

ISOLASI GEN-GEN PADA TANAMAN YANG EKSPRESINYA DIINDUKSI OLEH CEKAMAN LINGKUNGAN

Ixora Sartika Mercuriani
Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA UNY

ABSTRAK

Cekaman lingkungan merupakan salah satu faktor penghambat dalam produksi tanaman. Cekaman tersebut dapat berupa cekaman abiotik (misalnya: kekeringan, salinitas, kemasaman, logam berat, dan suhu), ataupun cekaman biotik (misalnya: hama, penyakit dan gulma). Perbaikan sifat tanaman melalui rekayasa genetika atau teknologi tanaman transgenik mulai banyak dikembangkan untuk menghasilkan varietas-varietas baru yang toleran terhadap cekaman lingkungan.

Proses perakitan tanaman transgenik tersebut diawali dengan isolasi gen-gen yang berperan dalam proses difensif/resistensi/toleransi tanaman dalam menghadapi cekaman lingkungan. Isolasi gen dilakukan pada tanaman-tanaman yang toleran baik dari tanaman-tanaman yang sudah didomestikasi maupun dari tipe liar. Gen-gen stres (gen-gen yang ekspresinya diinduksi oleh cekaman lingkungan) inilah yang kemudian digunakan sebagai sumber gen dalam perakitan tanaman transgenik. Berbagai hasil penelitian membuktikan bahwa pada umumnya gen-gen yang terlibat dalam proses toleransi tersebut adalah gen-gen yang menyandikan Metallothionein Like Protein (MT), Bowman Bick Proteinase Inhibitors (BBPI), Peroksidase (PER), Superoxide Dismutase (SOD), Glutathion S-transferase (GST), dan Catalase. Makalah ini bertujuan untuk mengkaji prinsip isolasi gen-gen yang ekspresinya diinduksi oleh cekaman lingkungan melalui teknik “differential screening” (penapisan diferensial).

Kata kunci: cekaman lingkungan, resistensi/toleransi tanaman, isolasi gen, penapisan diferensial

PENDAHULUAN

Cekaman lingkungan (stres) pada tanaman dapat didefinisikan sebagai faktor eksternal yang berpengaruh buruk (tidak menguntungkan) pada tanaman (Taiz *et al.*, 1991:346). Faktor tersebut dapat bersifat biotik maupun abiotik. Cekaman biotik dapat berupa hewan pengganggu/pemakan tanaman, mikroba patogen, dan gulma (tanaman pengganggu); sedangkan cekaman abiotik diantaranya adalah kakeringan, salinitas, kemasaman, logam berat, dan suhu lingkungan yang ekstrim. Cekaman pada tanaman biasanya diukur dalam hubungannya dengan pertumbuhan (akumulasi biomasa) atau dengan proses-proses asimilasi primer (seperti: penyerapan CO₂ dan mineral) yang berpengaruh terhadap seluruh pertumbuhan. Kondisi lingkungan yang

berpengaruh buruk terhadap pertumbuhan suatu tanaman belum tentu juga berpengaruh buruk terhadap tanaman yang lain. Kemampuan tanaman menghadapi kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan bagi pertumbuhannya inilah yang disebut sebagai resistensi/toleransi tanaman.

Mekanisme resistensi/toleransi tanaman dalam menghadapi kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan menjadi salah satu topik penelitian yang berkembang pada saat ini. Studi mengenai proses fisiologi, biokimia, biologi, maupun genetika molekuler dilakukan untuk mengetahui mekanisme resistensi/toleransi tanaman secara utuh. Studi genetika menjadi bidang kajian yang sangat menarik mengingat mekanisme resistensi/toleransi dari setiap tanaman dikontrol/dikendalikan oleh faktor genetik yang dimilikinya.

Tahap awal dalam studi genetika molekuler dilakukan dengan pengisolasian/pengklonan gen-gen tanaman yang diduga mengontrol mekanisme resistensi/toleransi tanaman dalam menghadapi stress. Pengklonan (*cloning*) merupakan suatu upaya/usaha (dari kumpulan teknik-teknik eksperimental) untuk mengisolasi, mengidentifikasi, dan melipatgandakan suatu fragmen dari materi genetik (DNA) dalam bentuk aslinya (Anwar, 1999:4). Gen-gen yang berperan dalam mekanisme tersebut bersifat “*inducible*”, artinya ekspresi dari gen-gen tersebut diinduksi oleh kondisi tertentu (dalam hal ini berupa cekaman). Beberapa contoh dari gen-gen tersebut yang telah berhasil diisolasi adalah gen-gen pengkode Metallothionein Like Protein (MT), Bowman Birk Proteinase Inhibitors (BBPI), Glutathione S-transferase (GST), Blue Copper Binding Protein (BCB), Superoxide Dismutase (SOD), Oxigen Oxidoreductase, Peroxidase (PER), dan Pathogenesis-related (PR) protein (Snowden dan Gardner, 1993; Richard dan Gardner, 1994; Richard *et al.*, 1994; Snowden *et al.*, 1995, Richard *et al.*, 1998; Cruz-Ortega dan Ownby, 1993). Beberapa gen yang terlibat dalam mekanisme resistensi/toleransi merupakan gen-gen yang umum diekspresikan tanaman dalam kondisi stres, namun beberapa gen secara spesifik diekspresikan pada kondisi cekaman lingkungan tertentu.

