

**PROSIDING SEMINAR NASIONAL
HASIL PENELITIAN YANG DIBIAYAI
OLEH HIBAH KOMPETITIF**

**PENINGKATAN PEROLEHAN HKI DARI HASIL
PENELITIAN YANG DIBIAYAI OLEH
HIBAH KOMPETITIF**

BOGOR, 1-2 AGUSTUS 2007

**dalam rangka
Purnabakti Prof. Jajah Koswara**



**KERJASAMA:
FAKULTAS PERTANIAN IPB
DITJEN PENDIDIKAN TINGGI DEPDIKNAS
PUSAT PERLINDUNGAN VARIETAS TANAMAN DEPTAN**

**DEPARTEMEN AGRONOMI DAN HORTIKULTURA
FAKULTAS PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2007**

Seminar ini diselenggarakan oleh Fakultas Pertanian IPB bekerja sama dengan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Depdiknas dan Pusat Perlindungan Varietas Tanaman (PPVT) Deptan dalam rangka Purnabakti Prof. Dr. Jajah Koswara.

Copyright © 2007 Departemen Agronomi dan Hortikultura Faperta IPB
Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga Bogor 16680
Telp./Faks. (0251) 659353 e-mail: agronipb@indo.net.id

Isi dikutip dengan menyebutkan sumbernya

Departemen Agronomi dan Hortikultura Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor. 2007. Peningkatan Perolehan HKI dari Hasil Penelitian yang Dibiayai oleh Hibah Kompetitif. Prosiding Seminar Nasional Hasil Penelitian yang Dibiayai oleh Hibah Kompetitif. Bogor, 1-2 Agustus 2007.

xxxv + 458

ISBN : 978-979-15649-2-2

AMPLIFIKASI CDNA KEDELAI DENGAN BEBERAPA PRIMER SPESIFIK GEN *CAO* (*Chlorophyll A Oxygenase*)

Nurul Khumaida¹, Kisman², dan Didy Sopandie¹

¹Staf Pengajar Departemen Agronomi dan Hortikultura, Faperta IPB

²Staf Pengajar PS Pemuliaan Tanaman, Jurusan Budidaya Pertanian, Faperta Unram.

ABSTRAK

Kandungan klorofil b yang meningkat pada tanaman yang ditumbuhkan pada kondisi intensitas cahaya rendah merupakan mekanisme adaptasi tanaman melalui peningkatan ukuran antena (*antenna size*). Klorofil a oksigenase adalah enzim yang berfungsi mengkatalisis biosintesis klorofil b yang dikodekan oleh gen *CAO* (*Chlorophyll a Oxygenase*). Dalam paper ini dijelaskan tentang hasil amplifikasi lima pasang primer spesifik gen *CAO* yang didisain dari gen *CAO* tanaman padi (*Oryza sativa*) aksesi AB021310 dan tanaman model (*Arabidopsis thaliana*) aksesi AB021316 untuk mengamplifikasi cDNA template dari tanaman kedelai. Kelima pasang primer (*forward* dan *reverse*) spesifik gen *CAO* tersebut berturut-turut CAO-1, CAO-3, CAO-4, CAO-5, dan CAO-6 berhasil mengamplifikasi cDNA kedelai dengan ukuran berkisar antara 400–800 bp.

Kata kunci : amplifikasi, gen, *Chlorophyll A Oxygenase*, ukuran antena

PENDAHULUAN

Kedelai merupakan salah satu tanaman pangan penting di Indonesia karena memiliki kandungan gizi yang cukup tinggi. Kebutuhan kedelai di dalam negeri terus meningkat setiap tahun (sekitar 2 juta ton) seiring dengan kesadaran masyarakat yang semakin tinggi akan pentingnya produk berbahan baku kedelai. Di lain pihak, produksi kedelai nasional cenderung stagnan, sekitar 730 ribu ton per tahun (Departemen Pertanian, 2004).

Peningkatan produksi kedelai nasional melalui perluasan areal tanam memiliki potensi yang cukup besar, antara lain melalui penggunaan lahan di bawah tegakan tanaman perkebunan, hutan tanaman industri (HTI) melalui program *agroforestry*, atau tumpangsari dengan tanaman pangan semusim lainnya. Akan tetapi, kendala utama yang dihadapi adalah intensitas cahaya yang rendah akibat faktor naungan.

