. Di samping itu juga nampak bahwa pada hari ke-6 setelah inokulasi akumulasi transkrip sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan pada hari ke-9, baik pada S1934 maupun pada BLP10 dengan dan tanpa inokulasi.

Hasil penelitian ini sejalan dengan beberapa laporan sebelumnya. Kalus jagung dari tanaman tahan dan rentan baik yang diinokulasi *Aspergillus flavus* maupun yang tidak diinokulasi memproduksi β -1,3 glukonase. Namun β -1,3 glukonase yang dihasilkan kalus dari tanaman yang diinokulasi lebih tinggi dibandingkan yang tanpa inokulasi. Tanaman tahan yang diinokulasi memproduksi glukonase 8-10 kali lebih tinggi dibandingkan tanaman rentan (Lozovaya *et al.*, 1998). Beberapa tanaman lain juga menunjukkan respons kenaikan produksi glukonase apabila diinfeksi fungi, bakteri atau virus patogen (Leubner-Metzger & Meins, 1999; Neuhaus, 1999; van Loon, 1999).

Sebagaimana glukonase, amplifikasi fragmen DNA kitinase dengan primer spesifik kitinase (chiF dan chiR) juga

bersifat spesifik karena hanya menghasilkan satu amplicon berukuran sekitar 230 pb pada suhu penempelan 51°C, meskipun tidak setebal amplicon β -1,3 glukonase. Sehingga pasangan primer tersebut dapat digunakan untuk mempelajari ekspresi kitinase pada tanaman tahan dan rentan. Namun, berbeda dengan glukonase, amplifikasi kitinase hanya terjadi pada tanaman tahan S 1934, baik kontrol yang tidak diinokulasi, maupun yang diinokulasi *H. vastatrix* (Gambar 2B). Pada tanaman rentan BLP10 baik yang diinokulasi maupun yang tidak diinokulasi tidak dihasilkan amplicon. Hasil ini mengindikasikan bahwa kitinase berperan penting dalam ketahanan tanaman terhadap penyakit. Dari Gambar 2C juga nampak bahwa akumulasi transkrip RNA relatif sama antara tanaman tahan yang diinokulasi maupun yang tidak diinokulasi yang menunjukkan bahwa enzim tersebut diekspresikan secara konstitutif.

Berbeda dengan hasil tersebut, Siswanto (2002) melaporkan bahwa aktivitas kitinase pada kopi Arabika varietas tahan, BP 426 yang diinokulasi *H. vastatrix* adalah 10,51 dan 8,71, masing-masing pada hari ke 14 dan ke 16 setelah inokulasi, lebih tinggi dibandingkan kontrolnya yang tidak diinokulasi, yaitu 5,37 unit pada hari ke-14



Gambar 2. Elektroforesis RNA yang digunakan sebagai templat (A), produk RT-PCR untuk gen β -1,3 glukonase (B) dan gen kitinase (C). Panel 1 (A-1, B-1 dan C-1) RNA diisolasi pada hari ke-6 setelah inokulasi; Panel 2 (A-2, B-2 dan C-2) RNA diisolasi pada hari ke-9 setelah inokulasi. (KS: S1934 kontrol; IS: S1934 yang diinokulasi *H. vastatrix*; KB : BLP10 kontrol dan IB: BLP10 yang diinokulasi *H. vastatrix*).

Figure 2. Electrophoresis of total RNA used as template (A), RT-PCR product for β -1,3 glucanase (B) and chitinase (C). Panel 1 (A-1, B-1, C-1) RNA was isolated at 6 days after inoculation. Panel 2 (A-2, B-2 and C-2) RNA was isolated at 9 days after inoculation. (KS: S1934 control; IS: S1934 inoculated with *H. vastatrix*; KB : BLP10 control and IB: BLP10 inoculated with *H. vastatrix*).