Ekspresi suatu gen ditandai oleh terbentuknya messenger RNA (mRNA). Gen-gen yang berperan dalam mekanisme resistensi/toleransi termasuk didalam kelompok gen-gen yang ekspresinya tergulasi/terinduksi. Gen-gen tersebut pada umumnya hanya diekspresikan/diekspresikan secara berlebih (overexpression) bila tanaman (dalam pertumbuhan/perkembangannya) mengalami kondisi cekaman lingkungan tertentu. Isolasi terhadap gen-gen inducible dilakukan melalui suatu teknik penapisan diferensial (*differential screening*). Penanaman tanaman pada kondisi cekaman tertentu akan menginduksi transkripsi mRNA dari gen-gen yang diduga berperan dalam mekanisme resistensi/toleransi tanaman terhadap cekaman tersebut. Penapisan diferensial dilakukan dengan menapis (mengisolasi) gen-gen yang diekspresikan oleh tanaman tertentu pada kondisi tercekam tetapi **tidak** diekspresikan oleh tanaman tersebut pada kondisi lingkungan yang optimum untuk pertumbuhannya.

Langkah-langkah yang harus dilakukan untuk mengisolasi gen-gen tanaman yang ekspresinya diinduksi oleh cekaman lingkungan menurut Anwar (1999) adalah sebagai berikut:

1. Penanaman
2. Konstruksi cDNA:
 - Isolasi RNA total
 - Pemurnian mRNA dan sintesis cDNA
 - Transformasi cDNA pada vektor
 - Penapisan Transforman dan vektor Rekombinan
3. Penapisan diferensial pustaka cDNA
4. Konfirmasi cDNA target

Hasil dari studi genetik tersebut dapat dijadikan sebagai sumber informasi sekaligus sebagai sumber genetik dalam pembuatan/pengembangan varietas-varietas tanaman baru yang mempunyai resistensi/toleransi yang luas terhadap stres/cekaman lingkungan.

PEMBAHASAN

Fisiologi Cekaman (Stres) pada Tanaman

Menurut Taiz dan Zeiger (1991:346), stres (cekaman) pada tanaman adalah faktor eksternal yang tidak menguntungkan yang berpengaruh pada kehidupan suatu tanaman. Kondisi stres pada tanaman biasanya diukur berdasarkan kaitannya terhadap pertumbuhan (akumulasi biomasa) atau proses-proses asimilasi primer (penyerapan CO_2 dan mineral). Sebagai contoh, tanaman yang diberi air dan pupuk dalam jumlah yang sangat besar akan tumbuh dengan sangat tinggi sehingga menjadi tidak tahan terhadap tiupan angin kencang dan mudah tumbang. Hal ini mengakibatkan tanaman tersebut pada akhirnya tidak menghasilkan produk yang dapat dipanen. Sebaliknya, pertumbuhan tanaman yang diberi air dan pupuk lebih sedikit dapat tumbuh optimal dengan tinggi tanaman lebih rendah sehingga lebih tahan terhadap tiupan angin kencang dan tidak tumbang. Pada kondisi tersebut pemberian air dan pupuk dalam jumlah yang lebih rendah ternyata lebih menguntungkan karena tanaman yang tidak tumbang tersebut dapat menghasilkan produk yang dapat dipanen. Dalam hal ini, keberadaan air dan pupuk dalam jumlah banyak merupakan stres (cekaman) bagi tanaman.

Tanaman, baik dalam habitat alaminya maupun di dalam pertanian, selalu dikelilingi oleh cekaman lingkungan, baik cekaman biotik maupun abiotik. Cekaman biotik dapat berupa hewan pengganggu/pemakan tanaman, mikroba patogen, dan gulma (tanaman pengganggu); sedangkan cekaman abiotik dapat berupa kekeringan, salinitas, kemasaman, logam berat, dan suhu. Hampir pada seluruh ekosistem mengandung berbagai varietas/galur bakteri, fungi, nematoda, tungau, serangga, dan hewan yang berpotensi sebagai hama atau penyakit bagi tanaman. Secara alamiah tanaman tidak mampu berpindah/bergerak (seperti hewan) untuk menghindari cekaman yang terdapat pada lingkungan hidupnya, tetapi tanaman mempunyai mekanisme tersendiri untuk mempertahankan/melindungi dirinya (**resistensi/toleransi tanaman**). Produksi kutikula dan peridermis yang bertujuan untuk menghambat pengeluaran air dari sel/jaringan tanaman ternyata juga dapat

dimanfaatkan untuk menghambat masuknya fungi dan/atau bakteri. Adanya duri, bulu-bulu halus yang menyengat, dan permukaan daun yang kasar dapat dimanfaatkan tanaman sebagai sistem pertahanan diri agar tidak dimakan hewan. Beberapa tanaman juga mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang bersifat racun. Senyawa tersebut digunakan tanaman untuk membunuh atau menghalau/mengusir hewan pemakan tumbuhan ataupun mikroba pathogen.