Cekaman abiotik yang disebabkan oleh intensitas cahaya rendah berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan tanaman kedelai. Respon tanaman kedelai yang ditumbuhkan pada kondisi ternaungi (paranet 50 %) menunjukkan adanya perubahan pada karakter agronomi, morfo-anatomi daun, fisiologi, dan karakter molekuler. Perubahan yang terjadi merupakan mekanisme adaptasi dari tanaman yang dilakukan melalui mekanisme penghindaran (*avoidance*) dan toleransi (*tolerance*).

Beberapa penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa kandungan klorofil b pada daun padi gogo dan kedelai meningkat ketika ditumbuhkan di bawah kondisi cekaman naungan, sehingga menurunkan rasio klorofil a/b (Khumaida, 2002). Telah diketahui bahwa meningkatnya kandungan klorofil b akan meningkatkan *antenna size* yang diimplikasikan oleh menurunnya rasio klorofil a/b.

Hidema *et al.* (1992) melaporkan bahwa intensitas cahaya rendah menurunkan nisbah klorofil a/b, penurunan ini disebabkan oleh peningkatan klorofil b pada tanaman yang dinaungi, yang berkaitan dengan peningkatan protein klorofil a/b pada LHC II. Membesarnya antena untuk fotosistem II ini akan mempertinggi efisiensi pemanenan cahaya. Selain itu, walaupun kandungan klorofil meningkat namun terjadi penurunan klorofil per luas area daun karena daun menjadi lebih tipis (Nilsen dan Orcutt, 1996).

Selanjutnya Masuda *et al.* (2003) menyatakan bahwa tanaman yang tumbuh pada lingkungan dengan intensitas cahaya rendah mempunyai ukuran antena klorofil yang lebih besar karena fotosistem mengandung klorofil b yang cukup tinggi dan kompleks pemanenan cahaya klorofil a-b (LHC) yang relatif besar, serta rasio klorofil a/b yang lebih rendah. Sebaliknya, pada kondisi intensitas cahaya tinggi, tanaman memiliki ukuran antena yang lebih kecil karena fotosistem mengandung klorofil b dalam jumlah relatif rendah dan ukuran antena LHC yang lebih kecil, serta rasio klorofil a/b yang lebih tinggi. Kemampuan tanaman memperbesar dan memperkecil ukuran antena membantu tanaman untuk mampu beradaptasi pada perubahan intensitas cahaya.

Tanaka *et al.* (2001) dengan menggunakan *Arabidopsis thaliana* melaporkan sintesis klorofil b mempunyai peran penting di dalam pengaturan ukuran antena, karena stimulasi sintesis klorofil b dengan pemberian asam 5-aminolevulinat, prekursor klorofil, meningkatkan akumulasi

LHCII dan menyebabkan over ekspresi dari gen chlorophyllide a oxygenase (*CAO*), yang memperbesar ukuran antena PSII.

Klorofil a oksigenase merupakan protein enzim yang berfungsi mengkatalisis perubahan klorofil a menjadi klorofil b, yang dikodekan oleh gen *CAO* (Tanaka et al. 1998). Telah dilaporkan bahwa regulasi biosintesis klorofil b penting di dalam pengaturan atau penyesuaian ukuran antena klorofil terhadap intensitas cahaya. Tanaka et al. (2001) melaporkan bahwa over ekspresi gen *CAO* pada Arabidopsis menyebabkan pembesaran ukuran antena klorofil dari PSII. Dengan demikian disimpulkan bahwa gen *CAO* merupakan gen regulator yang berasal dari kloroplas.

