

**ISOLASI DAN DETEKSI GEN HOMOGLUTATION SINTETASE BINTIL AKAR LEGUM LIAR DENGAN TEKNIK PCR**

***ISOLATION AND DETECTION OF HOMOGLUTATION SINTETASE GENE ON ROOT NODULE OF WILD TYPE LEGUMES USING PCR TECHNIQUE***

**V.F. Aris Budianto dan Sunarpi**  
Fakultas Pertanian, Universitas Mataram

**ABSTRAK**

Rendahnya kadar homoglutation akibat tidak aktifnya enzim homoglutation sintetase, menyebabkan terhambatnya fiksasi nitrogen bintil akar tanaman legum pada kondisi defisit air. Artikel ini melaporkan proses isolasi dan subklon gen homoglutation sintetase (hGSHS) pada bintil akar beberapa jenis legum liar dengan menggunakan pendekatan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Percobaan diawali dengan isolasi DNA genom bintil akar, yang dilanjutkan dengan deteksi gen hGSHS menggunakan teknik PCR. Fragmen DNA produk PCR sesuai panjang basa gen hGSHS (654 bp), dimurnikan dengan kolom PGX (kit invitrogen), dan disubklon pada vector TOPO. Kebenaran keberadaan gen target pada vector dilakukan analisis koloni PCR, dan sequen gen target menggunakan DNA sequencer. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen hGSHS telah berhasil disubklon pada vector TOPO, dengan arah yang sesuai dengan konstruksi yang ditetapkan.

**ABSTRACT**

*Low homogluthation content as a result of inactively homogluthation synthetase, inhibits nitrogen fixation by root nodules of legumes grown under water deficit condition. This article reports the isolation and subcloning process of homogluthation synthetase gene (hGSHS) on root nodules of wild type legumes using PCR technique. The experiment was initiated by the isolation of DNA genom from root nodules of several legumes. Then, hGSHS gene was detected using PCR. Fragment DNA as long as 654 bp (hGSHS gene) was purified using PGX column (Invitrogen kit), and subcloned into TOPO cloning vector. The existance of gene target in the vector, it was confirmed by colony PCR and DNA sequent analysis. The results shown that hGSHS gen was successfully subcloned on TOPO cloning vector whith right direction according to construct has been regulated.*

---

Kata kunci: Gen Homoglutation Sintetase, Bintil Akar, Legum Liar, PCR, Subklon dan Vector TOPO  
Keywords: *Homogluthation Synthetase Gene, Root Nodule, Wild Type Legume, PCR, Subclon and TOPO Vector.*

## PENDAHULUAN

Keberhasilan budidaya kedelai di lahan kering sangat tergantung kepada penguasaan teknologi yang mampu mengeleminir pengaruh negatif berbagai faktor pembatas yang dapat menekan produksi. Terbatasnya ketersediaan air di dalam tanah, merupakan faktor pembatas utama dalam budidaya tanaman kedelai di lahan kering. Hal ini disebabkan karena kondisi tersebut dapat menghambat serapan unsur hara oleh akar tanaman, proses fotosintesis dan proses fiksasi nitrogen (N) oleh bintil akar yang pada akhirnya menyebabkan rendahnya produksi tanaman kedelai.

Proses fiksasi nitrogen (N) bintil akar tanaman kedelai bersifat lebih peka terhadap kondisi defisit air tanah (Serraj dan Sinclair, 1996; Silva *et al.*, 1996) dibandingkan dengan berbagai proses fisiologi yang lain, meskipun respon tersebut bervariasi tergantung varietas tanaman kedelai (Vuong *et al.*, 1996). Dengan demikian, pengendalian proses fiksasi N menjadi sangat penting dalam upaya peningkatan hasil tanaman kedelai per satuan luas pada kondisi defisit air tanah. Hal inilah yang mendorong para peneliti untuk mengkaji topik ini secara lebih mendalam pada dasawarsa terakhir (lihat review Udvardi, 2001).

