

Konstruksi pustaka cDNA dari daun klon karet AVROS 2037 yang diinfeksi patogen *Corynespora cassiicola*

Construction of a cDNA library from leaf of AVROS 2037 rubber clone infected by Corynespora cassiicola pathogen

NURHAIMI-HARIS^{1*)}, Hajrial ASWIDINNOOR²⁾, Antonius SUWANTO³⁾,
Maggy T. SUHARTONO⁴⁾, Nurita TORUAN-MATHIUS¹⁾ & Agus PURWANTARA¹⁾

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

²⁾Jurusan Agronomi, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680, Indonesia

³⁾Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16144, Indonesia

⁴⁾Jurusan Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680, Indonesia

Summary

Construction of cDNA library derived from transcripts made under certain condition is an important first step to understand disease resistant mechanisms. To identify rubber genes or transcripts involved in defense response toward Corynespora cassiicola, cDNA library was constructed using rubber clone AVROS 2037, one of resistant clone to this pathogen. cDNA library was constructed based on the strategy of leaves infection using conidia, with the assumption that transcript expression related to defense response would be induced by pathogen infection. RNA was isolated from leaves three days after inoculation with conidia of C. cassiicola. Steps involved in the cDNA library construction were RNA isolation, mRNA purification, cDNA synthesis, vector modification, cDNA insert ligation, plasmid transformation and clone verifications. Each gram of leaf produced approximately 300 µg RNA, and 0.25% of them was mRNA. The mRNA was used to synthesized cDNA. Ligation of cDNA and modified vector was facilitated by restriction enzyme SfiI. The constructs were transformed into the E. coli DH5a competent cells. A total of 8000 colonies were produced. Random examination of 270

colonies showed that approximately 93% of these colonies carried plasmid vector with DNA insert size of 200 – 2000 bp, with average size of 500 – 800 bp. cDNA library construction of rubber leaves from AVROS 2037 clone as well as some necessary modification steps are presented in this paper.

[Key words: *Hevea brasiliensis*, cDNA library, rubber clone, AVROS 2037, leaf-fall disease, *Corynespora*]

Ringkasan

Konstruksi pustaka cDNA yang mengandung transkrip yang diekspresikan dalam kondisi tertentu merupakan tahap awal yang sangat penting dalam berbagai studi biologi. Untuk mengidentifikasi gen karet atau transkrip yang berperan dalam respons pertahanan tanaman karet terhadap *Corynespora cassiicola*, pustaka cDNA dibuat dengan menggunakan daun klon AVROS 2037 yang merupakan salah satu klon resisten terhadap patogen tersebut. Pustaka cDNA dibuat berdasarkan strategi menginfeksi daun dengan konidia *C. cassiicola* dengan pertimbangan bahwa ekspresi transkrip yang

^{*)} Penulis korespondensi

berperan dalam respons pertahanan akan diinduksi oleh adanya infeksi patogen. Dengan demikian pustaka cDNA yang dibuat diharapkan mengandung gen atau bagian gen yang berhubungan dengan respons pertahanan. RNA diisolasi dari daun setelah daun diinokulasi selama tiga hari dengan konidia *C. cassicola*. Beberapa tahapan telah dilakukan, dimulai dengan isolasi RNA, pemurnian mRNA, sintesis cDNA, modifikasi vektor kloning, ligasi fragmen cDNA utas ganda dengan vektor kloning serta transformasi hasil ligasi ke bakteri *Escherichia coli* DH5 α kompeten. Dari setiap gram jaringan daun berhasil diisolasi RNA sekitar 300 μ g, dan dari jumlah tersebut sekitar 0,25% mRNA dapat diisolasi. mRNA yang diisolasi digunakan untuk sintesis cDNA. cDNA dipotong dengan enzim restriksi *Sfi*I dan diligasi ke vektor plasmid yang dimodifikasi dengan menyisipkan situs enzim *Sfi*I. cDNA-vektor rekombinan ditransformasi ke dalam sel bakteri *E. coli* DH5 α kompeten menggunakan metode standar. Transformasi konstruk ini menghasilkan 8.000 koloni. Pengujian PCR terhadap 270 koloni yang dipilih secara acak mengindikasikan bahwa sekitar 93% koloni tersebut membawa cDNA sisipan dengan ukuran fragmen cDNA yang menyisip berkisar antara 200 sampai 2000 bp. cDNA sisipan terbanyak terdapat pada ukuran antara 500 – 800 bp. Dalam tulisan ini dibahas tahap demi tahap proses yang dilakukan untuk membuat pustaka cDNA asal daun karet klon AVROS 2037 serta beberapa modifikasi yang diperlukan.

Pendahuluan

Identifikasi gen yang diekspresikan pada tahap perkembangan atau kondisi tertentu suatu tanaman serta pengujian pola ekspresinya merupakan tahapan penting untuk mendapatkan informasi tentang fungsi gen, baik yang berhubungan dengan proses diferensiasi, perubahan morfologi dan metabolisme serta respons terhadap infeksi

patogen. Salah satu cara yang dapat ditempuh untuk mengidentifikasi gen atau bagiannya adalah melalui penapisan (*screening*) terhadap pustaka cDNA, (*complementary DNA*) yaitu suatu pustaka yang merepresentasikan gen-gen yang diekspresikan dalam suatu jaringan, waktu, atau kondisi tertentu. Pustaka cDNA diperoleh melalui proses kloning sehingga ratusan gen berbeda dimungkinkan untuk dikoleksi dan diperbanyak secara terus menerus. Identifikasi cDNA spesifik dapat dilakukan melalui proses hibridisasi (Cowel, 1998; Glick & Pasternak, 1994; Kleinsmith & Kish, 1995) ataupun melalui proses amplifikasi PCR dengan menggunakan primer spesifik untuk gen tertentu.

Dalam konstruksi pustaka cDNA, DNA polimerase yang memerlukan RNA (*RNA-dependent DNA polymerase*) yakni *reverse transcriptase* (RT) digunakan untuk meng-copy *messenger RNA* (mRNA) menjadi molekul cDNA utas ganda. Berbeda dengan mRNA yang dengan mudah terdegradasi dan menggambarkan proses transkripsi dari gen-gen yang aktif pada suatu jaringan atau sel tertentu, cDNA merupakan molekul yang lebih stabil sehingga sesuai untuk disisipkan ke dalam vektor kloning, baik berupa plasmid, cosmid, atau bakteriofage. Populasi mRNA yang telah di *copy* menjadi cDNA apabila diklon akan menghasilkan pustaka cDNA yang bersifat permanen. Keuntungan pustaka cDNA adalah hanya mengandung sekuen yang terekspresi dalam bentuk mRNA dalam suatu kondisi atau waktu tertentu (Kleinsmith & Kish, 1995).

Karet (*Hevea brasiliensis*) merupakan salah satu tanaman yang memiliki arti ekonomi dan sosial amat penting bagi Indonesia. Dalam budidayanya, penyakit gugur daun yang disebabkan cendawan

patogen *C. cassiicola* sering menimbulkan erugian besar. Di Indonesia saja, antara tahun 1980 – 1988 sekitar 1.200 ha tanaman karet terserang berat, 400 ha di antaranya dibongkar dan dimusnahkan (Sinulingga *et al.*, 1996), sedangkan di Sri Lanka pemusnahan tanaman karet terserang mencapai 4.600 ha (Jayasinghe & Silva, 1996). Akhir-akhir ini dilaporkan bahwa intensitas infeksi oleh patogen ini meningkat secara berangsur-angsur dan timbulnya penyakit meluas dari tahun ke tahun (Manju *et al.*, 2001; Situmorang, 2002).

