

**KADAR HOMOGLUTATION DAN AKTIVITAS ENZIM HOMOGLUTATION SINTETASE
BINTIL AKAR BEBERAPA VARIETAS TANAMAN KEDELAI YANG
MENGEKSPRESIKAN GEN hGSHS PADA KONDISI AIR TANAH TERBATAS**

**HOMOGLUTATION CONTENT AND HOMOGLUTATION SYNTHETASE ACTIVITY OF
ROOT NODULES OF SEVERAL SOYBEAN VARIETIES OF EXPRESSING
hGSHS GENE GROWN UNDER WATER DEFICIT CONDITIONS**

Sunarpi, V.F. Aris Budianto dan Bambang Budi Santoso

Fakultas Pertanian, Universitas Mataram

ABSTRAK

Defisit air pada medium tumbuh menghambat fiksasi nitrogen, pertumbuhan dan produksi tanaman kedelai. Hambatan ini disebabkan karena rendahnya kadar homoglutation, senyawa tripeptida yang berperan penting dalam pembentukan bintil akar, sebagai akibat dari rendahnya aktivitas enzim homoglutation sintetase. Artikel ini melaporkan kadar homoglutation (hGSH) dan aktivitas enzim homoglutation sintetase (hGSHS) bintil akar tanaman kedelai varietas wilis, kepet, rinjani dan merbabu, yang mengekspresikan gen hGSHS *Clotalaria striata* pada kondisi defisit air. Biji kedelai non-transgenik dan transgenik, ditumbuhkan pada media tanah. Satu bulan setelah tanam, setiap varietas tanaman kedelai ditumbuhkan pada kondisi defisit air sampai panen. Ekspresi gen hGSHS pada level transkripsi dan translasi dalam akar dan bintil akar, dideteksi masing-masing dengan RT-PCR dan SDS-PAGE. Selain itu, saat panen juga diukur kadar hGSH, aktivitas enzim hGSHS dan jumlah bintil akar. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua varietas tanaman kedelai transgenik mampu mengekspresikan gen hGSHS di bintil akar pada kondisi defisit air. Dengan demikian, aktivitas enzim hGSHS meningkat, yang diikuti dengan peningkatan kadar hGSH, jumlah bintil akar dan pertumbuhan tanaman kedelai. Sebaliknya, gen hGSHS tidak terekspresi pada tanaman kedelai nontransgenik pada kondisi tercekam tersebut, sehingga kadar hGSH, jumlah bintil akar dan pertumbuhan lebih rendah dibandingkan dengan tanaman transgenik.

ABSTRACT

Water deficit in growth mediums inhibits nitrogen fixation, growth and production of soybean plants. The inhibition is caused by low concentration of homoglutation, a tripeptide compound playing role on root nodule formation, as a result of low activity of homoglutation synthetase enzyme. This article reports homoglutation (hGSH) concentration and homoglutation synthetase (hGSHS) activity in root nodules of soybean plants cv. wilis, kepet, rinjani and merbabu, expressing wild legume hGSHS gene grown under water deficit conditions. Soybean seeds, both non-transgenic and transgenic, were grown in soil media. One month after planting, each variety was grown under water deficit condition until harvesting time. Expression of hGSHS gene, both transcription and translation level in root and root nodule, was detected using RT-PCR and SDS-PAGE analysis. In addition, hGSH concentration, hGSHS activity and number of root nodule were also measured at harvesting time. The results showed that all transgenic varieties were able to express hGSHS gene in root nodule under water deficit condition. Therefore, the activity of hGSHS enzyme increased, followed by an increase in hGSH concentration, root nodule number, and growth of soybean plants. Conversely, hGSHS gene was not expressed in non-transgenic plants grown in stress condition. Therefore, hGSH content, root nodule number and growth were lower in non-transgenic than transgenic plants.