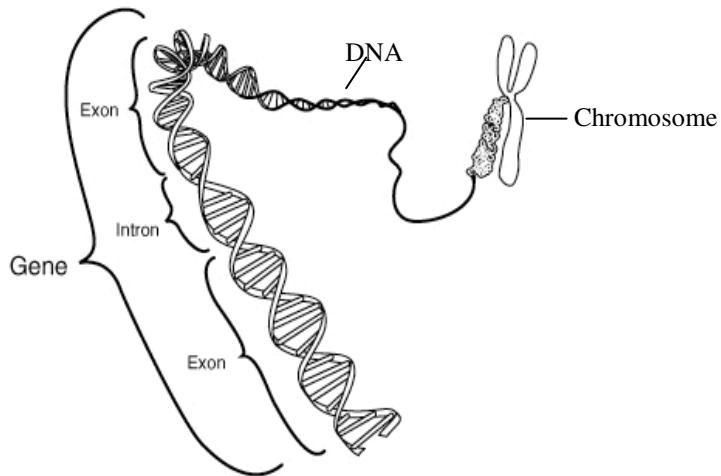
Beberapa mekanisme juga terjadi pada tanaman untuk mentolerir kondisi lingkungan abiotik yang kurang menguntungkan (toleransi tanaman). Taiz dan Zeiger (1991:348-349) mengatakan bahwa cekaman kekeringan pada tanaman dapat merangsang absisi (pengguguran) daun untuk mengurangi penguapan atau pemanjangan akar untuk meningkatkan penyerapan air oleh tanaman pada lapisan tanah yang lebih dalam. Mekanisme tersebut bertujuan untuk mempertahankan keseimbangan air dalam tubuh tanaman sehingga tanaman tetap dapat hidup dengan baik. Mekanisme resistensi/toleransi tanaman terhadap kekeringan pada umumnya hampir sama dengan mekanisme resistensi/toleransi tanaman terhadap suhu tinggi. Pelapisan lilin pada permukaan tanaman (biasanya pada permukaan daun dan batang), penggulungan daun, dan orientasi vertikal pada pertumbuhan daun merupakan mekanisme resistensi/toleransi tanaman terhadap kedua jenis cekaman tersebut.

Mekanisme resistensi/toleransi tanaman menghadapi cekaman lingkungan sangat ditentukan oleh faktor genetis. Tanaman yang resisten mempunyai mekanisme resistensi yang jauh lebih baik dibanding tanaman yang sensitif. Sebagai contoh, tanaman *Passiflora maliformis* yang sensitif terhadap suhu rendah mempunyai komposisi lipid bilayer pada membran sel yang kaya akan asam lemak jenuh. Komposisi tersebut dapat mengakibatkan membran cepat membeku/mengkristal/solid pada suhu lingkungan yang rendah. Kondisi tersebut mengakibatkan protein transmembran yang ada tidak dapat berfungsi secara optimal sehingga transport ion, transduksi energi, serta metabolisme yang dikatalisis oleh enzim yang terdapat pada membran menjadi terganggu. Tanaman *Passiflora caerulea* mempunyai komposisi membran sel yang kaya akan asam lemak tak jenuh, sehingga pada suhu lingkungan

rendah, membran dapat mempertahankan fluiditasnya. Kondisi tersebut mangakibatkan aktivitas metabolisme dalam sel dapat berjalan normal meskipun suhu lingkungannya rendah. Dalam hal ini, kemampuan suatu tanaman untuk mengatur komposisi lipid bilayer yang menyusun membran sel merupakan mekanisme resistensi/toleransi tanaman. Kemampuan tersebut ditentukan oleh enzim-enzim yang ada, sedangkan keberadaan enzim dikontrol oleh gen-gen yang dimiliki oleh masing-masing tanaman.

Gen dan Ekspresi gen

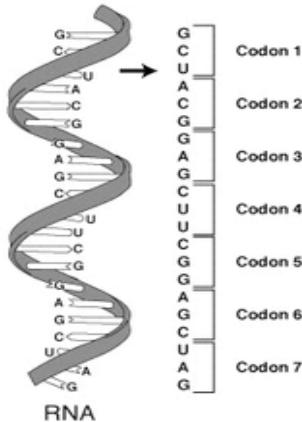
Gen merupakan bagian dari genom (material genetik) yang berupa DNA atau RNA dan berfungsi untuk mengontrol perkembangan fisik maupun perilaku dari setiap mahluk hidup (Gambar 1). Gen digunakan sebagai model atau ruas penyandi dalam pembentukan protein. Proses penterjemahan sekuen DNA yang terdapat dalam gen menjadi protein disebut sebagai **ekspresi gen** (Jusuf, 2001:198-199).



