

KONSTRUKSI PUSTAKA cDNA DAN ANALISIS EKSPRESI GEN PADA KLON KARET RESISTEN TERHADAP PENYAKIT GUGUR DAUN *Corynespora cassiicola*

Hajrial Aswidinnoor¹⁾

Antonius Suwanto²⁾, Nurhaimi-Haris²⁾, Agus Purwantara²⁾

PENDAHULUAN

Penyakit gugur daun yang disebabkan oleh fungsi patogen *Corynespora cassiicola* merupakan salah satu penyakit penting pada tanaman karet. Patogen tersebut dapat menurunkan produksi dan kualitas tanaman karet. Pentingnya penyakit ditandai oleh kemampuan patogen untuk menyerang pada berbagai tingkat perkembangan daun dan tingkat perkembangan tanaman. Cara ideal untuk mencegah infeksi patogen adalah menanam klon resisten. Namun kendalanya adalah kemampuan patogen untuk mematahkan resistensi tanaman. Oleh karena itu diperlukan pengetahuan mendasar pada tahap molekuler tentang mekanisme resistensi pada klon resisten.

Studi ekspresi gen yang responsif terhadap infeksi patogen memerlukan ketersediaan pustaka cDNA. Pustaka cDNA merepresentasikan informasi genetik tanaman yang disandikan oleh mRNA pada suatu jaringan atau kondisi tanaman tertentu. Pustaka cDNA juga merupakan bank dari klon-klon cDNA yang mewakili populasi mRNA asli. Isolasi serta karakterisasi cDNA yang merepresentasikan gen tertentu dapat dilakukan melalui penapisan (*screening*) terhadap pustaka cDNA. Berdasarkan potensi pemanfaatan pustaka cDNA suatu rangkaian penelitian selama dua tahun (2003/2004) telah direncanakan, ditujukan untuk memperoleh pustaka cDNA yang dapat memberikan kontribusi dalam penelitian untuk mempelajari ekspresi gen yang berhubungan dengan resistensi klot karet tertentu terhadap *C. cassiicola*. Pada Tahun I (2003) dilakukan konstruksi pustaka cDNA dengan menggunakan daun karet dari klon resisten AVROS 2037 sebagai sumber RNA. Pustaka cDNA yang diperoleh pada tahun pertama akan digunakan dalam kegiatan Tahun II (2004) untuk mengidentifikasi dan mendapatkan serta mengkarakterisasi cDNA / transkrip / gen yang diekspresikan pada klon karet resisten terhadap infeksi *C. cassiicola*.

METODE PENELITIAN

Pustaka cDNA dikonstruksi dari daun klon AVROS 2037. Untuk itu, RNA diisolasi dari daun dan mRNA dimurnikan dari RNA tersebut. Sintesis cDNA utas ganda dilakukan melalui serangkaian tahapan enzimatik yang dimulai dengan meng-*copy* mRNA menjadi cDNA oleh enzim reverse transkriptase. Untuk menyeleksi fragmen cDNA dengan berat molekul 500 bp atau lebih, dilakukan fraksinasi fragmen cDNA. Fragmen yang diperoleh kemudian diklon pada vektor kloning dan ditransformasi ke sel *E. coli*. Disebabkan vektor kloning dan pustaka cDNA dapat diperbanyak, maka hal ini akan menghasilkan pustaka permanen atau bank dari klon cDNA yang merepresentasikan populasi mRNA asli. *Screening* terhadap pustaka cDNA (tahun kedua) untuk mendapatkan transkrip/gen yang berperan dalam resistensi tanaman

¹⁾Ketua Peneliti (Staf Pengajar Departemen Budidaya Pertanian, Faperta-IPB); ²⁾Anggota Peneliti

akan dilakukan melalui hibridisasi dengan probe yang berasal dari cDNA tanaman karet yang ditantang dengan patogen maupun kontrol.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari 9 klon karet dengan tingkat resistensi berbeda terhadap infeksi *C. cassiicola* telah diuji resistensinya secara terkontrol terhadap isolat *C.cassiicola*. Dari pengujian tersebut telah dipilih satu klon resisten, yakni AVROS 2037, untuk digunakan sebagai sumber RNA dalam konstruksi pustaka cDNA. Keberhasilan proses konstruksi cDNA tergantung pada kualitas total RNA. Oleh karena itu metode isolasi sering merupakan titik kritis dalam hal ini.