Kata kunci: Gen hGSHS, bintil akar, kedelai, RT-PCR, SDS-PAGE

Key words: hGSHS gene, root nodule, soybean, RT-PCR, SDS-PAGE

PENDAHULUAN

Ketersediaan air yang terbatas di medium tumbuh menekan pertumbuhan dan produksi berbagai spesies tanaman pertanian. Hal ini disebabkan karena kondisi tersebut mengganggu berbagai proses fisiologi tanaman, seperti fotosintesis, respirasi, serapan unsur hara dan fiksasi nitrogen, yang pada akhirnya bermuara kepada hambatan pertumbuhan dan produksi tanaman.

Produksi oksigen reaktif (ROS, Reactive Oxygen Spesies) oleh berbagai reaksi metabolik, seperti fotosintesis, respirasi, dan fotorespirasi di dalam sel tumbuhan, cenderung dipacu pada kondisi defisit air (Asada, 1997; Foyer *et al.*, 1994). Peningkatan aktivitas ROS, seperti radikal superoksida, hidrogen peroksida dan hidroksil, menyebabkan terjadinya kerusakan seluler, karena radikal bebas tersebut memacu peroksidasi lemak, denaturasi protein, karbohidrat dan asam nukleat, yang pada akhirnya mengarah kepada kerusakan membran dan kematian sel (Bowler *et al.*, 1992; Foyer *et al.*, 1994; Blokhina *et al.*, 2003; Shigeoka *et al.*, 2002).

Aktivitas enzim katalitik, seperti enzim lipase, amilase dan protease di sistem perakaran, diinduksi oleh keterbatasan air di medium tumbuh (Buchanan *et al.*, 2001). Peningkatan aktivitas enzim katalitik tersebut menyebabkan didegradasinya polimer dinding dan membran sel, seperti selulosa, protein dan fosfolipid. Dengan demikian, maka membran dan dinding sel mengalami kerusakan, yang dapat mengakibatkan tidak saja keseimbangan homeostasis ionik membran terganggu, melainkan porositas dinding sel sistem perakaran akan oksigen meningkat dengan tajam (Taiz dan Zeiger, 1998).

Kerusakan dinding dan membran seluler sistem perakaran dipahami menghambat pembentukan bintil akar dan fiksasi nitrogen (N) oleh berbagai spesies tanaman legum, seperti kacang tanah, kacang hijau dan kedelai (Campbell, 1992), sehingga proses fiksasi N oleh tanaman legum merupakan proses fisiologis yang paling respon terhadap kondisi defisit air (Salisbury dan Ross, 1992). Kelebihan oksigen akibat peningkatan porositas dinding sel (Taiz dan Zeiger, 2001) menghambat pembentukan bintil akar dan fiksasi N oleh beberapa spesies tanaman legum. Hal ini disebabkan karena oksigen di satu sisi, diperlukan oleh bakteri *Rhizobium* untuk proses respirasi, namun demikian, kadar oksigen berlebih menonaktifkan kerja enzim nitrogenase, suatu enzim yang mengkatalisa fiksasi N_2 menjadi NH_3

(ammonia). Argumentasi fisiologis inilah yang menjadi alasan kenapa fiksasi N, pertumbuhan dan produksi sebagian besar tanaman legum terganggu pada kondisi defisit air di medium tumbuh (Serraj dan Sinclair, 1996, 1997; Silva *et al.*, 1996; Matamoros *et al.*, 1999), meskipun ada sebagian kecil kelompok tanaman tersebut yang bersifat toleran (Vuong *et al.*, 1996).

Berbagai spesies tanaman yang toleran terhadap stress oksidatif pada kondisi defisit air, menjalankan suatu sistem antioksidatif, dengan melibatkan berbagai senyawa antioksidan, seperti asam askorbat, glutation, homoglutation, senyawa fenolik dan zeaksantin (Blokhina *et al.*, 2003; Yoshimura *et al.*, 2004). Senyawa-senyawa antioksidan tersebut diketahui dapat mengeliminir pengaruh ROS, dengan cara menjalankan suatu sistem reaksi redoks (Campbell, 1992; Buchanan *et al.*, 2001; Taiz dan Zeiger, 1998).

