



ISBN 978-979-95402-3-2

Perhimpunan Agronomi
Indonesia (PERAGI)

Fakultas Pertanian
Universitas Padjadjaran

PROSIDING

Simposium ■

**Peran Agronomi dalam Peningkatan Produksi Beras
dalam Program Ketahanan Pangan,
Tinjauan Masa Lalu dan Perspektif Masa Depan**

Seminar ■

**Pengembangan dan Optimalisasi Produksi
Komoditas Tanaman Pangan, Hortikultura,
Perkebunan dan Bioenergi**

**KONGRES IX
PERHIMPUNAN AGRONOMI INDONESIA (PERAGI)
Bandung, 15-17 November 2007**

Kloning Gen CAO (Chlorophyll a Oxygenase) pada Kedelai Toleran Naungan

NURUL KHUMAIDA¹, KISMAN² dan DIDY SOPANDIE¹

¹ Staf pengajar di Departemen Agronomi dan Hortikultura, Faperta IPB

² Staf pengajar di Jurusan Budidaya Pertanian, Faperta UNRAM

ABSTRAK

Meningkatnya kandungan klorofil b dan menurunnya rasio klorofil a/b merupakan mekanisme adaptasi tanaman kedelai terhadap intensitas cahaya rendah. Regulasi biosintesis klorofil b penting di dalam pengaturan atau penyesuaian ukuran antena klorofil terhadap intensitas cahaya. Klorofil a oksigenase merupakan protein enzim yang berfungsi mengkatalisis perubahan klorofil a menjadi klorofil b, yang dikodekan oleh gen CAO. Pada paper ini dibahas tentang kloning cDNA CAO pada kedelai toleran naungan dengan menggunakan lima pasang (*reverse* dan *forward*) primer spesifik CAO, yang didisain dari aksesori ABO21310-*Oriza sativa* dan ABO21316-*Arabidopsis thaliana*. Dari kelima pasang primer spesifik yang digunakan, empat pasang primer spesifik telah berhasil mengamplifikasi cDNA kedelai, yaitu CAO-3, CAO-4, CAO-5, dan CAO-6. Selanjutnya kloning fragmen cDNA CAO dilakukan dengan menggunakan teknik kloning standar (ligasi, transformasi ke *E. coli*, LB plate, minipreparasi, dan purifikasi DNA plasmid). Enzim restriksi yang meliputi *Bam*HI, *Eco* RI, dan *Sal* I serta bufer 10x H digunakan pada tahapan digest minipreparasi insert dari plasmid pT7 Blue yang digunakan. Berdasarkan tahapan minipreparasi telah dihasilkan sembilan kandidat cDNA CAO, yang selanjutnya akan dirurut basa nukleotidanya dengan menggunakan DNA Sequencer.

Kata kunci : Kloning, Gen CAO, Toleran naungan, Primer spesifik, Minipreparasi

PENDAHULUAN

Pemerintah telah mencanangkan program swa sembada kedelai dalam revitalisasi pertanian. Tahun 2010 ditargetkan 60% kebutuhan kedelai nasional dapat terpenuhi, sedangkan tahun 2015 akan mencapai 100% swa sembada kedelai. Upaya swa sembada kedelai diharapkan dapat menghemat devisa negara, yang rata-rata mengimpor 700 juta ton setahun (Deptan, 2004). Salah satu upaya peningkatan produksi kedelai nasional adalah melalui penambahan luas areal baru dan peningkatan produktivitasnya. Penambahan luas areal dapat dilakukan dengan mengoptimalkan lahan tidur seperti gawangan diantara tanaman HTI dan tanaman perkebunan (TBM). Namun demikian, pengembangan kedelai sebagai tanaman sela di bawah tegakan tanaman perkebunan, kehutanan (HTI) dan sebagai tanaman yang ditumpang-sarikan, aka. menghadapi kendala utama intensitas cahaya rendah akibat adanya naungan.