Gambar 1. Ilustrasi posisi gen dalam genom

Ekspresi gen berlangsung melalui beberapa tahapan, yaitu: transkripsi DNA membentuk mRNA (massenger RNA), modifikasi pasca transkripsi, dan translasi (penterjemahan mRNA membentuk protein) (Gambar 3). Proses tersebut kemudian dilanjutkan dengan pelipatan, modifikasi, dan pentargetan protein. Penterjemahan mRNA membentuk protein dapat terjadi karena adanya kode genetik yang dibaca

berdasarkan urutan 3 basa (kodon) (Gambar 2). Setiap kodon menyandikan satu asam amino yang merupakan monomer dari protein (Tabel 1)



Gambar 2. Contoh kodon dalam suatu rantai RNA



Gambar 3. Dogma pokok pembentukan protein

Tabel 1. Macam-macam kodon (64 macam) dan asam amino yang dikodenya

		Basa kedua			
		U	C	A	G
Basa pertama	U	UUU (Phe/F) <u>Phenylalanine</u> UUC (Phe/F) <u>Phenylalanine</u> UUA (Leu/L) <u>Leucine</u> UUG (Leu/L) <u>Leucine</u>	UCU (Ser/S) <u>Serine</u> UCC (Ser/S) <u>Serine</u> UCA (Ser/S) <u>Serine</u> UCG (Ser/S) <u>Serine</u>	UAU (Tyr/Y) <u>Tyrosine</u> UAC (Tyr/Y) <u>Tyrosine</u> UAA Ochre (<i>Stop</i>) UAG Amber (<i>Stop</i>)	UGU (Cys/C) <u>Cysteine</u> UGC (Cys/C) <u>Cysteine</u> UGA Opal (<i>Stop</i>) UGG (Trp/W) <u>Tryptophan</u>
	C	CUU (Leu/L) <u>Leucine</u> CUC (Leu/L) <u>Leucine</u> CUA (Leu/L) <u>Leucine</u> CUG (Leu/L) <u>Leucine</u>	CCU (Pro/P) <u>Proline</u> CCC (Pro/P) <u>Proline</u> CCA (Pro/P) <u>Proline</u> CCG (Pro/P) <u>Proline</u>	CAU (His/H) <u>Histidine</u> CAC (His/H) <u>Histidine</u> CAA (Gln/Q) <u>Glutamine</u> CAG (Gln/Q) <u>Glutamine</u>	CGU (Arg/R) <u>Arginine</u> CGC (Arg/R) <u>Arginine</u> CGA (Arg/R) <u>Arginine</u> CGG (Arg/R) <u>Arginine</u>
	A	AUU (Ile/I) <u>Isoleucine</u> AUC (Ile/I) <u>Isoleucine</u> AUA (Ile/I) <u>Isoleucine</u> AUG (Met/M) <u>Methionine, Start</u> ¹	ACU (Thr/T) <u>Threonine</u> ACC (Thr/T) <u>Threonine</u> ACA (Thr/T) <u>Threonine</u> ACG (Thr/T) <u>Threonine</u>	AAU (Asn/N) <u>Asparagine</u> AAC (Asn/N) <u>Asparagine</u> AAA (Lys/K) <u>Lysine</u> AAG (Lys/K) <u>Lysine</u>	AGU (Ser/S) <u>Serine</u> AGC (Ser/S) <u>Serine</u> AGA (Arg/R) <u>Arginine</u> AGG (Arg/R) <u>Arginine</u>
	G	GUU (Val/V) <u>Valine</u> GUC (Val/V) <u>Valine</u> GUA (Val/V) <u>Valine</u> GUG (Val/V) <u>Valine</u>	GCU (Ala/A) <u>Alanine</u> GCC (Ala/A) <u>Alanine</u> GCA (Ala/A) <u>Alanine</u> GCG (Ala/A) <u>Alanine</u>	GAU (Asp/D) <u>Aspartic acid</u> GAC (Asp/D) <u>Aspartic acid</u> GAA (Glu/E) <u>Glutamic acid</u> GAG (Glu/E) <u>Glutamic acid</u>	GGU (Gly/G) <u>Glycine</u> GGC (Gly/G) <u>Glycine</u> GGA (Gly/G) <u>Glycine</u> GGG (Gly/G) <u>Glycine</u>

Studi Genetika Molekuler Respon Tanaman terhadap Cekaman

Studi mengenai respon molekuler tanaman terhadap cekaman lingkungan berperan penting untuk lebih memahami mekanisme resistensi/toleransi tanaman. Mekanisme tersebut masih belum sepenuhnya diketahui dengan jelas. Pada tingkat perkembangan tanaman, mekanisme tersebut sangat kompleks dan melibatkan banyak gen; tetapi pada tingkat biokimia sel, mekanisme yang terjadi bisa sederhana dan mungkin hanya melibatkan satu gen. Pengisolasian/pengklonan gen-gen yang terlibat dalam mekanisme tersebut merupakan langkah awal yang perlu dilakukan dalam studi molekuler.