Berbagai peran fisiologis homoglutation (senyawa homolog glutation yang ditemukan pada tanaman legum) dalam mengeliminir pengaruh negatif stress air, telah dilaporkan oleh beberapa peneliti sebelumnya, seperti dalam mengendalikan pengaruh negatif oksigen aktif (Klaueck *et al.*, 1988; Bergmann dan Rennenberg, 1993; May *et al.*, 1998ab; Xiang dan Oliver, 1998; Riccillo *et al.*, 2000), dalam pengaturan osmotik dan pengendalian oksigen bintil akar (Moran *et al.*, 2000, 2002), yang didukung oleh fenomena terakumulasinya senyawa tersebut di bintil akar beberapa spesies legum toleran pada kondisi defisit air (Matamoros *et al.*, 1999). Dengan demikian, ketersediaan homoglutation dengan kadar yang cukup memadai sangat diperlukan, dalam upaya untuk memacu pembentukan bintil akar, fiksasi N, pertumbuhan dan produksi tanaman legum pada kondisi air tanah terbatas.

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa tanaman kedelai yang ditumbuhkan pada kondisi defisit air tidak mampu memproduksi bintil akar dengan jumlah yang memadai untuk menunjang proses fiksasi N (Sunarpi, 2003a). Hal ini disebabkan oleh rendahnya kadar homoglutation dan aktivitas enzim homoglutation sintetase di sistem perakaran (Sunarpi, 2003a). Mengingat senyawa antara biosintesis homoglutation (γ -glutamil sistein) terakumulasi dengan kadar yang cukup tinggi pada kondisi tersebut, maka dapat dipastikan bahwa rendahnya kadar homoglutation disebabkan oleh rendahnya aktivitas enzim homoglutation sintetase (hGSHS). Hal ini disebabkan karena enzim tersebut yang berperan mengkonversi γ -glutamil sistein menjadi homoglutation. Berdasarkan fakta ilmiah tersebut, maka kadar hGSH bintil

akar tanaman kedelai dapat ditingkatkan dengan cara meningkatkan aktivitas enzim hGSHS, yang pada akhirnya bermuara kepada pemacuan pembentukan bintil akar dan fiksasi N.

Gen yang mengkode enzim hGSHS telah berhasil diisolasi dari tumbuhan legum liar *Crotalaria striata* tahan kering (Sunarpi, 2003b), diklon dan ditransformasi pada vector biner pSW600 (Budianto dan Sunarpi, 2004) dan *Agrobacterium tumefaciens* (Santoso dan Sunarpi, 2004). Ekspresi gen hGSHS pada tanaman kedelai transgenik varietas wilis, kepet, rinjani dan merbabu yang ditumbuhkan pada kondisi kapasitas lapang, telah dapat dideteksi, baik pada level mRNA dan protein dengan analisis RT-PCR dan SDS-PAGE (Sunarpi *et al.*, 2005). Artikel ini melaporkan peningkatan aktivitas enzim hGSHS bintil akar, yang diikuti dengan peningkatan kadar hGSH, jumlah bintil akar dan pertumbuhan beberapa varietas tanaman kedelai transgenik yang mengekspresikan gen hGSHS pada kondisi air tanah terbatas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanaman kedelai transgenik mampu mengekspresikan gen hGSHS di sistem perakaran dan bintil akar pada kondisi air tanah terbatas, sehingga tanaman tersebut mampu memproduksi hGSH dengan kadar yang memadai untuk menunjang pembentukan bintil akar, fiksasi N dan pertumbuhan. Sebaliknya, tanaman kedelai nontransgenik tidak mampu mengekspresikan gen hGSHS, sehingga tanaman tersebut tidak mampu memproduksi hGSH dengan kadar memadai untuk menunjang pertumbuhan pada kondisi air tanah terbatas.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Selama periode pertumbuhan tanaman, penelitian dilaksanakan di rumah kaca Fakultas Pertanian Universitas Mataram, mulai bulan Mei sampai September 2004. Sedangkan analisis kadar hGSH, aktivitas enzim hGSHS dan ekspresi gen hGSHS dilakukan di laboratorium "Molecular and Cellular Signalling, Pusat Penelitian Bioscience and Bioteknologi" Nagoya University Japan, pada tanggal 4-20 Oktober 2004.