C. cassiicola mempunyai kemampuan menyerang daun karet muda maupun daun karet tua, terutama di sepanjang tulang daun (Chee, 1988). Percobaan pendahuluan yang dilakukan pada dua klon resisten, yaitu AVROS 2037 dan PR 300 serta satu klon rentan, yaitu PPN 2444 menunjukkan bahwa gejala bercak seperti titik berwarna coklat tua mulai terlihat secara visual pada hari kedua setelah inokulasi. Pada hari ketiga sampai keempat, bercak terlihat semakin banyak dan melebar pada permukaan daun klon PPN 2444, namun tidak menunjukkan perkembangan yang berarti pada klon AVROS 2037 dan PR 300. Rouli (1987), melaporkan bahwa satu hari setelah inokulasi *C. cassiicola* dilakukan pada permukaan bawah daun klon PPN 2444, kerusakan pada sebagian kutikula dan lapisan epidermis bawah daun langsung dapat dilihat. Kerusakan berlanjut pada sebagian parenkim bunga karang, miselium cendawan mulai terlihat pada ruang intraseluler, dua hari setelah inokulasi. Pada hari ketiga kerusakan lapisan jaringan daun semakin banyak, lapisan parenkim bunga karang hancur dan kerusakan terjadi pada sebagian lapisan parenkim palisade.

Dalam interaksi *H. brasiliensis*/*C. cassiicola* dilaporkan bahwa penetrasi cendawan terjadi dalam waktu 12 jam setelah inokulasi dan tidak terdapat perbedaan kecepatan penetrasi pada tanaman resisten dan rentan (Breton *et al.*, 2000). Namun perbedaan nyata terlihat pada invasi cendawan dalam jaringan tanaman. Serangan pada klon rentan menyebabkan kerusakan pada sel epidermis, nukleus dan organel lainnya sedangkan pada klon resisten kolonisasi cendawan terbatas hanya pada beberapa sel di sekitar hifa dan tidak menyebar ke jaringan sehat (Breton *et al.*, 2000). Diduga ketahanan yang ditunjukkan oleh klon karet resisten bersifat genetik dan diatur pada tingkat molekuler. Dari studi yang dilakukan oleh Tan & Tan (1996) dikemukakan bahwa sifat ketahanan tanaman karet terhadap penyakit gugur daun *Corynespora* kemungkinan dikendalikan secara poligenik, namun studi lain mengemukakan bahwa sifat ketahanan tersebut dikendalikan oleh dua pasang gen utama yang berinteraksi secara epistasis (Hadi 2003).

Salah satu cara yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi transkrip/gen atau bagian gen yang berperan dalam resistensi klon karet terhadap *C. cassiicola* adalah melalui skrining terhadap pustaka cDNA. Sehubungan dengan hal tersebut dilakukan konstruksi pustaka cDNA dari klon AVROS 2037 yang merupakan salah satu klon karet resisten terhadap infeksi *C. cassiicola* (Pusat Penelitian Karet, 1992). Sebagai sumber RNA digunakan daun karet yang diinfeksi dengan konidia *C. cassiicola*, dengan pertimbangan bahwa infeksi akan menginduksi ekspresi transkrip/gen yang berperan dalam resistensi klon karet terhadap patogen tersebut. Penyediaan pustaka cDNA

dimaksudkan untuk digunakan sebagai sumber gen atau bagian gen dalam upaya memperoleh transkrip atau gen/bagiannya yang berperan dalam resistensi klon AVROS 2037 terhadap *C. cassiicola*.

Bahan dan Metode

Bahan tanam dan isolat C. cassiicola

Klon karet resisten AVROS 2037 yang ditanam dalam polibag dan dipelihara di rumah kaca digunakan sebagai bahan tanam untuk sumber RNA. Sedangkan sebagai cendawan patogen digunakan isolat *C. cassiicola* cGT1 SS virulen yang diperoleh dari Balai Penelitian Karet (BPK) Sembawa. Konidia dari isolat tersebut diproduksi berdasarkan metode Situmorang (2002).

Perlakuan tanaman

Daun karet yang akan digunakan sebagai sumber RNA ditandai pada tanaman, pada saat daun mulai muncul. Inokulasi dilakukan pada daun umur sekitar 14 hari dengan menggunakan suspensi konidia yang disemprotkan secara merata ke permukaan bawah daun dengan menggunakan botol semprot. Konsentrasi konidia di dalam suspensi adalah 4×10^4 konidia/mL. Perlakuan inokulasi diberikan pada ketiga daun dalam satu tangkai daun, kemudian daun disungkup dengan kantong plastik. Tiga hari setelah perlakuan inokulasi, semua daun yang diberi perlakuan patogen diambil untuk digunakan sebagai sumber RNA. Pengambilan sampel daun tiga hari setelah inokulasi dilakukan dengan pertimbangan bahwa pada klon resisten umumnya gejala infeksi tidak berkembang lagi setelah hari

keempat inokulasi. Pada saat tersebut diduga respons pertahanan telah diekspresikan sehingga menghambat perkembangan patogen.

Isolasi RNA dan pemurnian mRNA

RNA diisolasi dari jaringan daun berdasarkan metode Pawlowski *et al.* (1994) yang dimodifikasi. Pada prinsipnya metode tersebut menggunakan *sodium dodecyl sulfate* (SDS) sebagai deterjen, fenol-kloroform sebagai pelarut organik, serta litium klorida (LiCl) untuk mengendapkan RNA. Hasil isolasi RNA diamati melalui elektroforesis pada gel agarose 1% yang ditambah dengan 0,5 mg/L etidium bromida, pada tegangan 50 volt selama sekitar satu jam. RNA diamati dengan menggunakan UV transiluminator. Penetapan konsentrasi RNA dilakukan dengan spektrofotometer UV melalui nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm (Sambrook *et al.*, 1989).

Untuk mengisolasi mRNA dari RNA digunakan *Poly Atract mRNA Isolation System III* (Promega Cat. Z5300), yang pelaksanaannya dilakukan sesuai dengan prosedur yang direkomendasikan dalam petunjuk teknisnya. Pada prinsipnya sistem tersebut menggunakan primer oligo(dT) terlabel biotin untuk menghibridisasi ujung 3' poli(A). Hibrid oligo(dT)-mRNA ditangkap oleh streptavidin-paramagnetik partikel dan kemudian kompleks tersebut dipisahkan dari larutan setelah tabung diletakkan pada *MagneSphere Magnetic Separation Stand*. Untuk memisahkan mRNA dari komponen lainnya ditambahkan H₂O bebas RNase sehingga mRNA larut. Supernatan yang merupakan stok mRNA murni dipindah ke tabung lain dan disimpan, paling baik pada -70°C . Konsentrasi mRNA

ditetapkan dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 260 nm dan kemurniannya ditentukan melalui perbandingan absorbansi pada panjang gelombang 260 dan 280 nm (Sambrook *et al.*, 1989).

Sintesis cDNA

Sintesis dan fraksinasi cDNA dilaksanakan dengan “*SMART cDNA Library Construction Kit*” dari Clontech (Cat. No. K1051-1). Untuk sintesis cDNA utas pertama digunakan 0,25 - 0,50 µg mRNA sedangkan sintesis cDNA utas kedua dilaksanakan melalui amplifikasi dengan cara *Long-Distance PCR* (LD-PCR). Untuk mendapatkan situs enzim restriksi *SfiI* pada populasi cDNA dilakukan pemotongan cDNA dengan enzim restriksi tersebut. Pelaksanaan sintesis maupun pemotongan cDNA sesuai prosedur yang direkomendasikan dalam petunjuk teknisnya.