Klorofil b merupakan pigmen antena fotosintetik yang dijumpai pada golongan proklorofit (*prochlorophyte*) dan klorofit (*chlorophyte*). Pada golongan klorofit, biosintesis klorofil b meregulasi ukuran antena fotosintetik. Klorofil b disintesis dari klorofil a melalui dua tahap reaksi oksigenasi oleh enzim chlorophyllide a oxygenase (*CAO*) (Nagata et al. 2004). Mekanisme adaptasi tanaman kedelai melalui karakter fisiologi, dalam hal ini kandungan klorofil a dan b, serta rasio klorofil a/b menjadi sangat penting untuk lebih dipelajari sampai taraf molekulernya.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan amplifikasi beberapa gen *CAO* pada tanaman kedelai toleran naungan menggunakan beberapa pasang primer spesifik (GSP) yang didesain dari gen *CAO* beberapa tanaman tingkat tinggi. Hasil penelitian ini akan dilanjutkan dengan kegiatan kloning gen *CAO*. Kandidat gen *CAO* yang diperoleh selanjutnya akan diidentifikasi dan dipelajari pola ekspresinya. Dengan demikian informasi yang diperoleh akan menambah pengetahuan mekanisme adaptasi tanaman kedelai terhadap cekaman intensitas cahaya rendah. Juga materi yang diperoleh akan dimanfaatkan untuk kajian tanaman transgenik.

BAHAN DAN METODE

Persiapan bahan tanaman. Benih kedelai genotipe Ceneng ditanam di dalam pot trai yang telah berisi media tanam steril. Tanaman ditumbuhkan pada kondisi cahaya penuh. Daun trifoliat pertama dan kedua dipanen pada pagi hari, segera disimpan dalam boks pendingin untuk segera dilakukan ekstraksi RNA total.

Isolasi RNA total dari daun. Isolasi RNA total dilakukan dengan menggunakan Plant RNA Mini Kit (Invitrogen). Satu gram sampel daun trifoliat muda yang telah dihancurkan sampai halus dalam nitrogen cair dimasukkan ke dalam tabung mini 2 ml kemudian ditambahkan bufer ekstraksi sesuai protokol. Pelet RNA total yang diperoleh dikeringkan secepatnya kemudian dielusikan dalam 15-25 μ l bufer elusi. Pengujian kuantitas RNA total dilakukan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan kualitas RNA total dilakukan menggunakan elektroforesis 0.8 % gel agarose. Sebagai marka digunakan 16S, 23S ribosomal.

Pembentukan cDNA. Pembentukan first strand cDNA dari RNA total yang telah diperoleh dilakukan menggunakan metode Reverse Transcriptase Moloney Murine Leukemia Virus (RT-M-MLV) (RNase H⁻) (Takara Bio Inc) sesuai protokol. Sepuluh μ l campuran reaksi A yang terdiri atas 1-2 μ g RNA, 300 pmol primer oligo (dT) dan milliQ diinkubasikan pada suhu 70°C selama 5 menit, dilanjutkan diinkubasikan pada suhu 4°C selama 2 menit. Campuran A tersebut ditambahkan dengan reaksi B hingga volume 20 μ l yang terdiri atas 4 μ l 5x RTase M-MLV buffer, 1 μ l 10mM dNTP mix, 20 unit RNase inhibitor, 200 unit RTase M-MLV (RNase H⁻) dan 3 μ l milliQ. Selanjutnya campuran reaksi A dan B diinkubasi pada 42°C selama 60 menit, kemudian dipanaskan 70°C selama 10 menit, didinginkan di atas es selama 2 menit. Selanjutnya cDNA siap untuk digunakan sebagai template pada reaksi PCR.

Perancangan primer spesifik (GSP) *CAO*. Penelusuran gen *CAO* dari beberapa tanaman tingkat tinggi pada public database di GenBank dilakukan melalui situs NCBI. Perancangan primer spesifik (*forward* dan *reverse*) dilakukan dengan memanfaatkan runutan mRNA dari gen *CAO* pada beberapa tanaman tingkat tinggi dengan cara manual dan menggunakan program Primer3.