Strategi pengklonan gen dimulai dari suatu upaya mengisolasikan suatu fragmen DNA/gen dari suatu pustaka DNA (Anwar, 1999:13). Terdapat dua jenis pustaka DNA, yaitu:

1. *pustaka cDNA* yang merupakan kumpulan potongan DNA sebagai duplikat dari suatu populasi mRNA sehingga hanya terdiri dari populasi sekuens DNA aktif pengkode protein
2. *pustaka genom* yang merupakan kumpulan potongan DNA dari seluruh genom sehingga disamping mengandung urutan DNA yang berekspresi maupun yang tidak berekspresi

Gen-gen yang berperan dalam mekanisme resistensi/toleransi termasuk didalam kelompok gen-gen yang ekspresinya tergulasi/terinduksi. Gen-gen tersebut pada umumnya hanya diekspresikan/diekspresikan secara berlebih (overexpression) bila tanaman (dalam pertumbuhan/perkembangannya) mengalami kondisi cekaman lingkungan tertentu. Pengisolasian gen-gen tersebut dapat dilakukan melalui suatu teknik “penapisan diferensial” (*differential screening*) dengan tahapan kerja sebagai berikut:

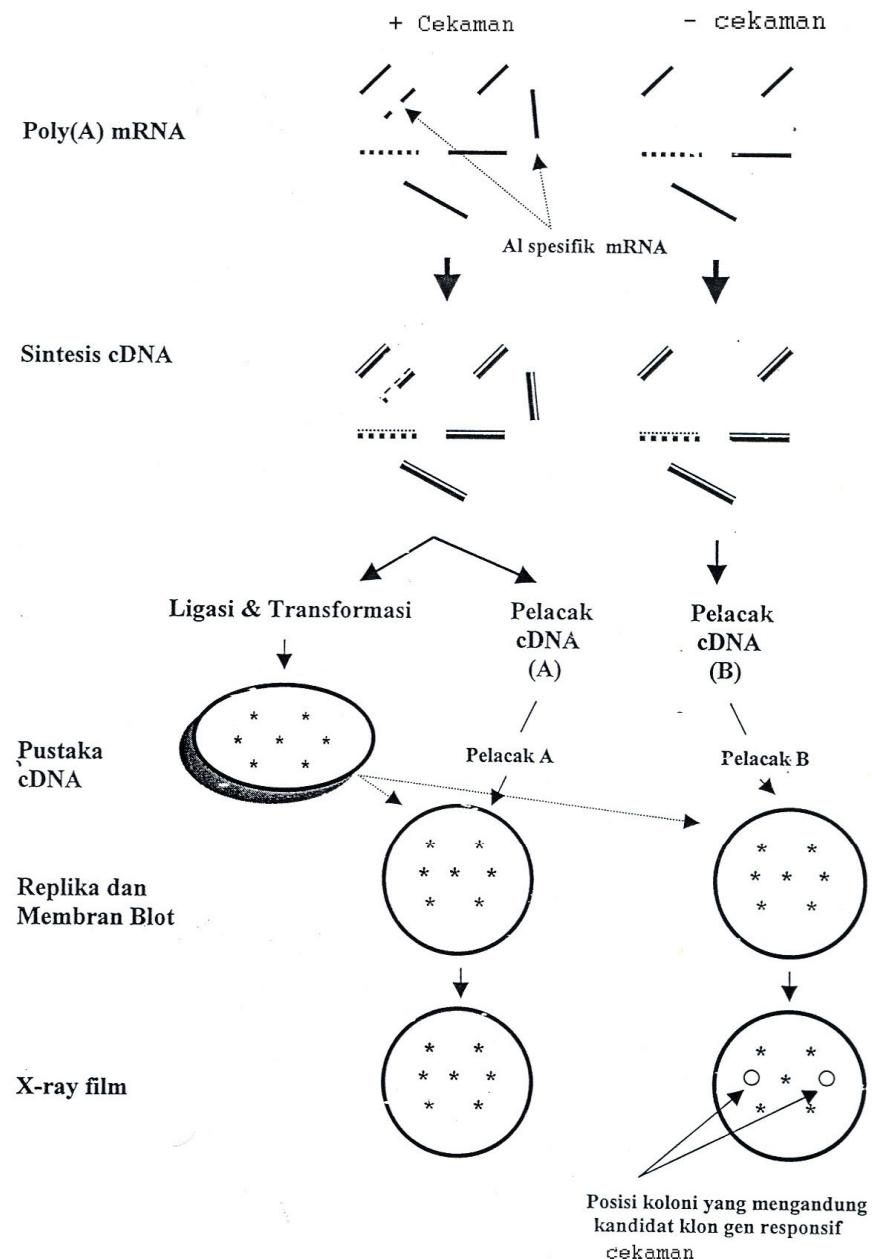
1. Penanaman tanaman yang gennya akan diisolasi. Penanaman dilakukan dengan dua perlakuan, yaitu: penanaman pada kondisi cekaman tertentu (misalnya: bila gen yang akan diisolasi merupakan gen yang berperan dalam mekanisme