Perubahan-perubahan spesifik pada berbagai tingkatan sebagai bentuk adaptasi tanaman terhadap stres naungan, telah banyak dilaporkan seperti perubahan struktur morfologi, fenomena fisiologi (*physiological behavior*), dan modifikasi lintasan biokimia (Sopandie et al.,

2001, 2003a-b; Khumaida *et al.* 2001; Murchie *et al.*, 2002; Alves de Alvarenga, 2003; Juraimi *et al.*, 2004). Akan tetapi pada tingkat molekuler, mekanisme fisiologi toleransi tanaman terhadap stres naungan, belum sepenuhnya diketahui dengan baik (Biswal dan Biswal, 1999).

Beberapa hasil penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa kandungan klorofil b pada daun padi gogo dan kedelai meningkat ketika ditumbuhkan dibawah kondisi cekaman naungan, sehingga menurunkan rasio klorofil a/b (Khumaida, 2001; Khumaida, 2002; Sopandie *et al.*, 2006). Meningkatnya kandungan klorofil b ini merupakan mekanisme toleran tanaman kedelai terhadap cekaman naungan. Telah diketahui bahwa meningkatnya kandungan klorofil b akan meningkatkan *antenna size* yang diimplikasikan oleh menurunnya rasio klorofil a/b.

Hasil studi ekspresi gen LHCP (*light harvest complex binding protein*) pada beberapa kedelai genotipe toleran dan peka naungan yang ditumbuhkan dibawah kondisi cekaman intensitas cahaya rendah menunjukkan gen LHCP terekspresi dengan kuat pada genotipe toleran dibandingkan genotipe peka dibawah kondisi cekaman naungan. Ekspresi gen LHCP ini berkorelasi positif dengan kandungan klorofil b, namun berkorelasi negatif dengan rasio klorofil a/b (Khumaida, 2002).

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 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 pemanen 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) melaporkan bahwa sintesis klorofil b pada *Arabidopsis thaliana* mempunyai peran

penting di dalam pengaturan ukuran antena, karena simulasi 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. 1988). Diilaporkan 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. Sehingga 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 penelitian adalah untuk mendapatkan beberapa kandidat fragmen cDNA CAO (gen CAO) pada tanaman kedelai toleran naungan. Beberapa kandidat cDNA CAO yang diperoleh akan dirunut pasangan basa nukleotidnya.

BAHAN DAN METODE

Persiapan bahan tanaman. Benih kedelai genotipe toleran Ceneng ditanam di dalam pot trai yang telah berisi kertas dan akuades steril. Benih ditumbuhkan di dalam ruang yang terkontrol pencahayaannya. 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) sesuai protokol. 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. Pengujian kuantitas RNA total dilakukan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm. Pengujian kualitas RNA total dilakukan dengan cara dielektroforesis pada 0.8% gel agarose, dengan marka 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 µL campuran reaksi A (1 µg RNA, 300 pmol primer oligo (dT) dan milliQ

diinkubasikan pada suhu 70°C selama 5 menit, dilanjutkan pada suhu 4°C selama 2 menit. Kedalam campuran A ditambahkan reaksi B (4 µL 5x RTase M-MLV buffer, 1 l 10mM dNTP mix, 20 unit RNase inhibitor, 200 unit RTase M-MLV (RNase H⁻) dan 3 µL milliQ) hingga volume 20 µL. Selanjutnya reaksi diinkubasi pada 42°C selama 60 menit, dipanaskan 70°C selama 10 menit, dan didinginkan di atas es selama 2 menit.

Perancangan primer spesifik (GSP) CAO. Penelusuran gen CAO dari beberapa tanaman tingkat tinggi pada database di GenBank dilakukan melalui situs NCBI. Perancangan primer spesifik (*forward* dan *reverse*) dilakukan dengan memanfaatkan runutan mRNA dari gen CAO tanaman arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*, AB021316) dan tanaman padi (*Oryza sativa*, AB021310). Panjang primer adalah 20 mer baik untuk forward maupun primer reverse.