Amplifikasi cDNA dengan primer spesifik. cDNA yang dihasilkan selanjutnya digunakan sebagai template untuk PCR. PCR dikerjakan dengan menggunakan reaksi 30 μ l yang mengandung 2 μ l cDNA, 3 μ l 10x buffer KOD, 1.5 μ l 25 mM MgSO₄, 3 μ l 2 mM dNTP mix, masing-masing 1 μ l 20 μ M primer GSP *CAO* (*forward* dan *reverse*), 0.5 μ l KOD Plus DNA polymerase (Takara, Japan), dan 18 μ l milliQ. Reaksi PCR dimulai pertama dengan denaturasi selama 2 min pada 94°C, 35 siklus (denaturasi pada suhu 94°C selama 30 dt, annealing pada suhu 60°C selama 30 dt, dan pemanjangan pada suhu 68°C selama 1 menit), diikuti dengan tahapan pemanjangan akhir pada suhu 68°C selama 2 menit. Hasil PCR selanjutnya dielektroforesis

dengan menggunakan 0.8 % gel agaros dan bufer 1xTAE, tegangan pada 50-100 Volt selama 25-40 menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tanaka et al. (1989) telah berhasil membuktikan bahwa protein chlorophyll a oxygenase (CAO) berperan penting di dalam pembentukan klorofil b melalui oksidasi gugus metil klorofil a menjadi gugus formil. Gen yang mengkode enzim untuk pembentukan klorofil tersebut adalah gen *CAO* (chlorophyll a oxygenase).

Berdasarkan penelusuran informasi runutan mRNA gen *CAO* pada tanaman tingkat tinggi, diperoleh dua nomor aksesi yang meliputi AB021316 dan AB021310 berturut-turut pada *Arabidopsis thaliana* (tanaman model) dan *Oryza sativa* (padi). Sejauh ini gen *CAO* pada tanaman kedelai masih belum dipublikasikan. Sekuen mRNA gen *CAO* pada tanaman padi masih bersifat *partial cds*, sedangkan pada tanaman *Arabidopsis*, sekuen mRNA gen *CAO* merupakan *complete cds* (Tomitani et al. 1999). Hasil pencestajaran menggunakan program clustalW menunjukkan kedua sekuen tersebut memiliki tingkat homologi sekitar 50 %, akan tetapi memiliki daerah konsensus yang cukup tinggi. Hal ini dapat dipahami karena sekuen gen *CAO* pada tanaman padi masih merupakan *cds* parsial, sedangkan yang dari *Arabidopsis* merupakan *cds* lengkap.

Lima pasang primer spesifik CAO didisain dari kedua aksesi tersebut dengan rasio G-C lebih besar dari 50 %, masing masing dengan panjang 20 pasang basa. Dua pasang primer spesifik dari aksesi no. AB021310 yaitu CAO-3, CAO-5 (Gambar 1) dan tiga pasang primer spesifik didisain dari aksesi no. AB021316 yaitu CAO-1, CAO-4, CAO-6 (Gambar 2). Target amplifikasi bervariasi antara 400 bp sampai dengan 800 bp dengan posisi amplikon mendekati terminal N dan berada di tengah-tengah coding sequence. Temperatur annealing (Tm) berkisar antara 62–74°C. Keragaan lima pasang primer spesifik CAO disajikan pada Tabel 1.

1 ccccacccgtccccgggtccccgtgtgtaaacaagaaacccctcctgccccggagtcgtgaacgt
CAO-3(R)

421 ccccccgaagtgcactatcccttcgtgtgcctccttcaggattacaattcacgcaga
CAO-3(R) ————— CAO-5(F)

1021 aggggagtagacagggttgccattcagtaaccaaagtgagagtggatcatagtagctgca

LCAO-5(R)

Gambar 1. Posisi pasangan primer spesifik (GSP) pada mRNA CAO dari tanaman padi (aksesi AB021310), 1472 bp, cds parsial

301 atactggatggcgctgcgtcaagaatcttaccattatgattctcatgacaagg
CAO-1 (F)

361 tggatgtacttaatcccttagctcggtgactacaaggccatcgatcaatgtggaaaga
CAO-4 (F)

781 geetgaangacggaaaaccaggatgtgtacggaaatacatgtgcgcatagagcatgtccctct
CAO-4 (R) CAO-6 (F)

1081 ggacctccccgtggaaacacggttacttcttagataatctctggatcttgcatgc
CAO-1 (R)