Ekspresi β -1,3 glukukanase dan kitinase pada tanaman kopi arabika...

dan 7,26 unit pada hari ke-16. Percobaan inokulasi berbagai patogen pada timun juga menghasilkan peningkatan ekspresi kitinase. Timun yang diinokulasi dengan *Colletotrichum lagenarium*, *Pseudomonas lachrymans*, *P. cubensis* dan *Tobacco necrosis virus* menunjukkan peningkatan aktivitas kitinase masing-masing menjadi 8,4; 15,1; 24,6 dan 134 unit dibandingkan kontrol yang hanya menghasilkan aktivitas kitinase sebesar 0,15 unit (Metraux & Boller, 1986). Peningkatan ekspresi kedua enzim tersebut juga dilaporkan pada tanaman padi yang diinfeksi *Rhizoctonia solani* (Bera & Purkayastha, 1999) dan tembakau varietas Tn86 yang diinokulasi *Peronospora tabacina* (Ye *et al.*, 1990).

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa penghambatan penyakit yang optimal dicapai hanya apabila glukukanase dan kitinase aktif secara bersama-sama. Kombinasi dua protein tersebut mampu menghambat beberapa jamur patogen, di antaranya *Alternaria solani*, *Trichoderma viride* dan *Phytophthora infestans* pada tomat (Lawrence *et al.*, 1996; Anfoka & Buchenauer, 1997) dan *Peronospora tabacina*, *Peronospora parasitica* dan *Fusarium solani* pada tembakau (Sela-Buurlage, 1993; Prell & Day, 2001; Falcon *et al.*, 2002).

Interaksi patogen-inang dapat terjadi dalam bentuk yang berbeda. Pada beberapa varietas kakao rentan terjadi model interaksi yang sebaliknya. β -1,3 glukukanase dan kitinase dihasilkan secara konstitutif oleh tanaman, tetapi inokulasi patogen *P. megakarya* dan *Onchobasidium theobromae* pada kakao justru menurunkan ekspresi glukukanase dan kitinase (Rosmin *et al.*, 2000; Omokolo *et al.*, 2003). Hasil

yang agak berbeda terjadi pada inokulasi *Fusarium moniliforme* terhadap hipokotil *Avicennia marina*. Ternyata inokulasi tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap ekspresi glukukanase dan kitinase yang dihasilkan secara konstitutif oleh tanaman (Vasselina *et al.*, 2003).

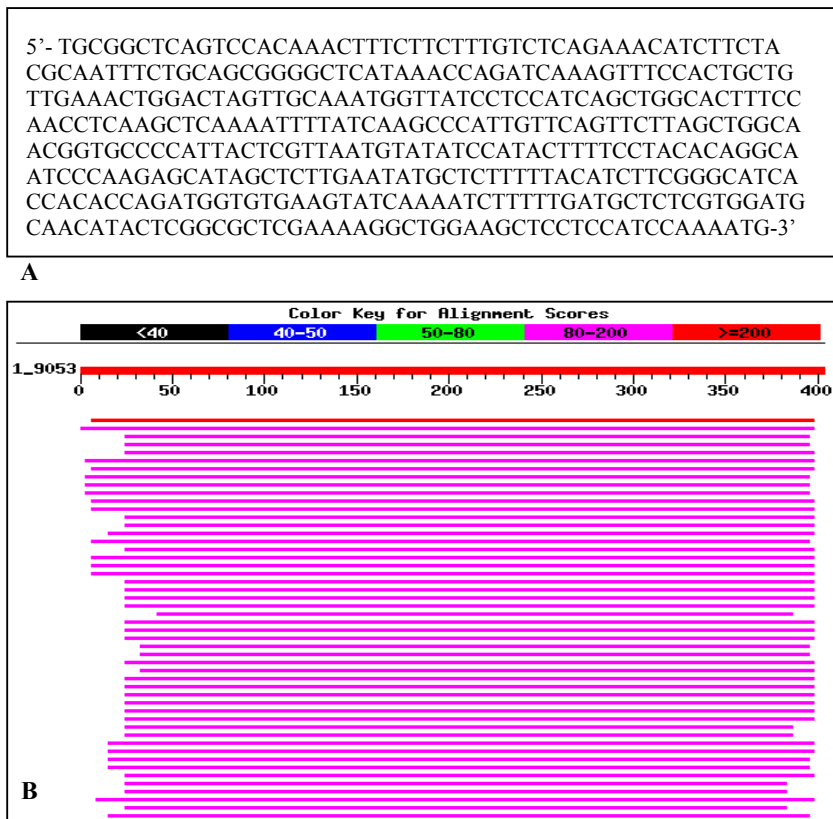
Perbedaan ekspresi pada beberapa tanaman disebabkan oleh perbedaan model interaksi antara patogen dengan inang. Pada interaksi yang tidak sesuai inang akan menghasilkan lebih banyak β -1,3 glukukanase dan kitinase dibandingkan dengan interaksi yang sesuai. Kesesuaian interaksi patogen – inang menyebabkan stagnasi atau penurunan produksi β -1,3 glukukanase dan kitinase sehingga tanaman menjadi lebih rentan terhadap patogen (Cordero *et al.*, 1994; Caruso *et al.*, 1999).