Pertumbuhan Tanaman

Benih kedelai non-transgenik dan transgenik, masing-masing varietas wilis, kepet, rinjani dan merbabu (4 varietas), ditumbuhkan pada polibag yang mengandung 5 kg tanah di rumah kaca. Setiap varietas diulang lima kali, sehingga keseluruhan polibag percobaan berjumlah 40 buah (20 buah untuk tanaman

nontransgenik, dan 20 buah untuk tanaman transgenik). Selama periode dua minggu sejak tanam, benih disirami dengan 250 ml air per hari. Sejak minggu ketiga, satu tanaman dibiarkan tumbuh per polibag, dan disirami dengan 500 ml per hari. Sejak minggu kelima sampai panen, tanaman kedelai disirami dengan 500 ml per tiga hari. Prosedur pemeliharaan, selain perlakuan air, dilaksanakan secara seragam sesuai prosedur baku pemeliharaan tanaman kedelai.

Ekstraksi dan Isolasi RNA

Ekstraksi dan isolasi RNA dari bintil akar tanaman kedelai nontransgenik dan transgenik dilakukan sesuai prosedur Uozumi *et al.* (2000), seperti dalam Sunarpi *et al.* (2005). Bintil akar (100 mg) digerus menggunakan mortar dalam nitrogen cair sampai terbentuk bubuk halus. Selanjutnya, sampel diekstraksi dengan 600 μ l buffer ekstraksi yang mengandung Guanidin Thiosianat 4,2 M, Sarkosil 0,5%, Sodium Sitrat 25 mM dan antifoam A 30%. Ekstrak beku ditambahkan 5-10 μ l β -mer-captoetanol dan digerus sampai mencair. Ekstrak ditransfer ke dalam tabung eppendorf dan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm, suhu 4 $^{\circ}$ C selama 5 menit. Supernatan ditransfer ke tabung eppendorf, ditambahkan 60 μ l Na-Oasetat 3 M dan divortex sampai homogen. Campuran ditambahkan 600 μ l fenol/kloroform, divortex dan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm, suhu 4 $^{\circ}$ C selama 5 menit. Lapisan atas dari supernatan dipipet ke tabung eppendorf, ditambahkan 600 μ l isopropanol, dan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm pada suhu 4 $^{\circ}$ C selama 20 menit. Fellet disuspensi dengan 400 μ l air steril, ditambahkan 100 μ l LiCl2 1 M, dan diinkubasi dalam es selama 30 menit. Setelah diinkubasi, sampel disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm pada suhu 4 $^{\circ}$ C selama 20 menit. Setelah fellet disuspensi menggunakan 50 μ l buffer TE, kadar RNA ditentukan dengan memipet 100 μ l larutan RNA, diencerkan dengan 900 μ l air dan membaca absorbansi menggunakan spektrofotometer pada λ 260 nm.

Sintesis cDNA (RT) dan PCR

Prosedur sintesis cDNA dari RNA dilakukan menggunakan kit Super-Script III yang disuplai oleh perusahaan Invitrogen, seperti dalam Sunarpi *et al.* (2005). Prosedur tersebut diawali dengan pemurnian RNA dari DNA dengan perlakuan DNase. Perlakuan DNase dilakukan dengan cara mencampur 1 μ g RNA dengan 1 μ l buffer 10x DNase, dan 1 μ l DNase. Setelah campuran reaksi diinkubasi

pada suhu kamar selama 15 menit, enzim DNAase dinonaktifkan dengan menambahkan 1 ul EDTA 25 mM dan dipanaskan pada suhu 65° C selama 10 menit.