Sebagaimana halnya respon tanaman pada umumnya, tanaman kedelai juga merespon kondisi defisit air dengan mengakumulasi berbagai metabolit sekunder, seperti asam amino prolin, biotin dan betain (Agboma *et al.*, 1997). Hal ini dilakukan sebagai suatu cara adaptasi tanaman kedelai terhadap kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan melalui pengaturan osmotik (*osmotic adjustment*). Dengan cara demikian potensial air sel akar tanaman kedelai menjadi lebih negatif dari lingkungannya, sehingga plasmolisis dapat dicegah, bahkan sebaliknya pada kondisi tersebut unsur hara dari lingkungan justru dapat diserap oleh akar tanaman. Dengan mengacu kepada pemikiran tersebut, resistensi tanaman kedelai dapat ditingkatkan dengan cara menaikkan kadar metabolit sekunder pada sel-sel akar.

Bintil akar beberapa jenis legum toleran terhadap kondisi defisit air dilaporkan mengakumulasi senyawa homoglutathion dengan kadar yang cukup tinggi (Moran *et al.*, 2000), suatu tripeptida berberat molekul rendah yang banyak mengandung sulfur, seperti halnya biotin dan betain (homosistein). Senyawa tiol tersebut selain berperan dalam pengaturan osmotik, juga dilaporkan berperan penting pada pengendalian kadar oksigen di bintil akar (Matamoros

*et al.*, 1999). Hal ini penting untuk dilakukan mengingat oksigen di satu sisi penting untuk proses respirasi yang menghasilkan ATP, tetapi di sisi yang lain bila kadarnya berlebih menghambat kerja enzim nitrogenase yang berfungsi mengkatalisa reaksi fiksasi gas nitrogen menjadi amonia (Campbell, 1992; Salisbury dan Ross, 1992). Karena itu, kehadiran senyawa tiol tersebut menjadi bersifat sangat kritis dalam proses fiksasi nitrogen oleh bintil akar tanaman legum yang ditumbuhkan pada kondisi kekurangan air.

Sebaliknya, tanaman legum yang sensitif terhadap kondisi defisit air tidak mengakumulasi homoglutathion, melainkan mengakumulasi  $\gamma$ -glutamil sistein ( $\gamma$ -EC), suatu senyawa prekursor homoglutathion (Sunarpi, 2003). Data tersebut memberikan indikasi yang cukup kuat bahwa pada kondisi defisit air bintil akar tidak mampu mengkonversi  $\gamma$ -EC menjadi homoglutathion, mengingat enzim homoglutathion sintetase yang berperan dalam proses konversi tersebut aktivitasnya tidak dapat terdeteksi pada percobaan tersebut (Sunarpi, 2003). Berdasarkan kenyataan tersebut maka kadar homoglutathion bintil akar tanaman legum dapat ditingkatkan pada kondisi defisit air dengan cara mengaktifkan enzim homoglutathion sintetase.

Penggunaan bioteknologi melalui transformasi gen yang mengkode homoglutathion sintetase ke tanaman kedelai atau legum pada umumnya, merupakan pendekatan yang paling memungkinkan untuk dapat meningkatkan produksi kedelai pada lahan kering. Untuk dapat mencapai target tersebut, harus diawali dengan isolasi dan klon gen tersebut menggunakan teknik molekular yang memadai, dari bintil akar legum yang mampu tumbuh pada kondisi air tanah terbatas. Mengingat urutan basa nitrogen lengkap (full sequen DNA) gen tersebut telah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya (Moran *et al.*, 2000), maka penerapan teknik "Polymerase Chain Reaction" (PCR) menggunakan primer spesifik merupakan pendekatan yang paling ideal untuk mendeteksi dan mengklon gen tersebut.

Artikel ini melaporkan proses isolasi dan deteksi gen homoglutathion sintetase bintil akar legum liar menggunakan teknik PCR, yang dilanjutkan dengan subklon gen tersebut pada vector TOPO (TOPO *cloning vector*).

## METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Immunobiologi Universitas Mataram, NTB-Indonesia dan Laboratorium "Molecular and Cellular Signalling", Molecular Biosystem

Centre, Nagoya University, Japan pada Agustus s/d Nopember 2002.