Ketahanan S1934 terhadap *H. vastatrix* pada percobaan ini mungkin terjadi karena varietas tersebut mengekspresikan sekaligus protein glukukanase dan kitinase. Kombinasi kedua protein ini sangat diperlukan untuk mendegradasi ujung hifa dan menahan serangan jamur. Penelitian histologi oleh Silva *et al.* (1999) menunjukkan bahwa komponen struktural dinding sel *H. vastatrix* terdiri dari β -1,3 glukukanase yang terkonsentrasi pada dinding bagian luar dan kitin yang terkonsentrasi pada bagian dalam. Struktur ini mendominasi hifa dan haustorium yang sedang berpenetrasi pada jaringan tanaman kopi arabika. Hal ini mengakibatkan keberadaan satu jenis protein saja yaitu β -1,3 glukukanase tidak optimal mengatasi serangan patogen, karena dinding sel *H. vastatrix* hanya tertekan pada bagian luarnya.

Sekuensing dan analisis DNA fragmen β -1,3-glukanase dan kitinase

Untuk mengkonfirmasi bahwa produk RT-PCR masing-masing merupakan daerah konservatif gen β -1,3-glukanase dan kitinase, kedua ampikon tersebut diisolasi dan diseku. Sekuen yang dihasilkan kemudian dianalisis homologinya dengan

gen yang sama dari berbagai tanaman lain menggunakan program BlastX. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa produk RT-PCR dengan pasangan primer gluF dan β gluR memiliki homologi tinggi dengan protein β -1,3 glukanase dari berbagai tanaman dengan skor tertinggi 239 bits dan *E-value* $1e-62$ (Gambar 3 dan Tabel 3).



Gambar 3. Sekuen DNA produk RT-PCR untuk β -1,3 glukanase (A) dan hasil analisis BlastX (B).
Figure 3. DNA sequence of RT-PCR product for β -1,3 glukanase (A) and results of BlastX analysis (B).

Ekspresi β -1,3 glukukanase dan kitinase pada tanaman kopi arabika...

Tabel 3. Sepuluh hasil penajajaran tertinggi dari distribusi BlastX β -1,3 glukukanase berdasarkan skor bit dan *E-value*.

Table 3. The ten highest alignment of the BlastX glucanase distribution based on the score(bit) and *E-value*.