Reaksi sintesis cDNA dengan reaksi RT (Reverse Transcript) dilakukan dalam beberapa tahapan. Tahap pertama, larutan RNA (2 µl, sekitar 1 µg/ml) dipipet kedalam tabung eppendorf, ditambahkan 1 ul primer oligo-dT 50 µM, 1 µl dNTP 10 mM dan air steril sampai volume 10 µl. Tahap kedua, campuran tersebut diinkubasi pada suhu 65° C selama 5 menit, dan didalam es selama 1 menit. Tahap ketiga, campuran reaksi tersebut ditambahkan 10 µl campuran reaksi cDNA yang terdiri atas 2 µl 10x buffer RT, 4 µl MgCl₂ 25 mM, 2 µl DTT 0,1 M, 1 µl RNase-out dan 1 µl enzim Super-Script III-RT. Tahap keempat, campuran reaksi setelah diaduk secara perlahan sampai homogen; diinkubasi pada suhu 50° C selama 50 menit. Untuk mengakhiri reaksi, campuran diinkubasi pada suhu 85° C selama 5 menit, dan didalam es selama 1 menit. Setelah itu, campuran ditambahkan 1 µl RNase-H kedalam campuran, dan diinkubasikan pada suhu 37° C selama 20 menit. Akhirnya, cDNA yang didapat siap dipakai sebagai *template* pada reaksi PCR.

Reaksi PCR (Polimerase Chain Reaction) menggunakan primer spesifik hGSHS telah digunakan untuk mendeteksi keberadaan gen hGSHS pada cDNA yang disintesis. Selain itu, reaksi PCR menggunakan primer β-tubulin telah digunakan sebagai kontrol untuk mengetahui apakah reaksi PCR berlangsung dengan baik atau tidak. Campuran reaksi PCR terdiri atas 2 µl cDNA, 0,5 µl primer-F hGSHS, 0,5 µl primer-R hGSHS, 10 µl 10x buffer PCR, 0,5 µl enzim Ex-Tag Polimerase, dan 13,5 µl air, sehingga total volume menjadi 20 µl. Untuk kontrol, total volume reaksi sama, hanya berbeda pada primer yang dipakai, yang dalam hal ini digunakan primer-F dan primer-R β-tubulin. Program PCR kedua campuran reaksi tersebut pada mesin PCR sebagai berikut: 94° C, 2 menit; 94° C, 30 detik; 55° C, 30 detik; 72° C, 2 menit; 72° C, 3 menit; dan 4° C, tak terhingga. Program PCR tersebut berlangsung dalam 35 siklus. Setelah selesai reaksi, produk PCR dipisahkan dengan elektroforesis gel agarosa 1%.

Isolasi dan Pemisahan Protein dengan SDS-PAGE

Prosedur ekstraksi protein dan pemisahannya dengan SDS-PAGE dilakukan sesuai prosedur Sunarpi *et al.* (2005). Secara singkat prosedur tersebut dimulai dengan menggerus sekitar 200 mg bintil akar atau akar di dalam

nitrogen cair menggunakan mortar sampai terbentuk bubuk halus. Selanjutnya, bubuk diekstrak dengan 1 ml buffer ekstraksi yang mengandung sukrosa 0,4 M, DTT 1 mM dan Tris-HCl 50 mM. Ekstrak disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 2 menit. Supernatan dikoleksi, dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Protein pada ekstrak dipisahkan dengan elektroforesis gel poliakrilamid 10% (SDS-PAGE).

Penentuan Kadar hGSH Bintil Akar

Kadar hGSH bintil akar ditentukan sesuai prosedur "recycling assay", seperti dalam Sunarpi (2004). Analisis dimulai dengan menimbang sekitar 100 mg bintil akar, diekstrak dengan 4 ml HCl 0,1 M yang mengandung 1 mM EDTA, dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Selanjutnya, 20 ul supernatan direaksikan dengan 10 ul DTNB, dan dibaca absorbansinya pada λ -460 nm setelah ditambahkan 5 ul enzim glutation reduktase. Kadar hGSH ditentukan menggunakan kurve Standard yang telah ditetapkan, dan diekspresikan dalam nmol per berat basah, setelah dikoreksi dengan berat basah bintil akar.