Fraksinasi cDNA dengan CHROMA SPIN-400

Sebanyak 16 tabung mikro dengan volume 1,5 mL dilabel dan disusun di rak. Kemudian *Chroma Spin-400 Coloum* dibiarkan pada suhu kamar selama satu jam, dibolak-balik beberapa kali sampai matrik gel tersuspensi sempurna. Gelembung udara pada kolom dihilangkan menggunakan pipet 1.000 µL. Matrik diresuspensi perlahan untuk menghindari terbentuknya gelembung udara, kemudian tutup kolom bagian bawah dibuka dan cairan dibiarkan menetes. Selanjutnya kolom diletakkan pada *ring stand*, dan *storage* bufer dibiarkan mengalir sampai terlihat lapisan atas gel berada di dalam kolom. Bagian atas matrik diupayakan berada di garis 1,0 mL dan apabila kurang ditambahkan matrik dari kolom

ekstra yang disediakan. Laju pengaliran (*flow rate*) yang baik adalah kira-kira satu tetes/40-60 detik dan volume satu tetes kira-kira 40 µL. Apabila laju pengaliran terlalu lambat dan volume satu tetes terlalu sedikit, maka matrik harus diresuspensikan kembali dan prosedur diulang sampai didapat laju pengaliran dan volume satu tetes seperti yang direkomendasikan.

Pada saat *storage* bufer sudah berhenti menetes, perlahan ditambahkan 700 µL bufer kolom melewati dinding kolom dan dibiarkan mengalir keluar dari kolom. Apabila bufer sudah berhenti menetes (15-20 menit), dimasukkan 100 µL cDNA yang telah dipotong dengan enzim *SfiI* melewati dinding kolom dan sampel dibiarkan terserap seluruhnya ke lapisan atas matrik (sampai tidak ada cairan di lapisan atas). Tabung bekas sampel dicuci dengan 100 µL bufer kolom dan dimasukkan ke kolom (menggunakan pipet, melewati kolom). Bufer dibiarkan mengalir ke dalam kolom sampai lapisan atas tidak terdapat cairan. Pada tahap ini pewarna telah masuk beberapa mm. Rak yang telah berisi 16 tabung diletakkan di bawah kolom, tabung pertama tepat di bawah kolom. Kemudian ditambahkan 600 µL bufer kolom ke atas kolom dan pada saat itu tetesan fraksi (setiap tetes) ditampung ke dalam tabung ke-1 sampai tabung ke-16. Setelah selesai kolom ditutup kembali kemudian profil fraksinasi dicek pada agarosa 1,1 % melalui pewarnaan dengan etidium bromida 0,5 mg/L, dengan cara mengambil dengan pipet 3 µL dari setiap tabung, ditambah loading bufer, kemudian dielektroforesis pada 150V selama 10 menit. Fraksi dikumpulkan dalam tabung yang sama (maksimum berasal dari 3-4 tabung). Ke dalam tabung yang mengandung fraksi cDNA ditambahkan

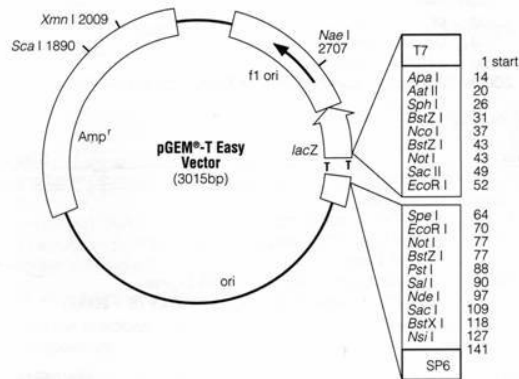
1/10 volume natrium asetat 3 M (pH 4,8), 1,3 µL glikogen (20mg/mL), dan 2,5 volume etanol 95 % campuran dihomogenkan perlahan dan diinkubasi pada suhu -20°C (semalam). Sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 14.000 rpm selama 20 menit pada suhu kamar, cairan dibuang menggunakan pipet tanpa menyentuh endapan dan tabung disentrifus sesaat supaya semua cairan turun ke bawah. Cairan dibuang, endapan yang merupakan cDNA dikeringanginkan 10 menit dan dilarutkan dengan 7 µL deionized H₂O (milli-Q water) dan disimpan pada -20°C.

Penyiapan vektor kloning, sel bakteri kompeten dan transformasi vektor modifikasi

Konstruksi pustaka cDNA meliputi kloning fragmen cDNA hasil fraksinasi ke vektor kloning sehingga menghasilkan

vektor rekombinan serta transformasi vektor rekombinan ke sel inang *E. coli* DH5α kompeten. Kloning fragmen cDNA menggunakan pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega, Cat. No. A1360), dengan ukuran 3015 bp (Gambar 1). Karena vektor pGEM[®]-T Easy tidak memiliki situs enzim restriksi *Sfi*I sedangkan sistem yang digunakan untuk menyiapkan cDNA melibatkan penggunaan enzim tersebut maka dilakukan modifikasi terhadap vektor. Oligonukleotida utas ganda yang terdiri atas 38 nukleotida yang memiliki situs enzim *Sfi*I serta basa A pada ujung 3' disisipkan pada bagian overhang-T di daerah *Multiple Cloning Site* (MCS) melalui proses ligasi.

Untuk meligasikan vektor dengan oligo *Sfi*I, sebanyak 1 µL vektor pGEM[®]-T Easy (50 ng/µL) dicampurkan secara homogen dengan 1 µL oligo *Sfi*I (1 ng/µL), 5 µL 2 kali *Rapid Ligation Buffer* T4 DNA ligase 1 µL T4 DNA ligase (3 u/µL) dan 2 µL H₂O,



Gambar 1. Peta vektor pGEM[®]-T Easy (Promega Cat.A1360).

Figure 1. The map of pGEM[®]-T Easy vector (Promega Cat.A1360).

Milli-Q sehingga volume total adalah 10 µL. Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 4 °C selama satu malam, untuk selanjutnya ditransformasikan ke sel inang bakteri *E. coli* DH5α.

Transformasi vektor pGEM[®]-T Easy hasil modifikasi dilakukan untuk mendapatkan koloni bakteri yang teruji memiliki vektor modifikasi, yakni yang telah mempunyai sisipan oligo *Sfi*. Untuk transformasi tersebut digunakan sel bakteri *E. coli* DH5α kompeten yang dipersiapkan sesuai prosedur standar (Sambrook *et al.* 1989) dengan melakukan optimasi pada lamanya waktu kultur. Waktu kultur yang diuji dalam pembuatan sel kompeten adalah 1,5, 2,5 dan 3 jam dengan parameter uji adalah jumlah koloni/mL medium.

Sebanyak 2 µL campuran hasil ligasi antara vektor pGEM[®]-T Easy dengan oligo *Sfi* dicampurkan dengan 200 µL sel bakteri kompeten, dihomogenkan dan diinkubasi di es selama 20 menit. Perlakuan panas dilaksanakan pada suhu 42 °C selama 45 – 50 detik, diletakkan di es selama minimal dua menit (lebih baik 20 – 30 menit), kemudian ditambahkan 800 µL medium SOC (100 mL mengandung 2 g tripton, 0,5 g yeast ekstrak, 1 mL NaCl 1 M, 0,25 mL KCl 1 M, 1 mL Mg²⁺ 2 M, 1 mL glukosa 2 M, pH 7,0) dan dihomogenkan perlahan. Campuran diinkubasi pada *shaker* dengan kecepatan putaran 150 rpm, 37 °C, selama 1,5 jam. Sebanyak masing-masing 100 µL campuran disebar pada medium padat LA/ampisilin/IPTG/X-gal dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama kurang lebih 16 jam. Koloni putih yang tumbuh diduga membawa vektor yang telah disisipi sekuen oligo.