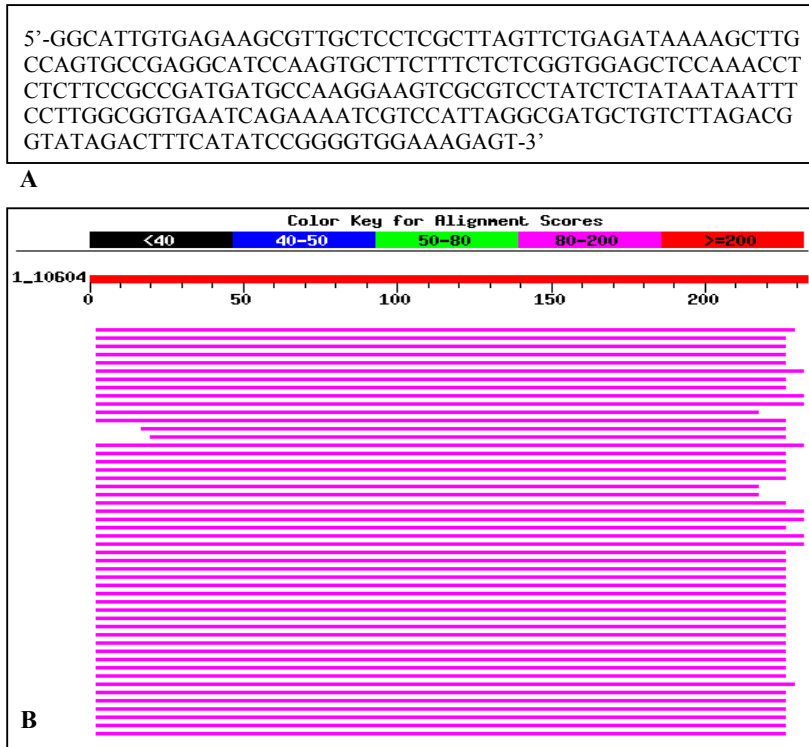
No.	Enzim <i>Enzyme</i>	Sumber <i>Source</i>	Skor (bit) <i>Score (bit)</i>	<i>E-value</i>
1.	β -1,3-glukanase (<i>glucanase</i>)	<i>Coffea arabica x Coffea canephora</i>	<u>239</u>	1e-62
2.	β -1,3-glukanase (<i>glucanase</i>)	<i>Olea europaea</i>	<u>174</u>	5e-43
3.	β -1,3-glukanase (<i>glucanase</i>)	<i>Musa acuminata</i>	<u>165</u>	4e-40
4.	β -1,3-glukanase (<i>glucanase</i>)	<i>Musa acuminata</i>	<u>165</u>	4e-40
5.	β -1,3-glukanase (<i>glucanase</i>)	<i>Vitis vinifera</i>	<u>154</u>	7e-37
6.	β -1,3-glukanase (<i>glucanase</i>)	<i>Vitis riparia</i>	<u>145</u>	4e-34
7.	endo- β -1,3-glukanase (<i>glucanase</i>) PR2	<i>Malus x domestica</i>	<u>145</u>	4e-34
8.	β -1,3-glukanase (<i>glucanase</i>)	<i>Fragaria x ananassa</i>	<u>144</u>	7e-34
9.	β -1,3-endoglukanase (<i>endoglucanase</i>)	<i>Fragaria x ananassa</i>	<u>144</u>	7e-34
10.	endo- β -1,3-glukanase (<i>glucanase</i>)	<i>Fragaria x ananassa</i>	<u>144</u>	9e-34

Menurut Claverie & Notredame (2003) suatu sikuen DNA dinilai memiliki homologi tinggi apabila memiliki *E-value* (nilai peluang) maksimal e^{-4} atau mencapai skor minimal 50 bits. Makin rendah *E-value* dan makin tinggi skor, makin signifikan dan makin tinggi homologi protein atau sekuen nukleotida yang dianalisis. Seluruh distribusi yang berupa garis lurus menunjukkan bahwa sumber sekuen merupakan sekuen ekson, yaitu produk pasca transkripsi yang akan ditranslasi menjadi protein dalam sel. Garis lurus pada distribusi ini juga memberikan kepastian bahwa produk PCR pada percobaan ini benar-benar berasal dari amplifikasi mRNA. Hampir seluruh dari ke-101 alignment yang dihasilkan merupakan protein glukukanase.