resistensi/toleransi tanaman terhadap cekaman kekeringan maka tanaman harus ditanam pada kondisi kritis air) dan penanaman tanpa cekaman sebagai kontrol. Pada prinsipnya, gen yang menjadi sasaran harus diinduksi untuk berekspresi. Penentuan kadar cekaman didasarkan pada pemberian cekaman yang menunjukkan adanya gejala hambatan fisiologis.

2. RNA total yang dihasilkan dari proses ekspresi gen diisolasi dari tanaman, baik yang diberi cekaman maupun yang tidak. Isolasi RNA dilakukan terhadap jaringan tanaman yang menunjukkan respon fisiologis tanaman terhadap cekaman (misalnya: pada kondisi kekeringan; tanaman akan diinduksi untuk melakukan pemanjangan akar sebagai bentuk toleransinya, dengan demikian isolasi RNA dilakukan terhadap akar tanaman).
3. Pemurnian mRNA dari RNA total. Di dalam sel tanaman terdapat 3 macam RNA, yaitu: mRNA, rRNA, dan tRNA. Diantara ketiga jenis RNA tersebut hanya mRNA yang digunakan sebagai cetakan dalam pembentukan protein. Salah satu teknik yang dapat digunakan untuk mengisolasi mRNA dari RNA total adalah dengan menggunakan “Oligo(dT) Cellulose Column Chromatography” dari Pharmacia (Anwar, 1999:25). Dengan teknik tersebut, mRNA (pada sebagian besar mRNA eukaryot membawa segmen DNA poli A) akan ditangkap oleh oligo (dT). Seperti dalam aturan pasangan basa, maka basa Adenin (A) akan berikatan dengan Timin (T). mRNA yang berhasil ditangkap tersebut kemudian dimurnikan lagi dari molekul-molekul lain yang masih tercampur selama proses isolasi dengan menggunakan teknik pengendapan. mRNA yang dihasilkan merupakan kumpulan berbagai jenis mRNA hasil transkripsi dari seluruh gen yang terekspresi pada saat isolasi dilakukan.
4. Sintesis cDNA dengan menggunakan cetakan mRNA yang sudah murni (transkripsi balik) dapat dilakukan dengan teknik RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction). Prinsip kerja dari teknik tersebut mirip dengan proses transkripsi balik pada daur hidup virus RNA.

5. Pembuatan pustaka cDNA. Kegiatan ini diawali dengan menyisipkan cDNA yang dihasilkan ke dalam vektor kloning, misalnya: plasmid. Sampai dengan tahap ini, pustaka cDNA yang berupa kumpulan plasmid rekombinan terdiri dari dua kelompok, yaitu pustaka cDNA dari tanaman yang diberi cekaman (pustaka cDNA A) dan pustaka cDNA dari tanaman yang tidak diberi cekaman (pustaka cDNA B).
6. Kedua kelompok pustaka cDNA kemudian ditransformasikan ke dalam sel bakteri dengan reaksi terpisah.
7. Hasil transformasi bakteri (bakteri rekombinan) kemudian ditanam pada media seleksi padat. Setelah bakteri rekombinan tumbuh, maka dibuat dua buah replika. Dengan menggunakan teknik hibridisasi southern, replika pertama dilacak dengan menggunakan pelacak cDNA A dan replika kedua dilacak menggunakan pelacak cDNA B.
8. Hasil hibridisasi kemudian ‘diekspose’ pada suatu film X-ray dan dideteksi. Bakteri rekombinan yang menghasilkan sinyal positif pada pelacakan dengan menggunakan pelacak DNA A tetapi menghasilkan sinyal negatif pada pelacakan dengan menggunakan pelacak cDNA B merupakan bakteri yang membawa kandidat klon gen yang berperan dalam mekanisme resistensi/toleransi tanaman. Istilah kandidat gen digunakan karena belum tentu semua gen yang ekspresinya diinduksi oleh cekaman lingkungan merupakan gen-gen yang berperan dalam mekanisme resistensi/ toleransi tanaman, sehingga diperlukan analisis lebih lanjut untuk membuktikannya.