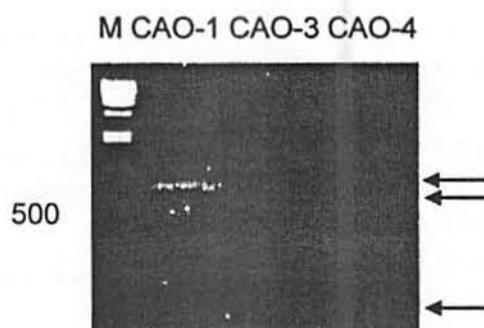
1441 tccattcatggAACACTGGGAGACATTCTGCTGAACCAGGCTAAACGAAGAATCTACG
CAO-6 (R)

Gambar 2. Posisi pasangan primer spesifik (GSP) pada mRNA CAO dari tanaman Arabidopsis (aksesi AB021316), 1982 bp, cds lengkap

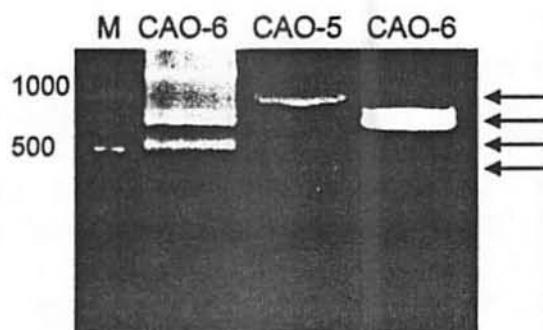
Tabel 1. Keragaan Primer Spesifik Gen CAO yang Digunakan dalam Penelitian

Sekuen ('5 - 3') CAO	GC (%)	Tm (°C)	No Aksesi	Target (bp)
1-F: GGATTGGCGTGCTCGTCAAG	60	64	AB021316	307-1087
1-R: GTAAACCGTGTCCACCGGG	60	64	<i>A. thaliana</i>	(780)
3-F: CCCACGCGTCCGGCGTCCCG	85	74	AB021310	2 - 421
3-R: GGATAGTCGACTTCGGTGGG	60	64	<i>O. sativa</i>	(420)
4-F: CGTGAGTACAAGTCCATCGG	55	62	AB021316	385-781
4-R: CGGGTTTCCCGTCTTCACCC	65	64	<i>A. thaliana</i>	(400)
5-F: CCTTCTCTGCTGCCTCCTTC	60	65.4	AB021310	439-1021
5-R: GCAACCTGTCTACTCCCCTC	60	62.6	<i>O. sativa</i>	(580)
6-F: CGGAATACATGTGCGCATAG	50	63.9	AB021316	809-1459
6-R: GTTCAGCGAAATGTCTCCAC	50	62.3	<i>A. thaliana</i>	(650)

Secara jelas kelima pasang primer spesifik tersebut berhasil mengamplifikasi cDNA kedelai sebagaimana disajikan pada Gambar 1 dan 2. Primer spesifik CAO-1 dan CAO-4 yang didesain dari cds lengkap *Arabidopsis* positif berhasil mengamplifikasi cDNA kedelai dengan ukuran masing-masing sekitar 800 bp dan 600 bp, sedangkan primer CAO-3 berhasil menunjukkan amplifikasi pada sekitar 400 bp. Selanjutnya primer spesifik CAO-4 mengamplifikasi pada 600 bp (Gambar 3). Primer CAO-5 dan CAO-6, masing masing berhasil mengamplifikasi target berturut-turut 450 bp dan 700 bp (Gambar 4).



Gambar 3. Hasil amplifikasi cDNA template dengan primer spesifik CAO-1, CAO-3, dan CAO-4