#### Isolasi Total DNA Bintil Akar

Isolasi DNA genom (total DNA) dilakukan sesuai prosedur Sambrook dan Russell (2001). Bintil akar (5 g berat basah) digerus dalam liquid nitrogen sampai terbentuk bubuk halus. Bubuk diekstrak dengan 15 ml buffer yang mengandung 10 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA, 150 mM NaCl. Ekstrak kemudian ditambah 1,2 ml SDS 20%, dan diinkubasi pada 65 °C selama 10 menit. Ekstrak ditambah 5 ml potassium asetat 5 M dan diinkubasi pada es 20 menit. Ekstrak ditransfer ke tabung 50 ml, ditambah 10 ml isopropanol, dan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 20 menit. Setelah felet DNA dikeringkan, dilarutkan dengan 3 ml buffer TE, ditambahkan 20 ul RNAase (10 mg/ml) dan diinkubasi pada 37 °C selama 30 menit. Selanjutnya, ditambahkan 1,5 ml fenolkloroform, dan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit. Lapisan atas ditransfer ke dalam tabung 15 ml, ditambahkan 0,8 volume isopropanol; 0,2 volume 3 M Naasetat, dicampur merata, diinkubasi pada -20 °C selama 1 jam, dan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit. Felet DNA dicuci dengan 1 ml etanol 70%, dan selanjutnya dikeringkan, kemudian dilarutkan dengan 200 ul buffer TE, ditentukan kadarnya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm, dicek keberadaannya dengan elektroforesis (1% gen agarosa) dan ditentukan kemurniannya dengan menghitung rasio absorban pada 260 nm dan 280 nm, dengan asumsi DNA murni memiliki rasio sekitar 1,8-2.

#### Deteksi Gen hGSHS dengan Teknik PCR

DNA yang diisolasi berasal dari lima jenis legum yaitu *Mimosa invisa* Mart (si meduri-duri atau Juhut borang), *Aeshynomene amaricana* L. (tidak dikenal), *Crotalaria anagyroides* H.B.K. (orok-orok), *Desmodium triflorum* D.C. (daun mules atau sisik betok), dan *Crotalaria striata* (kacang giring-giring) sebagai templet untuk mendeteksi gen hGSHS menggunakan PCR. Primer yang digunakan didesain dari sequen gen hGSHS. Sequen primer forward adalah 5'-TCCCCTATACT AGGTTATTGGAAAATT-3', dan sequen primer reverse adalah 5'-TTTTGGAGGATGG TCGCCACCACCAAA-3'. Campuran reaksi terdiri atas templet DNA 2 ul, primer forward 0,5 ul, primer reverse 0,5 ul, dNTP 1 ul, 10x buffer 2 ul, Ex Tag Polimerase 0,5 ul, dan air

13,5 ul, sehingga total volume campuran reaksi 20 ul. Reaksi PCR berlangsung dalam 35 siklus dengan program 94 °C, 2 menit; 94 °C, 0,5 menit; 55 °C, 0,5 menit; 72 °C, 2 menit; 72 °C, 3 menit dan 4 °C tak terhingga. Produk PCR dipisahkan dengan elektroforesis pada 1% gel agarosa.

#### Subklon Produk PCR pada Vektor TOPO

Subklon produk PCR pada "TOPO cloning Vector" diawali dengan pemurnian fragmen target (gen hGSHS) pada gel menggunakan "GFX Colum Purification Kit" yang disuplai oleh Invitrogen. Fragmen target dipotong pada gel dan dimasukkan kedalam tabung effendorp dan ditambahkan 250 ul "buffer capture" kemudian diinkubasi pada suhu 60 °C selama 10 menit sampai gel larut. Sampel ditransfer kedalam kolom GFX, diinkubasi pada suhu kamar selama 1 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 1 menit. Sampel yang terikat pada kolom dicuci dengan 250 ul buffer pencuci, diinkubasi selama 1 menit pada suhu kamar, dan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 1 menit. Kolom GFX yang mengandung fragmen DNA ditransfer ke tabung effendorp baru, dan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 1 menit.

Fragmen DNA target setelah dicek keberadaannya menggunakan elektroforesis pada gel agarosa 1%, diligasi kedalam vector TOPO dengan campuran reaksi terdiri atas fragmen DNA target 3 ul, vector TOPO 1 ul, larutan garam 1 M NaCl 1 ul, dan air 1 ul. Campuran reaksi diinkubasi pada suhu kamar selama 1 jam dan kemudian ditransformasi ke *E. coli* strain XL1-Blue dengan prosedur campuran reaksi diinkubasi didalam es selama 30 menit, 42 °C 1 menit, pada es 1 menit, dan dikulturkan pada media LBA yang mengandung 50 ug/ml ampisilin. Petridis yang mengandung *E. coli* diinkubasi pada suhu 37 °C selama 12 jam.