Konfirmasi penyisipan sekuen oligo pada vektor dan pemurnian vektor modifikasi dari gel

Untuk konfirmasi penyisipan sekuen oligo pada plasmid pGEM[®]-T Easy dilakukan isolasi plasmid dari empat koloni putih dan satu koloni biru yang dipilih secara acak dari koloni yang tumbuh. Isolasi plasmid dilakukan berdasarkan metode standar (Sambrook *et al.* 1989). Selanjutnya plasmid dipotong ganda (*double digest*) dengan enzim restriksi *Sfi*I dan *Rsa*I, sesuai prosedur yang direkomendasikan. Pemotongan plasmid dengan enzim *Sfi*I dilakukan untuk konfirmasi penyisipan sekuen oligo utas ganda sedangkan pemotongan dengan enzim *Rsa*I adalah untuk konfirmasi jumlah fragmen hasil pemotongan. Plasmid pGEM[®]-T Easy memiliki satu situs enzim restriksi *Rsa*I pada posisi 1890 bp sehingga apabila plasmid hasil modifikasi dipotong dengan kedua enzim tersebut akan menghasilkan dua fragmen, masing-masing dengan ukuran sekitar 1920 bp dan 1130 bp. Penentuan plasmid rekombinan dilakukan berdasarkan ukuran kedua fragmen tersebut. Hasil re-striksi kemudian divisualisasi pada UV transiluminator pada gel agarose 1% melalui pewarnaan dengan etidium bromida (0,5 mg/L). Berdasarkan hasil visualisasi tersebut dipilih satu koloni yang membawa plasmid modifikasi, kemudian plasmid diisolasi dengan cara yang sama seperti di atas. Selanjutnya plasmid dilinearkan melalui pemotongan dengan enzim restriksi *Sfi*I dan dielektroforesis pada gel agarose 1%. Pemurnian plasmid modifikasi pGEM[®]-T Easy-Oligo *Sfi* dari gel agarose dilakukan dengan menggunakan *S.N.A.P[™] Gel*

Purification Kit (Invitrogen), sesuai prosedur yang direkomendasikan. Plasmid modifikasi yang telah dilinearakan dan dimurnikan selanjutnya digunakan sebagai vektor untuk diligasikan dengan fragmen cDNA yang diperoleh melalui proses fraksinasi dengan *CHROMA SPIN-400*.

Ligasi fragmen cDNA ke vektor pGEM[®]-T Easy-Oligo Sfi linear dan transformasi hasil ligasi

Untuk ligasi fragmen cDNA ke vektor pGEM[®]-T Easy-Oligo *Sfi* linear, dilakukan optimasi perbandingan molaritas antara vektor dengan cDNA sisipan, yaitu pada perbandingan 1 : 1, 1 : 2, dan 1 : 3. Dalam hal ini diasumsikan bahwa ukuran rata-rata cDNA sisipan adalah 1,5 kb. Reaksi ligasi dipersiapkan sebagai berikut :

	A (1:1) μL	B (1:2) μL	C (1:3) μL
Vektor pGEM [®] -T Easy-Oligo <i>Sfi</i> (10 ng/μL; 0,005 pmol/ μL)	3	3	3
cDNA sisipan (10 ng/μL; 0,01 pmol/μL)	1,5	3	4,5
T4 DNA ligase buffer (2x)	10	10	10
Air bebas nuklease	4,5	3	1,5
T4 DNA ligase (3 unit/μL)	1	1	1

Masing-masing campuran di atas diinkubasi pada suhu 4 °C selama satu malam. Transformasi dilakukan berdasarkan metode Sambrook *et al.* (1989) menggunakan bakteri *E. coli* DH5α kompeten. Untuk setiap koloni yang diperoleh dibuat replikanya pada medium LA/ampisilin dan

diinkubasi pada suhu 37 °C selama kurang lebih 16 jam. Penyimpanan replika jangka pendek dilakukan pada suhu 4 °C sedangkan penyimpanan jangka panjang masing-masing koloni disimpan di dalam medium LB yang dicampur dengan 15% gliserol dan kemudian disimpan pada suhu -20 °C.

Konfirmasi koloni transforman yang membawa cDNA sisipan

Untuk memastikan penyisipan fragmen cDNA pada vektor plasmid pGEM[®]-T Easy-Oligo *Sfi*, dilakukan PCR koloni dengan primer T7 dan SP6 yaitu primer yang dapat mengidentifikasi adanya sisipan pada vektor karena sekuennya mengapit daerah sisipan. Pasangan primer T7 dan SP6 mengamplifikasi plasmid pada daerah sepanjang 200 bp. Plasmid rekombinan yang membawa cDNA sisipan adalah plasmid yang hasil amplifikasinya lebih dari 200 bp.

Koloni bakteri yang tumbuh dipilih secara acak kemudian diambil menggunakan pipet tip dan dimasukkan ke dalam tabung PCR yang telah diisi dengan 10 μL akuades dan dicampur dengan larutan PCR yang mengandung bufer reaksi 1X, dNTPs 0,2 mM, Taq DNA polimerase satu unit serta primer SP6 dan T7 masing-masing 10 pmol. Reaksi PCR dilaksanakan pada suhu denaturasi 94 °C selama satu menit, *annealing* 56 °C selama satu menit, *extension* 72 °C selama dua menit, yang diulang sebanyak 30 siklus. Hasil PCR dan marker DNA dielektroforesis pada 2% gel agarose dengan tegangan 50 V selama kurang lebih satu jam, diwarnai dengan 0,5 mg/L etidium bromida dan divisualisasikan menggunakan UV transiluminator.

Hasil dan Pembahasan

RNA dan cDNA dari daun karet klon AVROS 2037

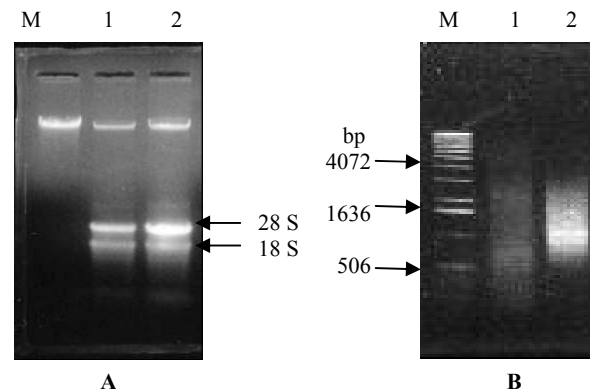
Hasil isolasi RNA dari daun karet klon AVROS 2037 terdapat pada Gambar 2. Berdasarkan pengukuran dengan spektrofotometer UV diketahui bahwa RNA yang diperoleh memiliki kualitas yang baik, ditunjukkan oleh perbandingan nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 dan 280 nm, yakni sekitar 1,80. Hal tersebut diperkuat oleh hasil elektroforesisnya dimana pita 28 S dan 18 S rRNA terlihat tajam sedangkan RNA yang terdegradasi hampir tidak teramati pada gel agarose tersebut (Gambar 2 A). Konsentrasi RNA yang diperoleh melalui pengukuran dengan spektrofotometer UV sekitar 300 µg/g daun. Kemurnian dan konsentrasi RNA cukup baik, meskipun lebih rendah apabila dibandingkan dengan hasil isolasi RNA daun karet yang dilakukan oleh Thomas *et al.* (2002), yang menggunakan *guanidinium thiocyanate* sebagai denaturan dimana dari setiap gram jaringan daun berhasil diisolasi RNA antara 420 – 500 µg. Sedangkan metode Pawlowski *et al.* (1994) yang diaplikasikan dalam penelitian ini menggunakan fenol sebagai denaturan.

Konsentrasi RNA yang dihasilkan dalam suatu proses isolasi berhubungan erat dengan metode isolasi yang digunakan. Secara umum pendekatan yang dilakukan untuk mengisolasi RNA adalah melalui lisis sel atau jaringan dan kemudian memisahkan makromolekul dengan menggunakan larutan denaturasi. Sejauh ini dilaporkan bahwa garam guanidium lebih efisien sebagai denaturan dibanding fenol (Das *et al.*, 2001). Namun seringkali prosedur isolasi yang

dipilih disesuaikan dengan kondisi laboratorium dan ketersediaan bahan, terutama apabila kualitas serta kuantitas RNA memenuhi syarat untuk analisis selanjutnya.