Penajajaran tertinggi yaitu *C. arabica x C. canephora* memiliki *E-value* $1e^{-42}$, identitas 92% dan gap 0%. Hasil analisis

juga menunjukkan bahwa fragmen cDNA glukukanase yang dihasilkan pada percobaan memiliki persamaan fungsional dengan glukukanase pada tanaman atau organisme lain pada umumnya. Urutan nukleotida hasil sekuensing fragmen cDNA produk RT-PCR dengan primer chiF dan chiR daun kopi Arabika S 1934 yang diinokulasi oleh *H. vastatrix* dan hasil analisisnya menggunakan program BlastX disajikan pada Gambar 4.

Ukuran fragmen cDNA yang dihasilkan dari RT-PCR kitinase tidak sebesar glukukanase namun hasil analisis BlastX menunjukkan homologi tinggi dengan skor tertinggi 141 bit dan *E-value* sebesar $5e^{-33}$. Hasil analisis menunjukkan bahwa fragmen cDNA kitinase pada percobaan ini mempunyai persamaan fungsional dengan kitinase pada *database*. Penajajaran tertinggi berasal dari spesies yang sama yaitu *C. arabica* dengan identitas 92% dan gap 1%.



Gambar 4. Sekuen DNA produk RT-PCR untuk kitinase (A) dan hasil analisis BlastX (B).

Figure 4. DNA sequence of RT-PCR product for chitinase (A) and results of BlastX analysis (B).

Sebagaimana hasil BlastX glukanase, pada seluruh sumber penjajaran kitinase juga tidak terkandung sekuen intron. Dari ke-100 hasil penjajaran diperoleh homologi yang konsisten yaitu kitinase, dengan mayoritas merupakan kitinase kelas III (data tidak dicantumkan). Hampir tidak terjadi variasi protein lain pada seluruh distribusi. Beberapa produk sekuen yang memiliki kesamaan antara fragmen cDNA

dengan kitinase tanaman lain pada 10 penjajaran tertinggi disajikan pada Tabel 4. Homologi tertinggi dari hasil analisis BlastX terdapat pada sumber gen *C. arabica*, hal ini disebabkan selain menggunakan 31 sumber protein dan ORF glukanase, fragmen DNA kitinase dari kopi juga digunakan untuk memastikan daerah konservatif yang diharapkan diperoleh pada disain primer. Hingga saat ini belum ada data *genebank*

Ekspresi β -1,3 glukonase dan kitinase pada tanaman kopi arabika...

Tabel 4. Sepuluh hasil penjabaran tertinggi dari distribusi BlastX kitinase berdasarkan skor (bit) dan *E-value*.

Table 4. List of 10 highest alignment of chitinase BlastX distribution based on the score(bit) and E-value.

No.	Enzim <i>Enzyme</i>	Sumber <i>Source</i>	Skor (bit) <i>Score (bit)</i>	<i>E-value</i>
1.	Kitinase homolog (<i>Chitinase homologue</i>)	<i>C. arabica</i>	<u>141</u>	5e-33
2.	Kelas/clas III kitinase (<i>chitinase</i>)	<i>Malus x domestica</i>	<u>102</u>	3e-21
3.	Kelas/clas III kitinase (<i>chitinase</i>)	<i>Oryza sativa</i> (japonica)	<u>101</u>	7e-21
4.	Kelas/clas III kitinase (<i>chitinase</i>)	<i>Nicotiana tabacum</i>	<u>100</u>	1e-20
5.	Kelas/clas III kitinase (<i>chitinase</i>)	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	<u>100</u>	2e-20
6.	Kelas/clas III kitinase (<i>chitinase</i>)	<i>Medicago truncatula</i>	<u>99</u>	3e-20
7.	Kitinase Hevamine (<i>Chitinase Hevamine</i>)	<i>Hevea brasiliensis</i>	<u>97</u>	1e-19
8.	Kelas/clas III kitinase (<i>chitinase</i>)	<i>Vigna unguiculata</i>	<u>97</u>	2e-19
9.	Kelas/clas III kitinase (<i>chitinase</i>)	<i>Medicago truncatula</i>	96	2e-19
10	Kitinase (<i>chitinase</i>)	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	96	4e-19