Dalam rangka mendapatkan RNA dengan kualitas tinggi dan tidak terdegradasi, telah diuji dua macam metode isolasi RNA. Metode SDS akhirnya ditetapkan sebagai metode yang sesuai untuk isolasi RNA dari daun tanaman karet. Aplikasi metode SDS dengan menggunakan daun tanaman dewasa klon AVROS 2037, telah berhasil diperoleh RNA dengan kualitas dan kuantitas tinggi. Sebanyak 0.25 mRNA dapat dimurnikan dari RNA total tersebut dan dengan kualitas baik. Selanjutnya dengan cara transkripsi balik terhadap mRNA menggunakan enzim reverse transcriptase, cDNA dengan kualitas tinggi berhasil diperoleh. Sedangkan fraksinasi fragmen cDNA menggunakan kolom CHROMA SPIN-400 telah berhasil memisahkan fragmen cDNA dengan ukuran 500 bp ke atas. Fragmen tersebut akan diligasikan ke vektor kloning untuk selanjutnya ditransformasi ke *E.coli*. Keberhasilan mendapatkan cDNA utas ganda dari daun tanaman karet menunjukkan bahwa berbagai tahapan kritis telah dapat diatasi. Salah satu tahap kritis adalah mempertahankan RNA dan mRNA terhadap proses degradasi. Kedua molekul tersebut diketahui merupakan campuran kompleks yang dengan mudah terdegradasi yang merepresentasikan proses transkrip dari gen-gen yang sedang aktif pada jaringan atau sel tertentu.

Kloning fragmen cDNA dilakukan menggunakan vektor pGEM[®]-T Easy yang dimodifikasi dengan penambahan utas ganda oligonukleotida sepanjang 38 bp. Oligonukleotida tersebut memiliki situs enzim restriksi *Sfi* I asimetrik sehingga apabila diligasikan ke vektor dan vektor kemudian dipotong dengan enzim *Sfi* I maka vektor tersebut sesuai untuk diligasikan dengan fragmen cDNA yang juga dipotong dengan enzim yang sama. Modifikasi vektor telah berhasil dilaksanakan dan transformasi vektor modifikasi ke bakteri *E.coli* DH5 α kompeten menghasilkan koloni putih yang mengindikasikan bahwa oligo *Sfi* I telah menyisip pada vektor. Ligasi fragmen cDNA pada vektor pGEM[®]-T Easy modifikasi serta transformasinya pada bakteri *E.coli* DH5 α kompeten telah menghasilkan koloni putih dan biru. Dengan menggunakan 150 ng cDNA sisipan dan perbandingan molaritas cDNA sisipan : vektor = 3 : 1 diperoleh 1000 koloni. Dengan demikian pustaka yang dikonstruksi mengandung 2×10^4 cfu/ μ g. PCR terhadap 10 koloni putih menggunakan primer T7 dan SP6 menghasilkan fragmen cDNA sisipan dengan ukuran bervariasi, yaitu 2,3-, 2,8- dan 3,6-bp.

KETERLIBATAN DENGAN PENELITI LINGKUP BADAN LITBANG PERTANIAN :

Dalam kerjasama penelitian ini interaksi antara peneliti dari Perguruan Tinggi dengan peneliti lingkup Badan Litbang Pertanian telah memberikan nilai tambah dalam pencapaian sasaran akhir penelitian. Hal ini terutama disebabkan pengetahuan tentang komoditi tanaman telah dimiliki oleh peneliti lingkup Badan Litbang Pertanian sedangkan perkembangan ilmu pengetahuan dalam materi terkait dimiliki oleh peneliti Perguruan Tinggi sehingga terjadi transfer ilmu dari masing-masing peneliti dalam kerjasama tersebut. Disamping itu, melalui kerjasama penelitian maka penggunaan bahan, peralatan, serta prosedur kerja dapat dimanfaatkan secara maksimal dan efisien sehingga tujuan akhir penelitian dapat dicapai dengan lebih baik.