Penentuan Aktivitas Enzim hGSHS Bintil Akar

Aktivitas enzim hGSHS di bintil akar tanaman kedelai ditentukan sesuai prosedur Matamoros *et al.*, (1999). Analisis dimulai dengan cara mengekstrak 100 mg bintil akar menggunakan buffer yang mengandung 1 M Tris-HCl pH 8,5; 50 mM EDTA dan 1 mM DTT. Selanjutnya, ekstrak disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit. Kadar protein ditentukan sesuai prosedur Bradford (Bio-Rad Laboratories) menggunakan spektrofotometer pada λ -595 nm setelah sampel direaksikan dengan γ -EC, dan diinkubasikan pada suhu 37° C. Aktivitas enzim pada sampel diekspresikan dalam nmol per menit per mg protein.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan Tanaman Kedelai

Pemberian air terbatas didekati dengan cara memberikan air ke medium tumbuh sebanyak 500 ml setiap tiga hari sekali. Pendekatan ini didasarkan pada penelitian sebelumnya bahwa tanaman kedelai membutuhkan sekitar 500 ml per hari setelah memasuki fase generatif (Sunarpi, 2003a). Setelah periode dua minggu pada kondisi air tanah terbatas, tanaman kedelai transgenik memiliki tinggi dan jumlah daun 20% lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman kedelai nontransgenik, kecuali varietas kepet

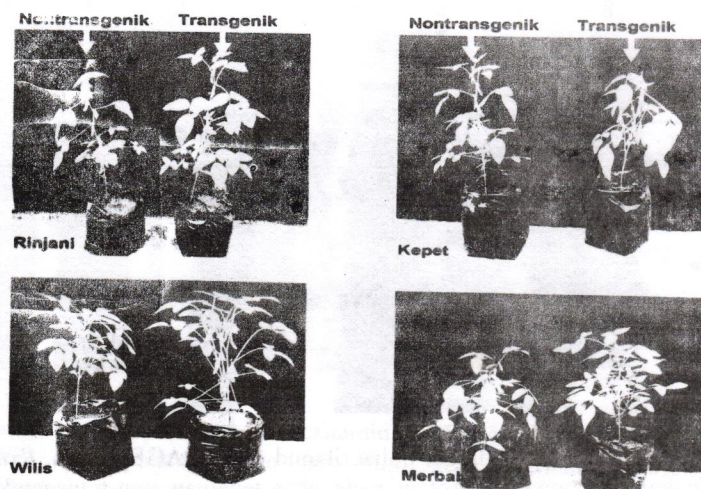
transgenik memiliki tinggi dan jumlah daun sekitar 5% lebih tinggi dibandingkan dengan kepet non-transgenik. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh karena gen hGSHS terekspresi di bintil akar tanaman transgenik, sehingga mampu memproduksi hGSH dengan kadar memadai untuk menunjang pembentukan bintil akar, fiksasi N dan pertumbuhan tanaman, sebagaimana dilaporkan oleh peneliti sebelumnya pada beberapa jenis legum liar yang toleran terhadap kekeringan (Moran *et al.*, 2000).

Untuk membuktikan apakah pertumbuhan tanaman transgenik yang lebih baik dibandingkan dengan tanaman nontransgenik pada kondisi air tanah terbatas (Gambar 1) berkaitan dengan terekspresinya gen hGSHS di akar dan bintil akar, maka dilakukan analisis ekspresi gen hGSHS menggunakan RT-PCR. Analisis ini difokuskan pada deteksi keberadaan mRNA yang mengkode enzim hGSHS pada akar dan bintil akar tanaman kedelai.

Keberadaan mRNA yang mengkode protein β -tubulin (kontrol) terdeteksi pada akar dan bintil akar beberapa varietas tanaman kedelai, baik yang nontransgenik maupun yang transgenik (Gambar 2A). Hal ini memberikan indikasi bahwa proses reaksi RT-PCR berjalan dengan baik, sehingga bila terjadi ketidakmunculan band dalam gel elektroforesis bukan disebabkan oleh kesalahan sistem reaksi RT-PCR, melainkan karena ketidakberadaan mRNA yang mengkode gen tersebut. Namun demikian, keberadaan mRNA yang mengkode enzim hGSHS tidak terdeteksi pada akar dan bintil akar beberapa varietas tanaman nontransgenik (Gambar 2B). Hal ini diindikasikan oleh tidak munculnya band berukuran sekitar 554 bp