mengenai ORF kitinase kopi. Hanya ada satu data kitinase homolog dari *genbank* yang berukuran 256 bp, sehingga pada saat disain primer digunakan ORF dari *Hevea brasiliensis* sebagai sumber utama untuk acuan.

Kesimpulan

Pasangan primer β glu-F/ β glu-R dan chi-F/chi-R dapat digunakan untuk mendeteksi secara spesifik gen penyandi β -1,3-glukanase dan kitinase dan mempelajari ekspresinya pada daun kopi Arabika S1934 dan BLP10, masing-masing tahan dan rentan terhadap penyakit karat daun. Gen penyandi β -1,3 glukanase diekspresikan pada kedua varietas baik yang diinokulasi maupun yang

tidak diinokulasi karat daun. Sedangkan ekspresi kitinase hanya dideteksi pada varietas S1934 yang diinokulasi dan yang tanpa inokulasi, yang menunjukkan bahwa kitinase memegang peranan penting dalam ketahanan kopi Arabika terhadap patogen *H. vastatrix* penyebab karat daun. Peranan β -1,3 glukanase diduga bersifat kuantitatif karena terdeteksi pada kedua varietas.

Karakterisasi parsial hasil sekuensing fragmen cDNA *GLU* dan *CHI* mengindikasikan homologi yang tinggi dan menunjukkan kesamaan fungsional yang signifikan antara fragmen hasil RT-PCR tersebut dengan protein β -1,3 glukanase dan kitinase pada umumnya. Kedua fragmen telah diklon untuk keperluan penelitian lebih lanjut.

Daftar Pustaka

- Anfoka, G. & H. Buchenauer (1997). Systemic acquired resistance in tomato against *Phytophthora infestans* by pre-inoculation with tobacco necrosis virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **46**, 45-59.
- Bera, S. & R. P. Purkayastha (1999). Multicomponent coordinated defence response of rice to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight. <http://www.ias.ac.in/currsci/may25/articles29.htm>.
- Caruso, C., G. Chisoli, C. Caporale, L. Loenardi, L. Bertini, P. Magro & V. Buonocore (1999). Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Sci.*, **140**, 87-97.
- Chang, S., J. Puryear & J. Cairney (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **11**, 98 – 100.
- Claverie, J. & C. Notredame (2003). *Bioinformatics for Dummies*. New York, Wiley Publishing. p. 215-238.
- Cordero, M.J., D. Raventos, B.S. Segundo (1994). Differential expression and induction of chitinases and β -1,3-glucanases in response to fungal infection during germination of maize seeds. *Mol. Plant Microb. Interac.*, **7**, 23-31.
- Falcon, A.B., M. A. Ramírez, R. M. M. Hernández (2002). Chitosan and its hydrolyzate at tobacco-*Phytophthora parasitica* interaction. [http://www.inca.edu.cu/otrasweb/revista/CT23\(1\), %202002-INTERNET. htm](http://www.inca.edu.cu/otrasweb/revista/CT23(1),%202002-INTERNET.htm).
- Giannakis, C., C.S. Bucheli, K.G.M. Skene, S.P. Robinson & N.S. Scott (1998). Chitinase and β -1,3-glucanase in grapevine leaves. *Aus. J. Grape Wine Res.*, **4**, 14-22.
- Graham, L.S & M.B. Sticklen (1993). Plant chitinase. *Can. J. Bot.*, **72**, 1057 – 1083.
- Kushalappa, A.C. (1989). Introduction. In Kushalappa, A.C. & Eskes, A.B. (eds). *Coffee rust: epidemiology, resistance, and management*. Boca Raton, CRC Press. p. 13-80.
- Lawrence, C.B., M.H.A.J. Joosten & S. Tuzun (1996). Differential induction of Pathogenesis-related protein in tomato by *Alternaria solani* and the association of basic chitinase isozyme with resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **48**, 361-377.
- Leubner-Metzger, G. & F. Meins (1999). Functions and regulation of plant β -1,3-glucosida (PR 2) In Datta SK, Muthukrishnan S (eds). *Pathogenesis-related protein in Plant*. Boca Raton, CRC Press. p. 49-76.
- Lozovaya, V.V., A. Waranyuwat & J.M. Widholm (1998). β -1,3-glucosida and resistance to *Aspergillus flavus* infection in maize. *Crop Sci.*, **38**, 1255-1260.
- Mawardi, S. (1996). Kajian genetika ketahanan tak lengkap kopi Arabika terhadap penyakit karat daun (*Hemileia vastatrix* B. et Br) di Indonesia.