Gambar 4. Hasil amplifikasi cDNA template dengan primer spesifik CAO-5 dan CAO-6

Dewasa ini, telah ditemukan bahwa sekuen CAO terdiri atas tiga domain yaitu domain A, B, dan C, dimana domain C dipastikan memiliki fungsi katalisis. Menurut Yamasato *et al.* (2005) domain A terkait dengan keberadaan klorofil b dan meregulasi akumulasi protein CAO pada kloroplas. Pernyataan ini memperkuat hasil sebelumnya. Nagata *et al.* (2004) yang berhasil mengisolasi sekuen yang mengkode gen CAO dari *Prochlorothrix hollandica* (PhCAO). Perbandingan sekuen gen PhCAO dengan sekuen gen tanaman tingkat tinggi menunjukkan bahwa sekuen lengkap dari CAO *Arabidopsis* (AtCAO) dan CAO *Oryza sativa* (OsCAO) terdiri atas tiga domain. Sekuen konsensus N-terminal (domain A, 134 asam amino) terdapat pada AtCAO dan OsCAO tetapi tidak terdapat pada PhCAO. Sebaliknya, sekuen konsensus C-terminal dijumpai secara umum pada semua sekuen CAO (domain C, 336 atau 343 asam amino). Domain A dan domain C dihubungkan oleh sekuen yang kurang konsensus, yaitu domain B yang terdiri atas 30 asam amino. Domain C memiliki *Rieske center* dan *nonheme iron binding motifs* (Tomitani *et al.* 1999) dan berfungsi mengkatalisis perubahan klorofil a menjadi klorofil b tanpa bantuan domain A (Nagata *et al.* 2004). Karakteristik ini mengindikasikan bahwa domain A berperan penting dalam regulasi aktifitas CAO pada tanaman tingkat tinggi.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang telah disajikan dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut : gen CAO pada tanaman kedelai dapat teramplifikasi dengan ukuran antara 400–800 bp menggunakan primer GSP yang didesain dari coding sequence (cds) tanaman Arabidopsis dan padi. Hasil penelitian ini selanjutnya akan digunakan untuk kegiatan kloning dan sekvensing.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh Hibah Insentif Penelitian Dasar, Kementerian Negara Riset dan Teknologi Batch I (2007).

DAFTAR PUSTAKA

- Departemen Pertanian RI. 2004. Profil Kedelai Buku 2. Dirjen Bina Produksi Tanaman Pangan Direktorat Kacang-kacangan dan Umbi-umbian.
- Hidema, J., A. Makino, Y. Kurita, T. Mae, and K. Ohjima. 1992. Changes in the level of chlorophyll and light-harvesting chlorophyll a/b protein of PS II in rice leaves agent under different irradiances from full expansion through senescence. *Plant Cell Physiol.* 33(8):1209-1214.
- Khumaida, N. 2002. Studies on Upland rice and soybean to shade stress. Disertasi PhD. Tokyo. (tidak dipublikasikan).
- Masuda, T., A. Tanaka, and A. Melis. 2003. Chlorophyll antenna size adjustments by irradiance in *Dunaliella salina* involve coordinate regulation of chlorophyll a oxygenase (CAO) and *Lhcb* gene expression. *Plant Molecular Biology* 51:757-771.
- Nagata, N., S. Satoh, R. Tanaka, and A. Tanaka. 2004. Domain structures of chlorophyllide a oxygenase of green plants and *Prochlorothrix hollandica* in relation to catalytic functions. *Planta* 218: 1019–1025.
- Nilsen, E. T. and D. M. Orcutt. 1996. *The Physiology of Plant Under Stress. Abiotic Factors.* John Wiley & Sons, Inc. New York. 689p.
- Tanaka, A., H. Ito, R. Tanaka, N. K. Tanaka, K. Yoshida, K. Okada. 1998. Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a. *Issue* 95:12719-12723.
- Tanaka, R., Y. Koshino, S. Sawa, S. Ishiguro, K. Okada, and A. Tanaka. 2001. Overexpression of chlorophyllide a oxygenase (CAO) enlarges the antenna size of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 26:365–373
- Tomitani, A., K. Okada, H. Miyashita, H. C. Matthijs, T. Ohno, and A. Tanaka. 1999. Chlorophyll b and phycobilins in the common ancestor of cyanobacteria and chloroplasts. *Nature* 400:159–162.
- Yamasato, A., N. Nagata, R. Tanaka, and A. Tanaka. 2005. The N-Terminal Domain of Chlorophyllide a Oxygenase Confers Protein Instability in Response to Chlorophyll b Accumulation in Arabidopsis. *The Plant Cell* 17:1585–1597