Sebanyak 1000 µg RNA digunakan untuk mengisolasi mRNA dan konsentrasi mRNA yang diperoleh melalui pengukuran dengan spektrofotometer UV adalah sebesar 2,5 µg, yakni sekitar 0,25% dari total RNA. Dengan metode yang sama Thomas *et al.* (2002) memperoleh mRNA dalam jumlah yang lebih banyak yakni sebesar 1% dari total RNA. Perbedaan konsentrasi mRNA yang diperoleh diduga berhubungan erat dengan umur tanaman yang digunakan sebagai sumber RNA. Thomas *et al.* (2002) menggunakan tanaman semaian umur delapan minggu sebagai sumber RNA sedangkan penelitian ini menggunakan tanaman hasil okulasi yang memiliki sifat sebagai tanaman dewasa. Penggunaan tanaman okulasi yang merupakan klon sebagai sumber RNA didasarkan pada pertimbangan bahwa resistensinya terhadap *C. cassicola* telah teruji, baik di lapangan maupun di rumah kaca.

Kualitas mRNA yang diperoleh cukup tinggi, ditunjukkan oleh keberhasilan dalam proses sintesis cDNA dengan menggunakan mRNA sebagai templat (Gambar 2 B). Tahapan paling kritis dalam sintesis cDNA adalah konversi mRNA menjadi cDNA utas pertama yang melibatkan aktivitas enzim *reverse transcriptase* (RT). Untuk konversi tersebut enzim RT yang umum digunakan berasal dari *avian myeloblastosis virus* (AMV) dan *Moloney murine leukemia virus* (MMLV), namun telah dibuktikan bahwa laju kesalahan konversi dengan AMV lebih tinggi dibanding MMLV (Ji & Loeb, 1992; Roberts *et al.*, 1989). Oleh karena itu, sistem yang digunakan untuk mengkonversi



Gambar 2. (A) RNA total dari daun karet klon AVROS 2037, dipisahkan pada 0,8% gel agarose. M = λ DNA yang tidak dipotong (250 ng); 1 dan 2 = RNA (duplo). (B) cDNA dari daun karet klon AVROS 2037 pada 1,1% gel agarose. M = 1 kb DNA ladder; 1= cDNA dari daun klon AVROS 2037; 2 = kontrol positif.

Figure 2. (A) Total RNA from leaves of AVROS 2037 rubber clone, separated on 0.8% agarose gel. M = undigested λ DNA (250 ng); 1 and 2 = RNA (duplo). (B) cDNA from leaves of AVROS 2037 rubber clone, separated on 1.1% agarose gel. M = 1 kb DNA ladder; 1= cDNA of AVROS 2037 clone; 2 = positive control.

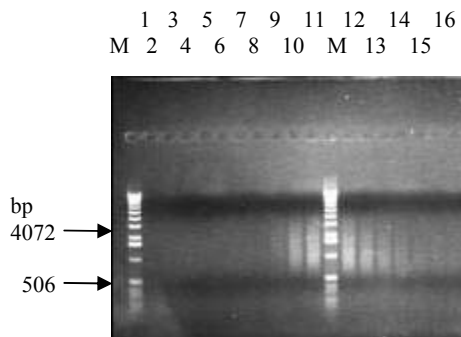
mRNA asal daun karet menjadi cDNA utas pertama mengaplikasikan RT yang berasal dari MMLV. Sedangkan sintesis utas kedua didasarkan pada metode klasik yang menggabungkan aktivitas *E. coli* RNase H dan DNA polimerase I untuk mengkatalisis sintesis utas kedua dari hibrid mRNA-cDNA (Gubler & Hoffman, 1983; Okayama & Berg, 1982).

Dengan sistem tersebut di atas, cDNA utas ganda dari daun klon AVROS 2037 berhasil diperoleh dengan penampakan smear pada gel agarose, mulai dari ukuran kurang dari 500 bp sampai sekitar 4 kb (Gambar 2 B). Sedangkan kontrol positif juga terlihat smear dengan intensitas yang lebih tinggi pada daerah dengan ukuran sekitar 1500 bp. Berdasarkan petunjuk

teknisnya, keunggulan sistem sintesis cDNA yang diaplikasikan dalam penelitian ini adalah kemampuannya untuk mengeliminasi transkrip yang tidak lengkap disebabkan terhentinya (*terminate*) aktivitas enzim RT sebelum sekuen mRNA ditranskripsi seluruhnya.

Fraksinasi cDNA

Untuk mendapatkan fragmen cDNA dilakukan fraksinasi dengan menggunakan kolom CHROMA SPIN-400, yang prinsipnya didasarkan pada pengeluaran cDNA dengan cara kromatografi. Hasil elektroforesis 3 μ L masing-masing fraksi pada gel agarose 1,1 % berdampingan dengan marka DNA terdapat pada Gambar 3.



Gambar 3. Fraksinasi fragmen cDNA pada 1,1% gel agarose menggunakan kolom CHROMA SPIN-400. M = 1 kb DNA Ladder, 1-16 adalah tetesan pertama sampai tetesan ke-16 pada fraksinasi.

Figure 3. Fractination of cDNA fragment on 1.1% agarose gel by using CHROMA SPIN-400. M = 1 kb DNA Ladder, 1-16 = first until sixteenth drops of the fractination.

Fragmen cDNA yang dapat diamati secara visual mulai dari tetesan ke-9 sampai tetesan ke-15 dengan ukuran sekitar 500 bp sampai 4 kb (Gambar 3). Setiap tiga fraksi dikumpulkan dalam satu tabung, kemudian dipekatkan sesuai prosedur yang disarankan sehingga akhirnya diperoleh sebanyak 7 μ L cDNA dengan konsentrasi sekitar 100 ng/ μ L. Konsentrasi tersebut ditetapkan berdasarkan hasil elektroforesis 1 μ L cDNA berdampingan dengan marka DNA yang telah diketahui konsentrasinya. Fragmen cDNA pada tahap berikutnya diligasikan dengan vektor pGEM[®]-T Easy-Oligo *Sfi*I dan kemudian ditransformasi ke bakteri *E. coli* DH5 α kompeten.

Waktu kultur dan seleksi vektor modifikasi

Tiga tahapan waktu kultur yang diuji dalam optimasi pembuatan sel bakteri *E. coli* DH5 α kompeten terdapat pada Tabel 1. Jumlah optimal bakteri diperoleh pada waktu kultur 2,5 jam, dengan OD pada panjang gelombang 600 nm adalah 0,549. Penambahan waktu kultur menjadi tiga jam dapat meningkatkan nilai OD namun tidak dapat meningkatkan jumlah koloni. Berdasarkan hasil tersebut maka untuk pembuatan sel bakteri kompeten dilakukan kultur selama 2,5 jam dengan OD sekitar 0,5.

Transformasi plasmid pGEM[®]-T Easy yang telah diligasikan dengan 38 bp oligonukleotida ke bakteri *E. coli* DH5 α kompeten menghasilkan koloni putih dan koloni biru pada medium LA/ampisilin. Sebanyak empat koloni putih dan satu koloni biru dipilih secara acak dan ditumbuhkan pada medium cair LB/ampisilin. Plasmid yang diisolasi dari masing-masing koloni dan kemudian dipotong ganda dengan enzim restriksi *Sfi*I dan *Rsa*I terdapat pada Gambar 4. Plasmid dari koloni nomor 1, 7, 8 dan 9 yang dipotong dengan kedua enzim restriksi tersebut (b) menghasilkan dua fragmen

Tabel 1. Jumlah koloni *E. coli* DH5 α selama kultur.