Amplifikasi cDNA dengan primer spesifik. cDNA yang dihasilkan digunakan sebagai template untuk PCR, dengan reaksi : 30 µL yang mengandung 2 µL cDNA, 3 µL 10x buffer KOD, 1.5 µL 25 mM MgSO₄, 3 µL 2 mM dNTP mix, masing-masing 1 µL 20 µM primer GSP CAO (*forward* dan *reverse*), 0.5 µL KOD Plus DNA polymerase (Takara, Japan), dan 18 µL 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 60-65°C selama 30 detik, dan pemanjangan pada suhu 68°C selama 1 menit), diikuti pemanjangan akhir pada suhu 68°C selama 2 menit.

Kloning ke dalam vektor. cDNA disisipkan ke dalam vektor pT7blue (Novagen). Ligasi dilakukan menggunakan *End Conversion perfectly blunt cloning kits* (Novagen) sesuai protokol. Campuran reaksi *End Conversion* diinkubasi pada suhu 16°C selama semalam (*overnight*). Kemudian dilakukan presipitasi dengan etanol (EtOH), dikeringkan dan dilakukan pengenceran kembali dengan 3 µL milliQ.

Transformasi ke E. coli. Sebanyak 1 µL DNA insert ditransformasikan ke dalam sel *E. coli* strain JM109 menggunakan *E. coli pulser*. Segera ditambahkan 450 µl media SOC cair, diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit, dan dikulturkan selama semalam (*overnight*) pada media LB padat (100 ml LB cair + 1.5 g bacto agar). Kedalam media LB padat ditambahkan 100 µL Ampicillin (antibiotik), 100 µL X-Gal (substrat untuk β-galactosidase), dan 10 µL IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactosidase, induser *lac* operon *E. coli*).

Perbanyakan rigid culture. Pembuatan *rigid culture* yang terdiri atas 5 ml LB cair, 5 µL Ampicilin, dan 1 koloni tunggal berwarna putih. Kemudian kultur dikocok dengan shaker pada ruang dengan suhu 37°C selama semalam. Pengecekan keberhasilan transformasi selanjutnya dilakukan dengan cara Miniprep Boiling method (Miniprep DNA plasmid dengan cara pemanasan) (Biotech Parma Bioprotocol).

Minipreparasi DNA plasmid dengan cara pemanasan. Kurang lebih 1000 ml kultur *E. coli* disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu ruang selama 3 menit.

Kedalam pelet ditambahkan 350 µL bufer STET dan 25 µL lisozim (1 mg/100 µL milliQ). Setelah tercampur merata kemudian dipanaskan dengan cara memasukkan minitube (1,5mL atau 2 mL) kedalam air mendidih selama kurang dari 40 detik. Minitube disentrifus pada 15.000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang. Peled (berupa lendir warna putih) dibuang. Kedalam supernatan ditambahkan 400 µL isopropanol dan diinkubasikan pada -20 °C selama 10 menit, selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 15.000 rpm, pada suhu 4 °C selama 10 menit. Peled dikering anginkan, kemudian dilarutkan dengan 20 µL milliQ atau bufer TE. Selanjutnya dilakukan perlakuan dengan enzim restriksi.

Pemotongan insert dengan enzim restriksi. Pertama disiapkan 8 µL larutan (mix solution) yang terdiri atas 1 µL enzim restriksi I, 1 µL enzim restriksi II, 1 µL bufer, dan 5 µL milliQ. Kedalam larutan ini ditambahkan 2 µL DNA plasmid (hasil minipreparasi), dan 1µL RNase. Reaksi campuran diinkubasikan pada 37°C selama 1 jam. Selanjutnya sampel dielektroforesiskan pada gel agarose 0.8%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perancangan primer spesifik gen CAO telah dilakukan dengan memanfaatkan sekuens mRNA CAO *Arabidopsis thaliana* (AB021316) dan tanaman padi (AB021310) dengan target 400 sampai 800 bp. Jumlah pasangan primer spesifik yang didisain berjumlah lima pasang (Khumaida *et al.*, 2007). 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).