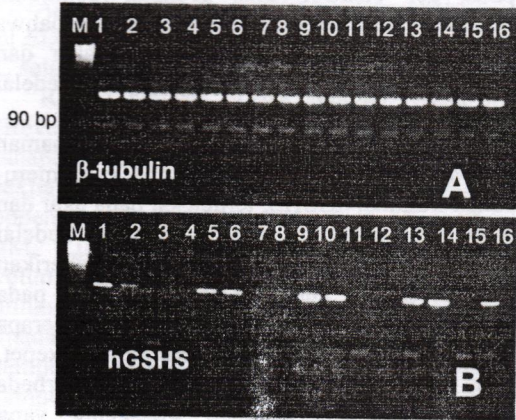
pada gel elektroforesis. Dengan demikian, fenomena tersebut memberikan indikasi bahwa gen hGSHS tidak terekspresi pada akar dan bintil akar beberapa varietas tanaman kedelai non-transgenik.

Berbeda dengan fenomena pada tanaman nontransgenik, band berukuran 554 yang merupakan fragmen hGSHS, terdeteksi pada akar dan bintil akar beberapa varietas tanaman kedelai transgenik (Gambar 2B). Hal ini memberikan indikasi bahwa gen hGSHS terekspresi pada level mRNA di akar dan bintil akar beberapa varietas tanaman kedelai, seperti rinjani, kepet, wilis dan merbabu. Hasil percobaan ini berbeda dengan beberapa tanaman transgenik yang dihasilkan oleh peneliti sebelumnya (Creissen *et al.*, 1999), yang hanya mengekspresikan gen hGSHS pada kloroplast daun. Perbedaan lokasi ekspresi tersebut dimungkinkan, mengingat promotor yang digunakan untuk mengendalikan gen tersebut berbeda antara kedua peneliti. Peneliti sebelumnya menggunakan promotor spesifik yang secara khusus ditargetkan di kloroplast. Namun demikian, pada percobaan ini, gen hGSHS dikonstruksi menggunakan promotor universal (35 SCaMV), sehingga memungkinkan gen tersebut diekspresikan pada sebagian besar organ tanaman kedelai, termasuk akar dan bintil akar. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa mRNA gen hGSHS yang diisolasi dari *Crotalaria striata* terekspresi pada tanaman kedelai yang ditumbuhkan pada kondisi air tanah terbatas. Sedangkan tanaman kedelai non-transgenik yang tidak memiliki gen tersebut, tidak mampu mengekspresikan gen hGSH endogen yang sudah ada pada tanaman kedelai tersebut dalam kondisi defisit air.



Gambar 1. Fenotip tanaman kedelai non-transgenik dan transgenik varietas rinjani, kepet, wilis dan merbabu. Foto diambil setelah dua minggu tanaman disuplai dengan 500 ml air per tiga hari.

Ekskresi Gen hGSHS pada Level Transkripsi



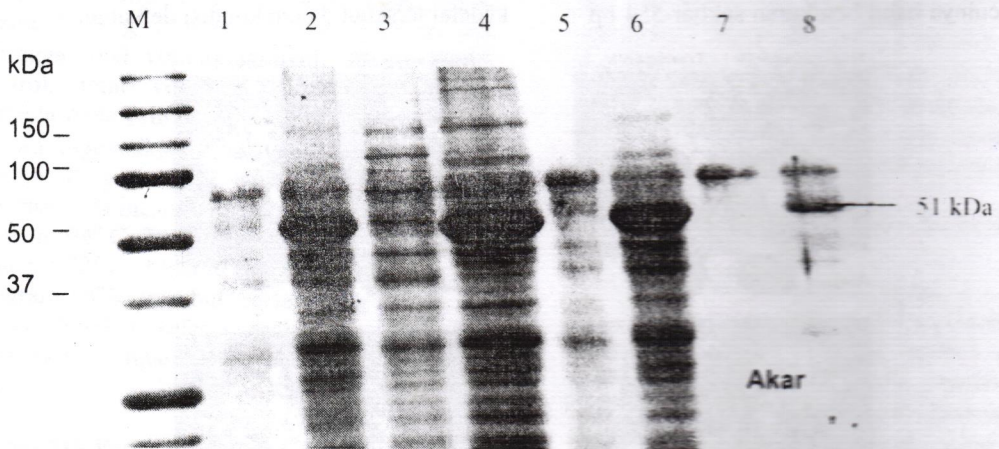
Gambar 2. Hasil analisis RT-PCR ekspresi gen hGSHS level transkripsi di akar dan bintil akar beberapa varietas tanaman kedelai, baik yang non-transgenik maupun yang trans-genik. Kolom 1-16 pada 2A merupakan kontrol dengan menggunakan primer β -tubulin. Sedangkan pada 2B, 1. akar rinjani trans-genik, 2. bintil akar rinjani trans-genik, 3. akar rinjani nontrans-genik, 4. bintil akar rinjani non-transgenik, 5. akar kepet transgenik, 6. bintil akar kepet transgenik, 7. akar kepet nontransgenik, 8. bintil akar kepet nontransgenik, 9. akar wilis transgenik, 10. bintil akar wilis transgenik, 11. akar wilis nontransgenik, 12. bintil akar wilis