Table 1. Number of *E. coli* DH5 α colonies during culture.

Waktu kultur, jam <i>Culture time, hours</i>	OD λ 600 nm	Jumlah koloni/mL <i>Number of colony/mL</i>
1,5	0,170	1,1 x 10 ⁸
2,5	0,549	3,0 x 10 ⁸
3,0	0,668	2,1 x 10 ⁸

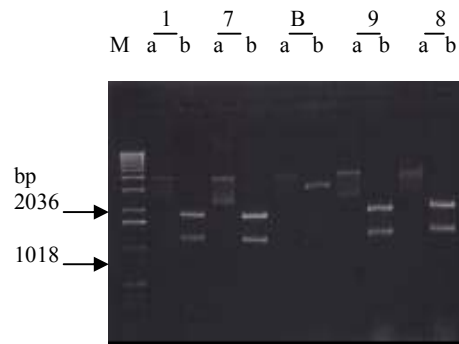
dengan ukuran sekitar 1920 bp dan 1130 bp, sedangkan yang tidak dipotong (a) menghasilkan fragmen dengan ukuran sekitar 3000 bp lebih. Jumlah fragmen lebih dari satu pada plasmid yang tidak dipotong diduga disebabkan topologi plasmid, yaitu adanya plasmid berbentuk sirkuler, linear dan supercoil.

Plasmid asal koloni biru (B) yang dipotong dengan kedua enzim restriksi tersebut (b) hanya menghasilkan satu fragmen dengan ukuran sekitar 3000 bp. Hal ini menunjukkan bahwa plasmid tersebut dipotong oleh enzim *Rsa*I tetapi tidak dipotong oleh enzim *Sfi*I sehingga menghasilkan plasmid dalam bentuk linear. Berdasarkan hasil tersebut plasmid yang berasal dari empat koloni putih dimurnikan dan dikoleksi sebagai vektor modifikasi dan untuk ligasi fragmen cDNA dalam penelitian ini digunakan plasmid asal koloni nomor 7 sebagai vektor.

Konstruksi pustaka cDNA pada vektor pGEM[®]-T Easy-Oligo Sfi

Hasil ligasi antara fragmen cDNA sisipan dengan vektor pGEM[®]-T Easy-Oligo *Sfi* masing-masing pada perbandingan vektor dan cDNA terdapat pada Tabel 2. Titer tertinggi diperoleh pada perbandingan molaritas vektor dan cDNA 1 : 3 sehingga untuk selanjutnya ligasi vektor dengan fragmen cDNA dilakukan pada perbandingan tersebut.

Ligasi seluruh fragmen cDNA dengan vektor pGEM[®]-T Easy-Oligo *Sfi* dan kemudian transformasinya pada sel bakteri *E. coli* DH5 α kompeten menghasilkan sekitar 8000 koloni. Sebagai gambaran, dari satu kali transformasi dengan menggunakan



Gambar 4. Restriksi plasmid *pGEM[®]-T Easy-Oligo Sfi* dengan enzim restriksi *Rsa*I dan *Sfi*I. M = 1 kb DNA Ladder. 1, 7, 8, 9 = plasmid dari koloni putih no. 1, 7, 8 dan 9. B = plasmid dari koloni biru. a = plasmid tidak dipotong, b = plasmid dipotong.

Figure 4. Restriction of *pGEM[®]-T Easy-Oligo Sfi* plasmid by using *Rsa*I and *Sfi*I enzyme. M = 1 kb DNA Ladder. 1, 7, 8, 9 = plasmid from white colony no. 1, 7, 8 and 9. B = plasmid from blue colony. a = uncut plasmid, b = cut plasmid.

Tabel 2. Perbandingan molaritas vektor dan cDNA sisipan dalam proses ligasi.

Table 2. The molarity ratio of vector and cDNA insert in ligation process.

Molaritas Vektor : cDNA Molarity Vector : cDNA	Titer Titer Cfu/ μ g cDNA
1 : 1	2,96 x 10 ³
1 : 2	2,48 x 10 ⁴
1 : 3	2,87 x 10 ⁴

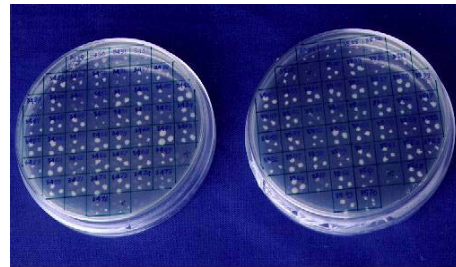
perbandingan molaritas vektor dan cDNA 1 : 3 seperti tersebut di atas, diperoleh 1325 koloni dengan titer rata-rata $2,70 \times 10^4$. (Tabel 3). Masing-masing koloni dibuat replikanya (Gambar 5) dan disimpan pada suhu 4°C . Sedangkan untuk penyimpanan dalam waktu lama digunakan medium LB yang mengandung 15% gliserol, dan disimpan pada suhu -20°C .

Pada proses konstruksi pustaka cDNA yang dilakukan dalam penelitian ini, kandidat transforman tidak ditentukan melalui seleksi biru-putih pada medium yang mengandung IPTG dan X-gal. Hal ini disebabkan vektor yang digunakan adalah vektor modifikasi dimana daerah operon *lac Z* telah disisipi oleh oligo *Sfi* sehingga baik transforman maupun non-transforman akan menghasilkan koloni berwarna putih pada medium tersebut. Oleh karena itu keberhasilan kloning atau penyisipan cDNA ke vektor dikonfirmasi melalui amplifikasi PCR, menggunakan primer T7 dan SP6. Pasangan primer tersebut akan mengamplifikasi DNA plasmid sepanjang 200 bp apabila tidak terdapat cDNA sisipan. Namun apabila fragmen hasil amplifikasi lebih dari 200 bp, maka kelebihan tersebut merupakan fragmen cDNA yang menyisip pada vektor plasmid. Kondisi demikian dapat diperoleh karena vektor pGEM[®]-T Easy telah didisain dengan menempatkan daerah sisipan di antara kedua primer (T7 dan SP6). Keuntungan lain menggunakan sistem vektor tersebut adalah tahapan isolasi plasmid tidak diperlukan karena dapat langsung dilakukan amplifikasi PCR terhadap masing-masing koloni yang diuji. Oleh karena itu cara ini merupakan cara cepat untuk konfirmasi keberadaan DNA sisipan pada vektor (koloni transforman)

yang sekaligus dapat menunjukkan ukuran DNA sisipan.

Sebanyak 285 koloni dari 8000 koloni yang ada dipilih secara acak untuk seleksi koloni transforman melalui PCR dan dari jumlah tersebut sebanyak 270 koloni menghasilkan produk PCR. Hasil sebagian PCR koloni terdapat pada Gambar 6. Ukuran fragmen cDNA yang diperoleh dari PCR berkisar antara 200 bp sampai 2200 bp. Fragmen dengan ukuran 200 bp dapat dipastikan bukan merupakan cDNA sisipan tapi adalah hasil amplifikasi dari bagian vektornya sendiri, sehingga koloni yang membawa fragmen dengan ukuran tersebut bukan merupakan koloni transforman.

Dari 270 koloni yang telah diuji melalui PCR koloni, hanya 17 koloni yang plasmidnya tidak memiliki sisipan cDNA atau bukan koloni transforman, sedangkan sebagian besar (253 koloni) memiliki cDNA sisipan. Berdasarkan gambaran yang diperoleh dari PCR koloni tersebut maka dapat diperkirakan bahwa sebanyak kurang



Gambar 5. Replika contoh koloni hasil transformasi vektor rekombinan pada bakteri *E. coli* DH5 α .

Figure 5. Replica of selected colonies resulted from cDNA- vector recombinant transformed into the *E. coli* DH5 α .