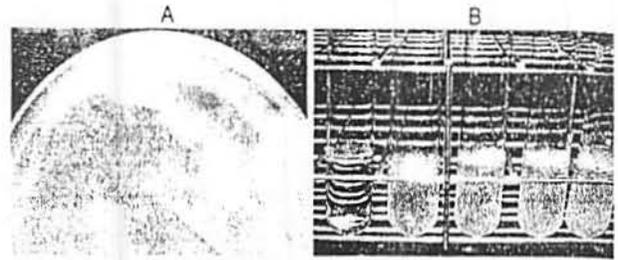
Hasil pensejajaran menggunakan program clustalW menunjukkan kedua sekuen tersebut memiliki tingkat homologi sekitar 50%, akan tetapi memiliki daerah konsensus yang cukup tinggi. Hal ini dapat dipahami karena sekuen gen CAO pada tanaman padi masih merupakan cds parsial, sedangkan yang dari Arabidopsis merupakan cds lengkap.

Amplifikasi dan kloning cDNA CAO telah dilakukan dengan mengamplifikasi cDNA template dengan menggunakan lima pasang (reverse dan forward) primer spesifik CAO. Namun hanya empat pasang primer spesifik (*reverse* dan *forward*) yang berhasil mengamplifikasi cDNA kedelai. Kelima pasang primer spesifik tersebut adalah CAO-1, CAO-3, CAO-4, CAO-5, dan CAO-6.

Selanjutnya cDNA insert diligasikan kedalam plasmid pT7Blue dengan penambahan End Conversion (Perfectly Blunt Cloning Kit, Novagen) dan T4 DNA ligase (Takara). Hasil ligasi kemudian ditransformasikan ke sel kompeten *E coli* strain JM109 menggunakan *E. coli pulser* dan dikulturkan pada media LB padat. Koloni *E coli* yang ditumbuhkan pada media LB padat menunjukkan warna putih dan sebagian ada yang berwarna biru (Gambar 1a).

Kultur cair dilakukan dengan cara mengkulturkan satu koloni tunggal berwarna putih kedalam media LB cair. Warna dan kondisi kultur cair *E coli* yang sudah

ditransformasi disajikan pada Gambar 1b. Tabung yang berisi media LB yang masih bening menunjukkan tidak adanya *E coli* pada media LB tersebut.



Gambar 1. Koloni *E coli* Hasil Transformasi yang Ditumbuhkan Pada Media LB Padat (a) dan LB Cair (b)

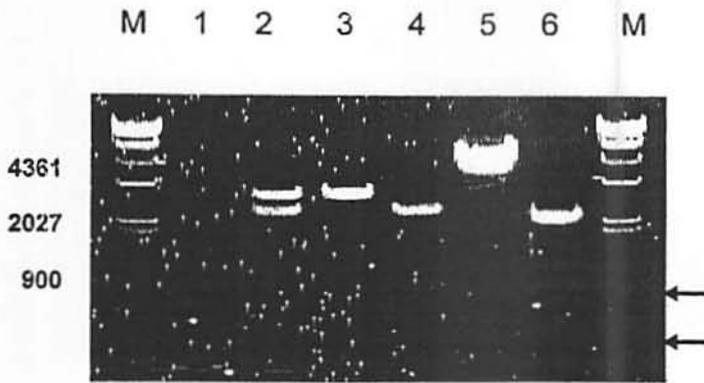
Minipreparasi dilakukan untuk memisahkan cDNA-insert dari plasmid dengan teknik Boiling/pemanasan. Pemotongan cDNA-insert dari plasmid dilakukan dengan perlakuan enzim restriksi. Keragaan enzim restriksi yang digunakan pada tahap minipreparasi disajikan pada Tabel 1. Enzim restriksi *Bam HI*, *Eco RI*, dan *Sal I* digunakan pada tahapan digest dengan bufer 10x H. Hasil elektroforesis beberapa kandidat cDNA CAO yang telah dipotong dengan enzim restriksi disajikan pada Gambar 2 dan 3. Terlihat pada gambar 2 dan 3, telah diperoleh enam kandidat cDNA CAO pada tanaman kedelai yang diamplifikasi dengan primer spesifik CAO-6-3 dan CAO-6-4.

