

# KONSTRUKSI PUSTAKA CDNA DAN ANALISIS EKSPRESI GEN PADA KLON KARET RESISTEN TERHADAP PENYAKIT GUGUR DAUN *CORYNESPORA CASSIICOLA*

Hajrial Aswidinnoor<sup>1)</sup>

Antonius Suwanto<sup>2)</sup>, Nurhaimi Haris<sup>2)</sup>, Agus Purwantara<sup>2)</sup>

## Pendahuluan

Klon-klon tanaman karet yang dibudidayakan saat ini memiliki tingkat resistensi berbeda terhadap infeksi *Corynespora cassiicola*, yaitu suatu fungi patogen penyebab penyakit gugur daun tanaman karet. Beberapa klon seperti BPM 1, BPM 24, AVROS 2037, RRIC 100 dikenal sebagai klon resisten, sedangkan klon lainnya seperti GT 1 dan RRIC 600 diketahui bersifat moderat terhadap patogen tersebut. Klon-klon yang sangat rentan adalah dari seri PPN seperti PPN 2444, PPN 2447, PPN 2058 serta RRIC 103. Adanya perbedaan tingkat resistensi klon memberi peluang untuk mempelajari molekul yang diekspresikan oleh tanaman resisten selama interaksi inang-patogen sehingga menyebabkan tanaman memiliki resistensi terhadap patogen tersebut.

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 disusun yang ditujukan untuk memperoleh pustaka cDNA tanaman karet serta untuk memperoleh kandidat transkrip/gen yang berperan dalam resistensi klon terhadap *C.cassiicola*. Pada tahun I (2003) dilakukan optimasi untuk keseluruhan metode yang digunakan serta konstruksi pustaka cDNA dari daun karet klon resisten AVROS 2037. Pustaka cDNA yang diperoleh digunakan dalam kegiatan Tahun II (2004) untuk mengidentifikasi kandidat cDNA/transkrip/gen yang diekspresikan pada klon karet resisten terhadap infeksi *C.cassiicola*.

## Metode Penelitian

Penelitian ini dimulai dengan melakukan pengujian secara terkontrol tingkat resistensi beberapa klon karet, yang di lapang telah diketahui tingkat resistensinya terhadap *Corynespora cassiicola*. Tahapan ini dilakukan karena tanaman karet dibudidayakan terdiri dari beberapa klon dengan tingkat resistensi berbeda terhadap infeksi *C. Cassiicola*, mulai dari yang sangat resisten, moderat, serta sangat rentan. Disamping itu respon klon karet terhadap isolat *C.cassiicola* tertentu juga bisa berbeda. Pada tahapan ini dapat ditetapkan klon resisten yang akan dijadikan sebagai sumber RNA dalam konstruksi pustaka cDNA. Selanjutnya untuk memunculkan ekspresi molekul yang berperan dalam resistensi dilakukan inokulasi patogen pada daun klon resisten terpilih dan 3 hari setelah inokulasi, daun dipanen untuk digunakan sebagai sumber RNA. Dari RNA total kemudian mRNA dimurnikan.

---

<sup>1)</sup>Ketua Peneliti (Staf Pengajar Departemen BDP, FAPERJA-IPB), <sup>2)</sup>Anggota Peneliti

Sintesis cDNA utas ganda dilakukan melalui serangkaian tahapan reaksi enzimatik yang dimulai dengan meng-copy mRNA menjadi cDNA oleh enzim reverse transkriptase. Sedangkan 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 yang membawa fragmen cDNA terdapat pada bakteri maka dapat diperbanyak sehingga akan menghasilkan pustaka permanen atau bank dari klon cDNA yang merepresentasikan populasi mRNA asli.

Tahapan selanjutnya adalah melakukan skrining terhadap pustaka cDNA untuk mendapatkan transkrip/gen atau bagiannya yang berperan dalam resistensi tanaman karet terhadap *C. cassiicola*. Untuk itu langkah pertama yang ditempuh adalah menyiapkan probe cDNA dari tanaman karet resisten yang diberi perlakuan patogen dan tanpa perlakuan patogen (kontrol) atau dengan merancang primer untuk beberapa gen yang sudah diketahui berperan dalam resistensi tanaman.

### **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 500bp 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 transkripsi dari gen-gen yang sedang aktif pada jaringan atau sel tertentu. Kloning fragmen cDNA dilakukan menggunakan vektor pGEM<sup>®</sup> -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 $\alpha$  kompeten menghasilkan koloni putih yang mengindikasikan bahwa oligo Sfi telah menyisip pada vektor. Vektor modifikasi selanjutnya disebut sebagai vektor pGEM<sup>®</sup> - T Easy – Oligo Sfi. Ligasi fragmen cDNA pada vektor pGEM<sup>®</sup> - T Easy – Oligo Sfi serta transformasinya pada bakteri E. coli DH5 $\alpha$  kompeten telah

menghasilkan sebanyak 6000 koloni dengan titer sebesar  $2,7 \times 10^7$  cfu/ $\mu$ g, dimana 93% merupakan transforman. Ukuran fragmen cDNA yang diperoleh berkisar antara 300 – 2000 – bp.

Studi ekspresi gen penyandi hevein pada klon karet resisten dan rentan, masing-masing diberi perlakuan patogen serta kontrolnya, tidak menunjukkan bahwa gen tersebut berperan dalam resistensi klon karet terhadap infeksi *C.cassiicola*.