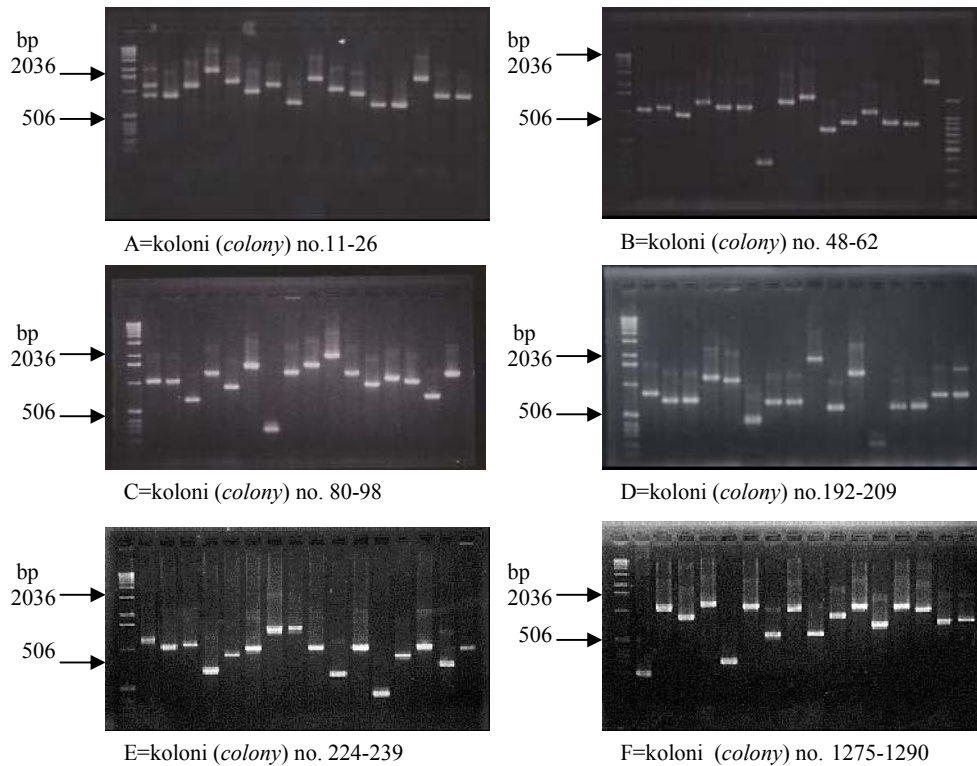
Tabel 3. Jumlah koloni hasil transformasi yang ditumbuhkan pada medium seleksi serta titernya.

Table 3. The number of colonies resulted from transformation grown on selection media and their titer.

No.	Jumlah koloni <i>Number of colony</i>	Titer cfu ^{*)} /μg DNA
1.	94	3,76 x 10 ⁴
2.	66	2,64 x 10 ⁴
3.	68	2,72 x 10 ⁴
4.	38	1,52 x 10 ⁴
5.	74	2,96 x 10 ⁴
6.	68	2,72 x 10 ⁴
7.	71	2,84 x 10 ⁴
8.	73	2,92 x 10 ⁴
9.	62	2,48 x 10 ⁴
10.	65	2,60 x 10 ⁴
11.	71	2,84 x 10 ⁴
12.	72	2,88 x 10 ⁴
13.	74	2,96 x 10 ⁴
14.	68	2,72 x 10 ⁴
15.	58	2,32 x 10 ⁴
16.	78	3,12 x 10 ⁴
17.	61	2,44 x 10 ⁴
18.	61	2,44 x 10 ⁴
19.	75	3,00 x 10 ⁴
20.	55	2,20 x 10 ⁴
	1352 total koloni <i>total of colonies</i>	2,70 x 10 ⁴ rata-rata titer <i>titer average</i>

*) cfu = colony forming unit

Konstruksi pustaka cDNA dari daun klon karet...



Gambar 5. Amplifikasi contoh koloni dengan primer T7 dan SP6 pada 2% gel agarose dengan pewarnaan etidium bromida. M = 1 kb DNA Ladder. A = DNA dari koloni nomor 11-26, B = DNA dari koloni nomor 48-62, C = DNA dari koloni nomor 80-98, D = DNA dari koloni nomor 192-209, E = DNA dari koloni nomor 224-239, F = DNA dari koloni nomor 1275-1290.

Figure 5. Amplification of selected colonies using primer-pairs T7 and SP6 on 2% agarose gel stained with ethidium bromide. M = 1 kb DNA Ladder. A = DNA from colony no. 11-26, B = DNA from colony no 48-62, C = DNA from colony no 80-98, D = DNA from colony no 192-209, E = DNA from colony no 224-239, F = DNA from colony no 1275-1290.

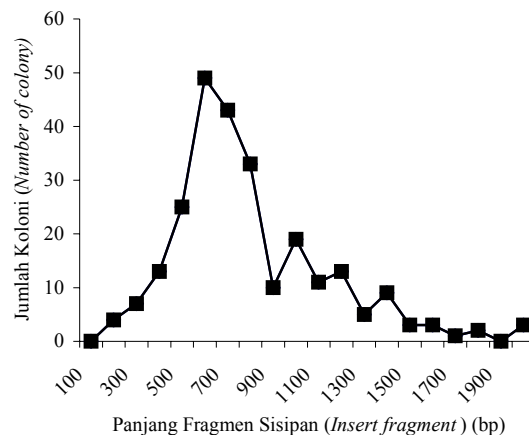
lebih 93% koloni yang telah diperoleh dalam konstruksi pustaka cDNA membawa plasmid yang telah tersisipi dengan fragmen cDNA asal daun karet klon AVROS 2037.

Ukuran fragmen cDNA yang menyisip pada vektor kloning (pGEM[®]-T Easy-Oligo *Sfi*) berkisar antara 200 bp sampai sekitar 2000 bp dengan kisaran ukuran fragmen terbanyak adalah antara 500 – 800 bp (Gambar 7).

Pada saat dilakukan fraksinasi fragmen cDNA, ukuran fragmen terkecil yang teramati pada gel agarose adalah sekitar 500 bp sedangkan ukuran terbesar adalah sekitar 4000 bp (Gambar 3). Adanya fragmen dengan ukuran di bawah 500 bp yang diperoleh dari amplifikasi ini mengindikasikan bahwa fraksinasi juga menghasilkan fragmen cDNA lebih kecil dari 500 bp, namun diduga karena jumlahnya

tidak banyak maka tidak bisa diamati pada gel agarose. Dari 270 koloni yang diamati tersebut belum diperoleh koloni yang membawa plasmid dengan ukuran fragmen cDNA sisipan di atas 2000 bp. Hal ini diduga berhubungan dengan kemudahan penyisipan fragmen pada vektor kloning, dimana fragmen dengan ukuran lebih kecil akan lebih mudah menyisip dibanding fragmen dengan ukuran yang lebih besar.

Secara keseluruhan, keberhasilan konstruksi pustaka cDNA sangat tergantung pada banyak faktor, baik pada tahap isolasi RNA, pemurnian mRNA, sintesis cDNA, kloning fragmen pada vektor, maupun transformasi vektor transforman ke sel bakteri inang. Berbagai metode untuk setiap tahapan tersebut telah dilaporkan, namun pemilihan metode yang akan diaplikasikan sangat tergantung pada kebutuhan serta



Gambar 7. Distribusi ukuran cDNA sisipan pada pustaka cDNA dari daun klon karet AVROS 2037. Sampel terdiri atas 270 koloni yang dipilih secara acak dari pustaka cDNA.