Proses isolasi dengan teknik penapisan diferensial tersebut dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Ilustrasi Teknik Penapisan Diferensial (differential screening)

Gen-gen yang diinduksi oleh Cekaman Lingkungan

Beberapa gen yang terlibat dalam mekanisme resistensi/toleransi tanaman terhadap cekaman lingkungan telah berhasil diisolasi. Diantara gen-gen tersebut

adalah gen-gen pengkode Metallothionein Like Protein (MT), Bowman Birk Proteinase Inhibitors (BBPI), Glutathione S-transferase (GST), Blue Copper Binding Protein (BCB), Superoxide Dismutase (SOD), Oxigen Oxidoreductase, Peroxidase (PER), dan Pathogenesis-related (PR) protein (Snowden dan Gardner, 1993; Richard dan Gardner, 1994; Richard *et al.*, 1994; Snowden *et al.*, 1995, Richard *et al.*, 1998; Cruz-Ortega dan Ownby, 1993).

Snowden dan Gardner (1993: 855-861) serta Richard *et al* (1994: 1455-1456) telah berhasil mengisolasi tujuh gen yang ekspresinya diinduksi oleh cekaman aluminium (Al) dari tanaman gandum. Gen-gen tersebut adalah: *wali1*, *wali2*, *wali3*, *wali4*, *wali5*, *wali6*, dan *wali7*. *wali1* merupakan gen yang memiliki homologi dengan gen penyandi Metallothionein (MT) dari hewan ataupun fungi. MT diketahui merupakan protein yang kaya sistein. Protein tersebut terlibat dalam mekanisme toleransi terhadap logam berat melalui detoksifikasi (pengikatan) logam. Beberapa klon cDNA yang diisolasi dari berbagai tanaman (seperti : arabisopsis, kedelai, dan kubis-kubisan) yang diberi cekaman logam ternyata juga memiliki homologi dengan gen MT (Kawashima *et al.*, 1991; Zhou dan Goldsborough, 1994; dan Kim *et al.*, 1995). *wali2* merupakan gen baru yang juga menyandi protein yang kaya sistein, namun tidak memiliki homologi dengan gen manapun yang ada pada data base. Tidak seperti gen *wali* yang lain, *wali2* hanya ditemukan pada kultivar yang sensitif. *wali3* dan *wali5* menyandi protein yang hampir sama, yaitu protein yang memiliki homologi dengan Bowman-Birk Proteinase Inhibitors (BBPI). *wali4* menyandi protein yang memiliki homologi dengan Phenylalanine amonia-lyase (PAL). Ekspresi PAL pada tanaman dipengaruhi oleh perkembangan dan berbagai cekaman lingkungan. Berbagai metabolit tanaman yang disintesis melalui jalur 'down-stream' dari PAL, termasuk flavonoid dan antosianin, mempunyai afinitas yang tinggi terhadap Al. *wali6* mirip dengan *wali3* dan *wali5* yang menyandi BBPI. *wali7* memiliki sekuen yang belum lengkap, namun memiliki 39% kemiripan dengan gen pada tembakau.

Anwar (1999) telah berhasil mengisolasi 6 gen yang ekspresinya diinduksi oleh Al dari tanaman kedelai kultivar Lumut, yaitu : *gmali1*, *gmali14*, *gmali20*, *gmali49*, *gmali50*, dan *sapali*. *gmali1* menyandikan ATPase-proton Membran Plasma yang berperan dalam pengadaan energi dalam bentuk ATP. *gmali14* menyandikan protein histon H3. Protein histon H3 bersama protein histon lainnya (H1, H2A, H2B, H4, dan H5) dan protein non histon berperan dalam membentuk struktur nukleosom/kromatin pada saat sel membelah. *gmali20* menyandikan Katalase yang berperan sebagai antioksidan. *gmali49* menyandikan Dehydrogenase NADH. Dehydrogenase NADH merupakan salah satu enzim yang berperan dalam transfer elektron dalam proses oksidasi-reduksi untuk penyediaan sumber energi yang dibutuhkan dalam metabolisme tanaman. *gmali50* menyandikan Auxin Induced Protein, sedangkan *sapali* menyandikan Peptidase Aminoacyl.

Graham *et al.* (2003:141-149) telah berhasil mengisolasi 5 gen dari tanaman kedelai yang ekspresinya diinduksi oleh pelukaan dan elicitor glukan dari dinding sel *Phytophthora sojae*. Gen-gen tersebut merupakan famili (kelompok) gen-gen 'pathogenesis-related protein' (PR protein), yaitu: elicitor releasing endoglucanase (GLU/PR-2), WIN-like protein (WIN/PR-4), Kunitz trypsin inhibitor (KTI, PR6), PR1a, dan PR10. Protein PR telah dilaporkan memegang peran penting dalam mekanisme resistensi pada berbagai tanaman. Penelitian terhadap tanaman tembakau menunjukkan bahwa ekspresi gen-gen protein PR juga diinduksi oleh infeksi virus. Gen PR-1a yang diisolasi dari tanaman tembakau, meskipun fungsinya belum diketahui dengan jelas, namun terbukti terlibat dalam mekanisme resistensi (SAR: systemic acquired resistance) pada tanaman tembakau (Uknes *et al.*, 1993:159-169)