#### Deteksi Keberadaan Vector dan Fragmen Target pada *E. coli*

Koloni *E. coli* yang mampu tumbuh pada media seleksi yang mengandung antibiotik ampisilin memberikan indikasi bahwa koloni tersebut membawakan vector TOPO, yang membawa gen tahan terhadap ampisilin. Untuk meyakinkan keberadaan vector dengan gen target pada *E. coli* dilakukan analisis PCR dengan menggunakan koloni *E. coli* sebagai DNA templet.

Koloni PCR dilakukan menggunakan primer T7 core, dan primer M13 Reverse. Campuran reaksi PCR dengan total volume 10

ul, terdiri atas primer T7 core 0,25 ul, M13 Reverse 0,25 ul, dNTP 0,5 ul, 10x buffer 1 ul, Ex Tag Polimerase 0,25 ul, dan air 7,75 ul. Reaksi PCR dijalankan seperti program PCR sebelumnya, namun hanya dengan 30 siklus.

Koloni yang positif membawakan vector dan fragmen target dikulturkan pada 3 ml media LB cair yang mengandung 50 ug/ml ampicilin selama 12 jam pada suhu 37 °C. Plasmid diisolasi dengan menggunakan “*miniprep kit*” yang disuplai oleh Promega. Sel dipanen dengan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. Felet (sel) disuspen dengan 300 ul larutan kemudian ditambahkan 300 ul larutan II, ditambahkan 7 ul resin (larutan III), dan diinkubasi pada suhu kamar selama 5 menit. Ditambahkan 300 ul larutan IV, dan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit. Supernatan ditransfer pada kolom, dan disentrifugasi selama 1 menit. DNA yang melekat pada kolom dicuci dengan 700 ul larutan V (Etanol 70%) dan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 1 menit. DNA dicuci lagi dengan 250 ul larutan V, dan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 2 menit. DNA pada kolom dilarutkan dengan 50 ul air, dicek keberadaannya dengan elektroresis (gel 1%), dan ditentukan kadar DNA.

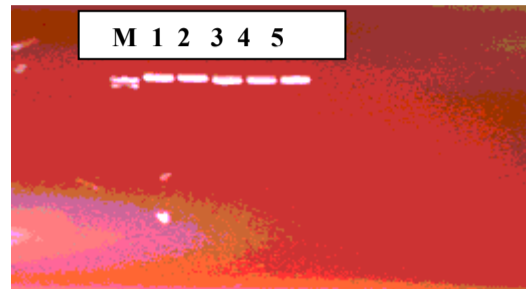
Plasmid yang merupakan kombinasi vector TOPO dengan fragmen target produk PCR (gen hGSHS) disequen untuk membuktikan kebenaran dan arah kloning gen target pada vector. Sequen diawali dengan PCR dengan primer T7 core dan M13-riverse, dan menggunakan program ABI. Produk PCR selanjutnya difelet dengan menambahkan 70 ul Na-O-Asetat, diinkubasi pada -80 °C selama 5 menit, disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit. Felet DNA dicuci dengan etanol 70% dan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 1 menit. Felet selanjutnya dikeringkan dan selanjutnya dilarutkan dengan 15 ul buffer formamida, dipanaskan pada suhu 100 °C selama 2 menit, diinkubasi pada es 2 menit, dan sampel ditransfer pada tabung sequencing. Program sequencing dijalankan sesuai prosedur baku pada mesin DNA sequencer capilar.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### DNA Genom Bintil Akar Beberapa Jenis Legum

Hasil isolasi DNA menunjukkan bahwa DNA genom dapat diisolasi dari bintil akar semua jenis legum liar yang tumbuh dilahan

kering (Gambar 1). Kadar DNA genom hasil isolasi selain cukup tinggi, sekitar 311-329 ng/ul, juga memiliki kemurnian yang cukup tinggi, sekitar 1-9 berdasarkan nilai rasio absorban pada  $\lambda$ 260 dan 280 nm. DNA tersebut selanjutnya dijadikan sebagai cetakan untuk deteksi dan isolasi gen homoglutation sintetase (hGSHS) dengan teknik PCR.