Figure 7. Insert size distribution in cDNA library of AVROS 2037 leaf rubber clone samples of 270 colonies were randomly picked from cDNA library.

tujuan penelitian. Pada tahap isolasi RNA, masalah yang sering dijumpai adalah sulitnya menghilangkan aktivitas RNase yang menyebabkan degradasi RNA. Hal ini biasanya diatasi melalui perlakuan dietil-pirokarbonat (DEPC), baik pada larutan yang digunakan untuk mengisolasi RNA maupun pada peralatan. Sedangkan pada sintesis cDNA kesulitan utama adalah mendapatkan cDNA yang utuh (*full-length cDNAs*) karena seringkali aktivitas enzim *reverse transcriptase* terhenti sebelum seluruh sekuen mRNA ditranskripsi.

Faktor lain yang juga berperan dalam keberhasilan konstruksi pustaka cDNA adalah pemilihan vektor yang sesuai. Pustaka cDNA dapat diklon pada vektor plasmid ataupun bakteriofage, dimana masing-masing sistem memiliki kelebihan dan kekurangan (Das *et al.*, 2001). Namun hal utama yang perlu diperhatikan adalah vektor tersebut harus mudah dimanipulasi, memungkinkan untuk eksisi cDNA sisipan secara mudah serta sesuai dengan metode sekuensing atau hibridisasi yang tersedia saat ini.

Pustaka cDNA asal daun klon AVROS 2037 yang diperoleh dalam penelitian ini pada tahap selanjutnya akan diidentifikasi untuk mendapatkan informasi mengenai keragaman fragmen cDNA yang menyisip. Berdasarkan pengertian pustaka cDNA yang mengarah pada koleksi cDNA yang berbeda, maka tingkat keragaman cDNA yang tinggi akan mencerminkan semakin baiknya pustaka yang dimiliki. Di samping itu pustaka cDNA akan digunakan untuk memperoleh transkrip/cDNA yang utuh, yang berperan dalam resistensi klon AVROS 2037 terhadap cendawan *C. cassiicola*, penyebab penyakit gugur daun pada tanaman karet.

Kesimpulan

Konstruksi pustaka cDNA asal daun karet dari klon AVROS 2037 yang diberi perlakuan patogen *C. cassiicola*, dimulai dengan mengisolasi RNA total dari daun yang diberi perlakuan patogen. Dari setiap gram jaringan daun dapat diisolasi RNA sekitar 300 µg, dan dari jumlah tersebut mRNA dapat dimurnikan sebanyak 0,25%. Kombinasi antara sistem sintesis cDNA dengan sistem kloning menggunakan vektor yang dimodifikasi, telah menghasilkan pustaka cDNA asal daun karet klon AVROS 2037 dengan jumlah 8000 koloni. PCR koloni menggunakan pasangan primer SP6 dan T7 yang dilakukan terhadap 270 koloni yang dipilih secara acak mengindikasikan bahwa sekitar 93% dari koloni tersebut mengandung sisipan cDNA, dengan panjang cDNA sisipan antara 200 - 2000 bp. Ukuran fragmen cDNA terbanyak berkisar antara 500 – 800 bp.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dibiayai oleh Badan Litbang Pertanian melalui Proyek PAATP 2003 dengan No. PL.420.0304.430/P2TP2.

Daftar Pustaka

- Breton, F., C. Sanier, A.J. d'Auzac (2000). Role of cassiicolin, a host-selective toxin, in pathogenicity of *Corynespora cassiicola*, causal agent of a leaf fall disease of *Hevea*. *J. Nat. Rubb. Res.*, **3**(2), 115-128.

- Chee, K.H. (1988). Studies on sporulation, pathogenicity and epidemiology of *Corynespora cassiicola* on *Hevea* rubber. *J. Nat. Rubb. Res.*, **3**(1), 21-29.
- Cowel, I.G. (1998). cDNA Libraries. In: Rapley R, Walker JM (Eds.). *Molecular Biotechnology Handbook*. New Jersey, Humana Press. p. 131-143.
- Das, M., I. Harvey, L.L. Chu, M. Sinha & J. Pelletier (2001). Full-length cDNAs: more than just reaching the ends. *Physiol. Genomics*, **6**, 57-80.
- Glick, B.R. & J.J. Pasternak (1994). *Molecular Biotechnology. Principles and Applications of Recombinant DNA*. Washington DC, ASM Press. 500 pp.
- Gubler, U. & B.J. Hoffman (1983). A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*, **25**, 263-269.
- Hadi, H. (2003). Analisis genetik sifat ketahanan tanaman karet terhadap penyakit gugur daun *Corynespora*. Bogor, Institut Pertanian Bogor. *Ringkasan Disertasi*, 25 p.
- Jayasinghe, C.K. & W.P.K. Silva (1996). Current status of *Corynespora* leaf fall in Sri Lanka. In: *Proc. Workshop on Corynespora Leaf Fall Disease of Hevea rubber*. Medan, 16 – 17 Desember. p, 15 – 19.
- Ji, J.P. & L.A. Loeb (1992). Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase copying RNA *in vitro*. *Biochem.*, **31**, 954-958.
- Kleinsmith, L.J. & V.M. Kish (1995). *Principles of Cell and Molecular Biology*. Second Edition. New York, Harper Collins College Publish. 810 p.
- Manju, M.J., S.P. Idicula, C.K. Jacob, K.K. Vinod, E.E. Prem, M. Suryakumar & R. Kothandaraman (2001). Incidence and severity of *Corynespora* leaf fall (CLF) disease of rubber in coastal Karnataka and North Malabar region of Kerala. *Indian J. Nat. Rubb. Res.*, **14**, 137-141
- Okayama, H. & P. Berg (1982). High-efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol. Cell Biol.*, **2**, 161-170.
- Pawlowski K, R. Kunze, S. de Vries & T. Bisseling (1994). Isolation of total, poly (A) and polysomal RNA from plant tissue. In: S.B. Gelvin & R.A. Shilperoort (Eds.) *Plant Molecular Biology Manual*. Dordrecht, Kluwer Acad Publish., **D5**, 1-13.
- Pusat Penelitian Karet (1992). Hasil rumusan Lokakarya Nasional Pemuliaan Karet. Dalam *Prosiding Lokakarya Nasional Pemuliaan Tanaman Karet*. Medan, 7-9 Desember 1992. 369p
- Roberts, J.D., B.D. Preston, L.A. Johnston, A. Soni, L.A. Loeb & T.A. Kunkel (1989). Fidelity of two retroviral reverse transcriptase during DNA-dependent DNA synthesis *in vitro*. *Mol. Cell Biol.*, **9**, 469-476.
- Rouli, Y. (1987). Studi jaringan terserang cendawan *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt) Wei pada daun tanaman karet *Hevea brasiliensis* Muell. & Arg. klon PPN 2444. Bogor, Jurusan Hama

Konstruksi pustaka cDNA dari daun klon karet...

- dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. 31p. *Laporan*.
- Sambrook, J, E.F. Fritsch & T. Maniatis (1989). *Molecular cloning*. A laboratory manual. Second edition. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sinulingga, W., Suwanto, H. Soepena (1996). Current status of *Corynespora* leaf fall in Indonesia. *In. Proc. Workshop on Corynespora Leaf Fall Disease of Hevea Rubber*. Medan, 16 – 17 Desember 1996, p. 29 – 36.
- Situmorang, A. (2002). Sebaran penyakit gugur daun, virulensi dan genetika *Corynespora cassiicola* asal sentra perkebunan karet Indonesia. Bogor, Program Pascasarjana IPB, 115p. *Disertasi*.
- Tan, H. & A.M. Tan. (1996). Genetic studies of leaf disease resistance in *Hevea*. *J. Nat. Rubb. Res.*, **11**(2),108-114.
- Thomas, M, K.G. Raghothama & J. Jacob (2002). A simple and efficient method for the isolation of total RNA and mRNA from mature leaves of *Hevea brasiliensis*. *Indian J. Nat. Rubb. Res.*, **15**, 93-95.