Ekspresi β -1,3 glukanasase dan kitinase pada tanaman kopi arabika...

- Yogyakarta, Fakultas Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada. 219 p. Desertasi.
- Metraux, J.P. & T. Boller (1986). Local and systemic induction of chitinase in cucumber plants in response to viral, bacterial and fungal infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **28**, 161-169.
- Neuhaus, J-M. (1999). Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). In Datta SK, Muthukrishnan S (eds). *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. Boca Raton, CRC Press. p. 77-105.
- Omokolo, N.D., D.J. Nankeu, N. Niemenak & T. Boidjeko (2003). Variation of β -1,3-glucanases, chitinase and polyphenoloxidase activities in cacao pods upon *Phytophthora megakarya* inoculation. *African Crop Sci. J.*, **11**, 97-106.
- Prell, H.H. & P.R. Day (2001). *Plant Fungal Pathogen Interaction a Classical and Molecular View*. Berlin, Springer Verlag.
- Rosmin, K., M. Marziah., M. Radzali & S. Abdullah (2000). Peroxidase, polyphenoloxidase, chitinase and β -1,3-glucanase in relation to vascular streak dieback resistance in *Theobroma cacao*. In *Proceedings of the 13th International Cocoa Research Conference*, 9-14 October, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia.
- Sambrook, J., D. Clapham & S.V. Arnold (1989). *Molecular Cloning II: A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 553p.
- Sela-Buurlage, M.B. (1993). Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol.*, **101**, 857-863.
- Silva, M.C., M. Nicole, L. Rijo, J.P. Geiger & C.J.Jr. Rodrigues (1999). Cytochemical aspect of the plant-rust fungus interface during the compatible interaction *Coffea arabica* (cv. Caturra) - *Hemileia vastatrix* (race III). *Int. J. Plant Sci.*, **160**, 79-91.
- Siswanto (2002) *Perakitan tanaman transgenic kopi Arabika tahan terhadap penyakit karat daun*. Laporan Penelitian RUT VII bidang Bioteknologi. Jakarta, Kementrian Riset dan Teknologi RI. 73 p.
- van Loon L.C. (1999). Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In Datta SK, Muthukrishnan S (eds). *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. Boca Raton, CRC Press. p. 1-19.
- Vasselina, S., Anguelova-Merhar, C. Calistru & P. Berjak (2003). A Study of Some Biochemical and Histopathological Responses of Wet-stored Recalcitrant Seeds of *Avicennia marina* Infected by *Fusarium moniliforme*. *Annals of Bot.*, **92**, 401-408.
- Ye, X.S., S.Q Pan & J. Kuć (1990). Association of PR-protein and activities of peroxidase, β -1,3-glucanases and chitinase with systemic induced resistance to blue mould of tobacco but not to systemic tobacco mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **36**, 523-536.