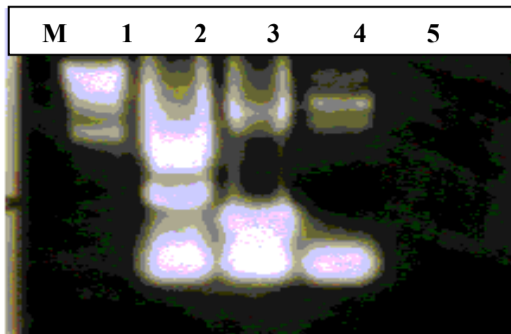


Gambar 1. DNA genom bintil akar beberapa jenis legum liar yang tumbuh di lahan kering. M, DNA marker ( $\chi$ -HindIII); 1, *Crotalaria striata*; 2, *Desmodium triflorum*; 3, *Crotalaria anagyroides*; 4, *Aeshynomene amaricana* L.; 5, *Mimosa invisa*.

### Deteksi Gen hGSHS Bintil Akar dengan Teknik PCR

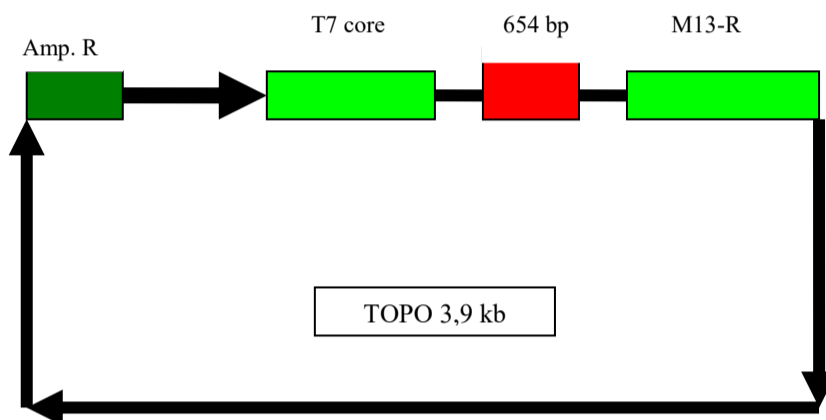
Keberadaan gen hGSHS pada bintil akar beberapa jenis legum dideteksi menggunakan teknik PCR dengan menggunakan DNA genom sebagai cetakan (templet). Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen target didesain dari potongan sequen gen target yang panjangnya 18 basa, baik dari “start codon” (*primer forward*), maupun dari “stop codon” (*primer reverse*).

Hasil amplifikasi DNA menggunakan dua primer tersebut bervariasi diantara bintil akar legum liar (Gambar 2). Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen target (homoglutation sintetase) yang panjangnya 654 bp hanya teramplifikasi pada bintil akar kedelai liar (*Crotalaria striata*). Selain itu, primer tersebut juga mengamplifikasi DNA bintil akar *Desmodium triflorum* dan *Crotalaria anagyroides*, namun kedua fragmen tersebut memiliki ukuran yang lebih kecil dari panjang gen homoglutation sintetase, sehingga dapat dipastikan bahwa kedua fragmen tersebut bukan gen homoglutation sintetase. Primer tersebut bahkan samasekali tidak dapat mengamplifikasi fragmen DNA pada bintil akar *Aeshynomene amaricana* dan *Mimosa invisa*. Berdasarkan data pada Gambar 2 dapat diketahui bahwa gen homoglutation sintetase hanya dikandung oleh kedelai liar (*Crotalaria striata*).



Gambar 2. Fragmen DNA produk PCR yang Teramplifikasi dari DNA Ggenom Bintil Akar Beberapa Jenis Legum Liar yang Tumbuh di Lahan Kering. M, DNA marker ( $\lambda$ -HindIII); 1, *Crotalaria striata*; 2, *Desmodium triflorum*; 3, *Crotalaria anagyroides*; 4, *Aeschynomene americana* L.; 5, *Mimosa invisa*.

Fragmen 654 bp yang merupakan produk PCR tentunya harus dikarakterisasi lebih lanjut untuk membuktikan kebenarannya sebagai gen homoglutation sintetase. Sebagai tahap awal pembuktiannya, fragmen tersebut dimurnikan dengan menggunakan colum PGX dan disubklon kedalam vector TOPO (TOPO cloning vector) sesuai dengan strategi klon pada Gambar 3. Fragmen DNA produk PCR, seperti fragmen 654 bp, umumnya memberikan ujung A, sedangkan vector TOPO memiliki ujung T (Anonim, 2000). Hal ini memungkinkan fragmen 654 bp dimasukkan kedalam vector TOPO tanpa harus didahului dengan pemotongan menggunakan enzim restriksi. Berdasarkan pemikiran tersebut, maka fragmen 654 bp dimasukkan diantara gen pUCori dan gen fl ori, yang masing-masing ujungnya memiliki sisi Eco-R1 (Gambar 3).