Tabel 1. Enzim Restriksi yang Digunakan dalam Minipreparasi

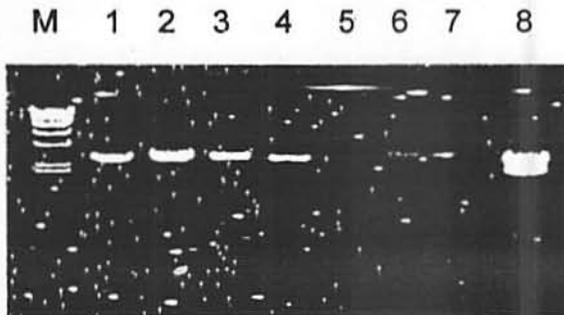
No	Kandidat cDNA CAO	Enzim restriksi		Bufer
		I	II	
1	CAO 3-1	Bam HI	Eco RI	10x H
2	CAO 3-4	Bam HI	Eco RI	10x H
3	CAO 4-2	Bam HI	Eco RI	10x H
4	CAO 4-3	Bam HI	Eco RI	10x H
5	CAO 5-1	Eco RI	Sal I	10x H
6	CAO 5-2	Eco RI	Sal I	10x H
7	CAO 6-1	Bam HI	Eco RI	10x H
8	CAO 6-2	Bam HI	Eco RI	10x H
9	CAO 6-3	Bam HI	Eco RI	10x H

Tanaka *et al.*, (1998) menyatakan bahwa klorofil b yang tersebar pada LHC sehingga sintesis klorofil b sangat penting bagi pembentukan LHC. Akan tetapi, apabila klorofil b dihasilkan terlalu banyak, kelebihan LHC atau klorofil b bebas akan terakumulasi dan menyebabkan kerusakan sel (*photodamage*). Jumlah klorofil b ditentukan oleh dua reaksi: sintesis klorofil b oleh enzim chlorophyllide a oxygenase (CAO) dan terjadinya rekonversi klorofil b menjadi klorofil a melalui siklus klorofil. Sintesis klorofil b oleh enzim chlorophyllide a oxygenase (CAO) merupakan tahap regulatori kunci di dalam regulasi ukuran antena (Tanaka *et al.*, 1998). Dengan demikian gen CAO diduga berperan penting dalam pengaturan mekanisme adaptasi tanaman terhadap kondisi intensitas cahaya rendah.

Kloning fragmen cDNA CAO pada tanaman kedelai toleran naungan menjadi penting karena belum tersedianya



Gambar 2. Hasil Minipreparasi Kandidat Gen CAO yang Diampifikasi dengan Praimer Spesifik CAO-6-4



Gambar 2. Hasil Minipreparasi Kandidat Gen CAO yang Diampifikasi dengan Praimer Spesifik CAO-6-3

informasi sekuens mRNA CAO tanaman kedelai pada data base GeneBank NCBI. Beberapa kandidat fragmen gen CAO kedelai ini akan dirunut nukleotidanya untuk mempelajari sekuens dan karakterisasinya.