Protein inhibitor proteinase dari tanaman (Pls) merupakan protein yang berperan dalam mekanisme difensif (pertahanan diri) tanaman terhadap predator ataupun pathogen (Lawrence dan Koundal, 2002). Isolasi terhadap gen-gen Pls telah dilakukan dan dimanfaatkan untuk mengkonstruksi tanaman transgenik yang resisten terhadap predator atau pathogen sebagai bagian dari program pengendalian hama dan penyakit. Lawrence dan Koundal (2002) mengatakan bahwa konstruksi tanaman

transgenik tersebut dimaksudkan untuk menghasilkan tanaman yang resisten terhadap serangan serangga phytophagous.

PENUTUP

Isolasi gen-gen yang ekspresinya diinduksi oleh cekaman lingkungan merupakan langkah awal dalam studi molekuler mengenai mekanisme resistensi/toleransi tanaman terhadap cekaman lingkungan, baik cekaman biotik maupun abiotik. Pemberian cekaman disesuaikan dengan target gen yang akan diisolasi. Isolasi dapat dilakukan dengan teknik penapisan gen secara diferensial (differential screening). Differential screening merupakan teknik penapisan gen melalui proses hibridisasi Southern dengan menggunakan 2 pelacak, yaitu: pustaka cDNA dari tanaman yang diberi cekaman dan pustaka cDNA dari tanaman yang tidak diberi cekaman

Isolasi seharusnya dilakukan baik pada jenis-jenis tanaman yang resisten/toleran maupun yang sensitif. Hal ini untuk melihat model regulasi gen pada kedua jenis tanaman tersebut. Model/sistem regulasi gen yang terlibat dalam mekanisme resistensi/toleransi tanaman dapat dijadikan sebagai sumber informasi sekaligus sebagai sumber genetik dalam pembuatan/pengembangan varietas-varietas tanaman baru yang mempunyai resistensi/toleransi yang luas terhadap stres/cekaman lingkungan.

Pengembangan tanaman dengan sifat-sifat unggul, seperti memiliki resistensi/toleransi yang tinggi terhadap kondisi lingkungan yang mencekam, merupakan salah satu solusi untuk memperluas produksi pertanian Indonesia di tanah-tanah marginal yang sampai saat ini masih belum banyak tergarap. Pengembangan tersebut akan memiliki nilai ekonomi yang semakin tinggi bila dilakukan terhadap jenis-jenis tanaman yang juga memiliki nilai ekonomi tinggi, seperti tanaman yang mengandung khasiat obat dan tanaman yang bisa dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan biodiesel/biofuel.

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar, S. 1999. Pengklonan Gen-gen yang Diinduksi oleh Aluminium pada Kedelai (*Glycine max* (L.) Merryl). Disertasi. IPB. Bogor
- Graham MY, Weidner J, Wheeler K, Pelow MJ, Graham TL, 2003. Induced expression of pathogenesis related protein genes in soybean by wounding and the *Phytophthora sojae* cell wall glucan elicitor. *Physiological and Molecular plant Pathology* 63:141-149
- Jusuf M, 2001. Genetika I: Struktur dan Ekspresi Gen. Jakarta: CV. Sagung Seto
- Kawashima I, Inokuchi Y, Chino M, Kimura M, Shimizu N. 1991. Isolation of a gene for metallothionein-like protein from soybean. *Plant Cell Physiol.* 32(6):913-916
- Kim HU, Kim JB, Yun CH, Kang SK, Chung TY. 1995. Nucleotide sequence of cDNA clone encoding a metallothionein-like protein from chinese cabbage. *Plant Physiol.* 108:863
- Lawrence PK, Koundal KR, 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology* 5(1)
- Richard KD, Scott EJ, Sharma YK, Davis KR, Gardner RC. 1998. Aluminum induced oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 116:409-418
- Richard KD, Snowden KC, Gardner RC. 1994. Genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol.* 105:1455-1456
- Snowden KC, Gardner RC. 1993. Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol.* 103:855-861
- Snowden KC, Richard KD, Gardner RC. 1995. Aluminum-induced genes. *Plant Physiol.* 107:341-348
- Taiz L, Zeiger E, 1991. *Plant Physiology*. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Uknes S, Dincher S, Friedrich S, Negrotto D, Williams S, Thompson-Taylor H, Potter S, Ward E, Ryals J, 1993. Regulation of pathogenesis-related protein-1a gene expression in tobacco. *Plant Cell* 5(2): 159-169
- Zhou J, Goldsbrough PB. 1994. Functional homologous of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 6:875-884