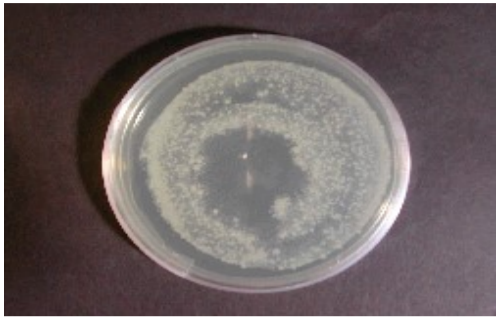


Gambar 3. Konstruksi Subklon Fragmen 654 bp yang Merupakan Gen Homoglutation Sintetase pada Vector TOPO.

Rekombinan DNA seperti konstruksi yang ditunjukkan pada Gambar 3 ditransformasi pada *E. coli* strain XL1 Blue, dan dikulturkan pada media LBA yang mengandung 50 ug/ml ampisilin, sebagai media seleksi. Asumsinya, jika bakteri *E. coli* mampu tumbuh pada media tersebut, berarti bakteri tersebut mengandung rekombinan DNA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa setelah dilakukan transformasi rekombinan DNA, bakteri *E. coli* mampu tumbuh pada media LBA yang mengandung 50 ug/ml (Gambar 4). Hal ini memberikan indikasi bahwa rekombinan DNA ada didalam tubuh bakteri, mengingat rekombinan DNA tersebut membawakan gen ketahanan terhadap antibiotik ampisilin (Gambar 3). Pendekatan menggunakan media seleksi antibiotik seperti ini sudah sangat umum dilakukan di berbagai laboratorium dengan menempatkan gen-gen

ketahanan antibiotik pada vector pembawa gen target (Sambrook dan Russell, 2001).

Namun demikian, keberhasilan bakteri yang membawakan rekombinan DNA untuk tumbuh pada suatu media yang mengandung antibiotik (Gambar 4) tidak sepenuhnya dapat diyakini bila vector mengandung gen target. Hal ini disebabkan bahwa gen ketahanan terhadap antibiotik, seperti ampisilin, kanamisin, hygromisin, dan lain-lain, biasanya terdapat pada vector, sehingga ada kemungkinan bakteri mampu tumbuh pada media seleksi karena didalam tubuhnya hanya ada vector, tanpa ada gen target. Kemungkinan seperti ini biasanya terjadi bila vector (plasmid) meligasi dirinya sendiri (self ligation) dengan membentuk suatu dimer. Karena itu, diperlukan pendekatan tambahan untuk meyakinkan keberadaan gen target bersama plasmid pada tumbuh bakteri.

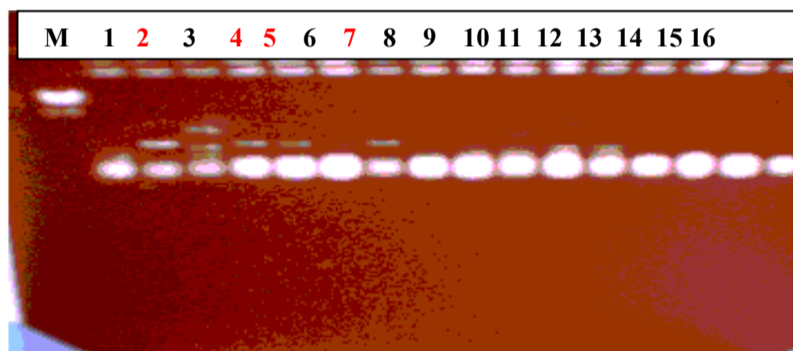


Gambar 4. Koloni *E. coli* strain XL1 Blue yang ditumbuhkan pada media LBA yang mengandung 50 ug/ml ampisilin.

Untuk mengecek kebenaran keberadaan fragmen hGSHS didalam vector TOPO dilakukan koloni PCR menggunakan T7 core dan M13-Rverse sebagai primer. Kedua primer tersebut diharapkan dapat menganeal sisi kiri (*left border*) dan sisi kanan (*right border*) yang merupakan sambungan vector dan fragmen DNA (*junction*). Hasil koloni PCR (Gambar 5) menunjukkan bahwa dari 16 koloni yang diperlakukan dengan PCR maka hanya klon nomor 2, 4, 5 dan 7 yang berindikasi positif

membawakan fragmen 654 bp pada vector TOPO. Di antara koloni yang berindikasi positif tersebut, hanya koloni nomor dua yang memiliki intensitas band yang paling tinggi.