Yamasato *et al.* (2005) juga telah berhasil mengisolasi dan menjelaskan fungsi dari masing-masing domain, dengan cara mengintroduksi gen beberapa domain CAO ke dalam *Arabidopsis*. Ketika gen CAO terekspresi, jumlah protein CAO berada di bawah level yang dapat dideteksi dan rasio klorofil a/b rendah. Akan tetapi, ketika diintroduksi gen yang terkait domain C, terdapat akumulasi domain C dalam jumlah banyak dan rasio klorofil a/b berkurang secara drastis.

Dilaporkan bahwa tembakau transgenik dengan introduksi gen CAO meningkat kandungan klorofil totalnya 6-7%, klorofil b 20% dan rasio klorofil a/b menurun 16%. Analisis Northern blot menunjukkan bahwa pada kondisi intensitas cahaya rendah, terjadi peningkatan ekspresi gen CAO seiring dengan peningkatan kandungan klorofil b, sebaliknya pada kondisi intensitas cahaya tinggi, ekspresi gen CAO menurun dan kandungan klorofil b juga menurun. Meningkatnya kandungan klorofil b diikuti dengan meningkatnya kandungan *light-harvesting chl-protein complex II* (LHCPII) (Pattanayak *et al.*, 2005). Korelasi positif antara kandungan klorofil b pada kedelai toleran naungan dengan ekspresi gen LHCP juga telah dilaporkan oleh Khumaida (2002).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah disampaikan, dapat disimpulkan sebagai berikut :

- Pasangan primer gen spesifik yang didisain telah berhasil mengamplifikasi cDNA kedelai toleran naungan.
- Proses ligasi dan transformasi kedalam *E coli* telah berhasil dilakukan.
- Telah diperoleh sembilan kandidat cDNA CAO pada tanaman kedelai toleran naungan.

UCAPAN TERIMAKASIH

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

DAFTAR PUSTAKA

- Alves de Alvarenga A., E. Mauro de castro, Erico de Castro Lima Junior, M.M. Magalhaes, 2003. Effects of different light levels on the initial growth and photosynthesis of *Croton urucurana* Baill. In Southeastern Brazil. R.Arvore, Vicosa-MG 27:53-57
- Biswal B. and U.C. Biswal, 1999. Photosynthesis under stress: stress signals and adaptive response of chloroplast. P315-336. dalam Pessaraki (ed). Hand Book of Plant and Crop Stress. Marcel Dekker, Inc. New York

- 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, 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.
- Juraimi A.S., D.S.H. Drennan, and N. Anuar, 2004. The effects of shading on the growth, development and partitioning of biomass in bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers). *J. Biol. Sci.* 4:756-762.
- Khumaida, N., D. Sopandie, and T. Takano. 2001. Adaptability of soybean to shade stress: Expression of photosynthetic genes in soybean genotypes. Proceeding of the 1st Seminar Toward Harmonization between Development and Environmental Conservation in Biological Production. Tokyo University, February 21-23, 2001.
- Khumaida, N. 2002. Studies on Upland rice and soybean to shade stress. Disertasi PhD. Tokyo. (tidak dipublikasikan).
- Khumaida, N., Kisman., dan Sopandie, D. 2007. Studi Seluler dan Molekuler Dua Gen Fotosintetik Berbasis Kloroplas (*Jf3* dan *CAO*) untuk Pembentukan Kedelai Transgenik Tahan Naungan Produktivitas Tinggi. Laporan Penelitian Tahun I, Hibah Insentif Risert Dasar. KMNRT. 2007.
- Masuda, T., A. Tanaka, 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.
- Murchie E.H., S. Hubbart, Y. Chen, S. Peng, and P. Horton, 2002. Acclimation of rice photosynthesis to irradiance under field conditions. *Plant Physiol.* 130:1999-2010
- Nagata, N., S. Satoh, R. Tanaka, A. Tanaka. 2004. Domain structures of chlorophyllide *a* oxygenase of green plants and *Prochlorothrix hollandicain* relation to catalytic functions. *Planta* 218: 1019-1025.
- Nilsen, E.T., 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, 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, 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, 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