Meskipun demikian, fakta tersebut belum cukup untuk menyatakan kebenaran fragmen 654 bp pada vector TOPO. Karena itu, perlu dilakukan sequen DNA plasmid yang membawakan rekombinan DNA (vector + fragmen 654bp). Langkah ini sangat perlu dilakukan tidak saja untuk membuktikan kebenaran sequen gen hGSHS pada vector TOPO, sekaligus juga untuk membuktikan kebenaran arah konstruksi gen hGSHS pada vector. Sebab bagaimanapun juga, bila arah konstruk keliru, meskipun sequennya benar, gen tersebut tidak dapat ditranskripsi menjadi mRNA, yang pada akhirnya tidak dapat memproduksi protein (enzim) hGSHS. Berdasarkan data sequen (tidak ditunjukkan), maka dapat dipastikan kebenaran keberadaan gen hGSHS pada vector, sekaligus dapat dibuktikan kebenaran arah transkripsi gen pada konstruk seperti ditunjukkan pada Gambar 3. Berdasarkan data sequen dapat dipastikan bahwa klon 4 dan 7 membawakan fragmen yang sequennya sama dengan sequen gen hGSHS.



Gambar 5. Hasil elektroforesis pada gel agarosa 1% hasil analisis koloni PCR menggunakan T7 core dan M13 rverse sebagai primer. Klon nomor 2, 4, 5 dan 7 memberikan indikasi positif membawakan fragmen 654 bp.

#### KESIMPULAN DAN SARAN

Gen hGSHS yang mengkode enzim hGSHS dengan panjang 654 bp telah berhasil diamplifikasi dengan teknik PCR pada bintil akar kacang giring-giring (*Crotalaria striata*). Fragmen produk PCR yang merupakan gen hGSHS berhasil disubklon pada vector TOPO (Topo cloning vector). Kebenaran gen target telah dibuktikan dengan koloni PCR dan sequen DNA.

Mengingat target akhir kegiatan penelitian ini adalah untuk menghasilkan tanaman kedelai transgenik yang mampu memproduksi bintil akar memadai pada kondisi air tanah terbatas, maka gen target yang telah disubklon pada vector TOPO, perlu diklon pada vector biner pSW600, dan ditransformasi ke *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404 sebelum diinfeksi ke tanaman kedelai target. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menunjang program pemerintah untuk menaikkan produksi kedelai pada lahan-lahan kritis.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2000. Instruction manual of TOPO Cloning Vector. Invitrogen Company. California. 22h.
- Agboma, P.C., Sinclair, T.R., Jokinen, K., Peltonen-Sainio, P. dan Pehu, E., 1997. An evaluation of the effect of exogenous glycinebetaine on the growth and yield of soybean: timing of application, watering regimes and cultivars. *Field Crop Sci.* 54:51-64.
- Campbell, N.A., 1992. *Biology*. Third Edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California.
- Matamoros, M.A., Bird, L.M., Escuredo, P.R., Dalton, D.A., Minchin, F.R., Iturbe-Ormaetxe, I., Rubio, M.C., Moran, J.F., Gordon, A.J. dan Becana, M., 1999. Stressed-induced legume root nodule senescence: physiological, biochemical, and structural alterations. *Plant Physiol.* 121:97-111.
- Moran, J.F., Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, M.A., Rubio, M.C., Clemente, M.R., Brewin, N.J. dan Becana, M., 2000. Glutathion and homogluthation synthetases of legum nodules. Cloning, ekspresion and subsellular localization. *Plant Physiol.* 124: 1381-1392.
- Salisbury, F.B., and C.W. Ross. 1992. *Plant Physiology*. Fourth Edition. Wardsworth Publishing Company. Belmont. California. 540 p.
- Sambrook, J. dan Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring harbor Laboratory Press. New York.
- Sneller, C.H. dan Dombek, D., 1997. Use of irrigation in selection for soybean yield potential under drought. *Crop Sci.* 37:1141-1147.
- Serraj, R. dan Sinclair, T., 1996. Processes contributing to N<sub>2</sub>-fixation insensitivity to drought in the soybean cultivar jackson. *Crop Sci.* 36:961-968.
- Silva, M.D., Purcell, L.C. dan King, C.A., 1996. Soybean petiole ureide response to water deficits and decreased transpiration. *Crop Sci.* 36: 611-616.
- Udvardi, M.K., 2001. Legume models strut their stuff. *Mol. Plant Micr. Inter.* 14:6-9.
- Sunarpi, 2003. Akumulasi beberapa metabolit pada sistem perakaran tanaman kedelai yang diberikan nitrogen dan sulfur pada kondisi defisit air. *Jurnal Biologi Tropika* (inpress)
- Vuong, T.D., Nickell, C.D. dan Harper, J.E., 1996. Genetic and allelism of hypernodulation soybean mutants from two genetic backgrounds. *Crop Sci.* 36:1153-1158.

## Lampiran: Sequen gen hGSHS

```

10      19      28      37      46      55
TTA GGT AAC TTG GTC ATG TCC CCT ATA CTA GGT TAT TGG AAA ATT AAG GGC CTT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
L   G   N   L   M   S   P   I   L   G   Y   W   K   I   K   G   L
64      73      82      91      100      109
GTG CAA CCC ACT CGA CTT CTT TTG GAA TAT CTT GAA GAA AAA TAT GAA GAG CAT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
V   Q   P   T   R   L   L   L   E   Y   L   E   E   K   Y   E   E   H
118     127     136     145     154     163
TTG TAT GAG CGC GAT GAA GGT GAT AAA TGG CGA AAC AAA AAG TTT GAA TG GGT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
L   Y   E   R   D   E   G   D   K   W   R   N   K   K   F   E   L   G
172     181     190     199     208     217
TTG GAG TTT CCC AAT CTT CCT TAT TAT ATT GAT GGT GAT GTT AAA TTA ACA CAG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
L   E   F   P   N   L   P   Y   Y   I   D   G   D   V   K   L   T   Q
226     235     244     253     262     271
TCT ATG GCC ATC ATA CGT TAT ATA GCT GAC AAG CAC AAC ATG TTG GGT GGT TGT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
S   M   A   I   I   R   Y   I   A   D   K   H   N   M   L   G   G   C
280     289     298     307     316     325
CCA AAA GAG CGT GCA GAG ATT TCA ATG CTT GAA GGA GCG GTT TTG GAT ATT AGA
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
P   K   E   R   A   E   I   S   M   L   E   G   A   V   L   D   I   R
334     343     352     361     370     379
TAC GGT GTT TCG AGA ATT GCA TAT AGT AAA GAC TTT GAA ACT CTC AAA GTT GAT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Y   G   V   S   R   I   A   Y   S   K   D   F   E   T   L   K   V   D
388     397     406     415     424     433
TTT CTT AGC AAG CTA CCT GAA ATG CTG AAA ATG TTC GAA GAT CGT TTA TGT CAT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
F   L   S   K   L   P   E   M   L   K   M   F   E   D   R   L   C   H
442     451     460     469     478     487
AAA ACA TAT TTA AAT GGT GAT CAT GTA ACC CAT CCT GAC TTC ATG TTG TAT GAC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
K   T   Y   L   N   G   D   H   V   T   H   P   D   F   M   L   Y   D
496     505     514     523     532     541
GCT CTT GAT GTT GTT TTA TAC ATG GAC CCA ATG TGC CTG GAT GCG TTC CCA AAA
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
A   L   D   V   V   L   Y   M   D   P   M   C   L   D   A   F   P   K
550     559     568     577     586     595
TTA GTT TGT TTT AAA AAA CGT ATT GAA GCT ATC CCA CAA ATT GAT AAG TAC TTG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
L   V   C   F   K   R   I   E   A   I   E   P   Q   I   D   K   Y   L
604     613     622     631     640     649
AAA TCC AGC AAG TAT ATA GCA TGG CCT TTG CAG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
K   S   S   K   Y   I   A   W   P   L   Q   G   W   Q   A   T   F   G
658     667     676     685     694     703
GGT GGC GAC CAT CCT CCA AAA TAA ATT AAG AAT GAT TGT TTT AGT AAA CAT TAT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
G   G   D   H   P   P   K   *   I   K   N   D   C   F   S   K   H   Y

```