nontransgenik, 13. akar merbabu transgenik, 14. bintil akar merbabu transgenik, 15. akar merbabu nontransgenik, 16. bintil akar merbabu nontransgenik, M. marker α -HindIII.

Ekskresi gen hGSHS pada Level Post-Transkripsi

Sebagaimana halnya pada level transkripsi (mRNA), gen hGSHS tidak diekspresikan pada level protein di akar tanaman nontransgenik pada kondisi defisit air (Gambar 3). Berbeda dengan tanaman non-transgenik, protein hGSHS terdeteksi pada akar semua varietas tanaman kedelai transgenik, meskipun pada akar tanaman kedelai transgenik varietas merbabu level ekspresinya rendah.

Protein hGSHS selain ditemukan pada akar, juga ditemukan pada bintil akar tanaman transgenik varietas rinjani, kepet, wilis dan merbabu, dengan intensitas band yang lebih tebal dibandingkan dengan tanaman non-transgenik (Gambar 4). Hal ini membenarkan indikasi bahwa gen hGSHS yang mengkode enzim hGSHS terekspresikan di bintil akar tanaman transgenik yang ditumbuhkan pada kondisi air tanah terbatas. Sedangkan pada ekspresi gen hGSHS di bintil akar tanaman nontransgenik nampaknya dihambat oleh kondisi air tanah terbatas di medium tumbuh. Hal ini dapat dilihat dengan munculnya protein dengan ukuran sama (51 kDa) dengan intensitas band yang lebih rendah.



Gambar 3. Kenampakan protein pada gel poliakrilamid (SDS-PAGE) 10%. Kolom bernomor ganjil merupakan kenampakan protein pada akar tanaman non-transgenik. Sedangkan kolom bernomor genap merupakan kenampakan protein pada akar tanaman transgenik. M. marker protein; 1-2, varietas rinjani; 3-4, varietas kepet; 5-6, varietas wilis; 7-8, varietas merbabu.

Data pada Gambar 4 nampaknya konsisten dengan hasil penelitian sebelumnya yang berkaitan dengan sintesis hGSH pada bintil akar beberapa jenis legum tahan kering (Matamoros *et al.*, 1999). Fenomena serupa juga diamati oleh peneliti sebelumnya pada berbagai spesies tanaman transgenik, seperti tumbuhan legum liar (Moran *et al.*, 2000), tanaman *Medicago truncatula* (Frendo *et al.*, 2001) dan tanaman tembakau (Yoshimura *et al.*, 2004). Keberadaan protein hGSHS bintil akar dan akar tanaman legum, seperti kedelai, memberikan dukungan yang cukup kuat terhadap argumentasi sintesis hGSH terjadi tidak saja di daun, seperti dilaporkan peneliti sebelumnya (Klapeck *et al.*, 1988; Bergmann dan Rennenberg, 1993), melainkan juga di sistem perakaran dan bintil akar (Noctor *et al.*, 1998; Matamoros *et al.*, 1999).

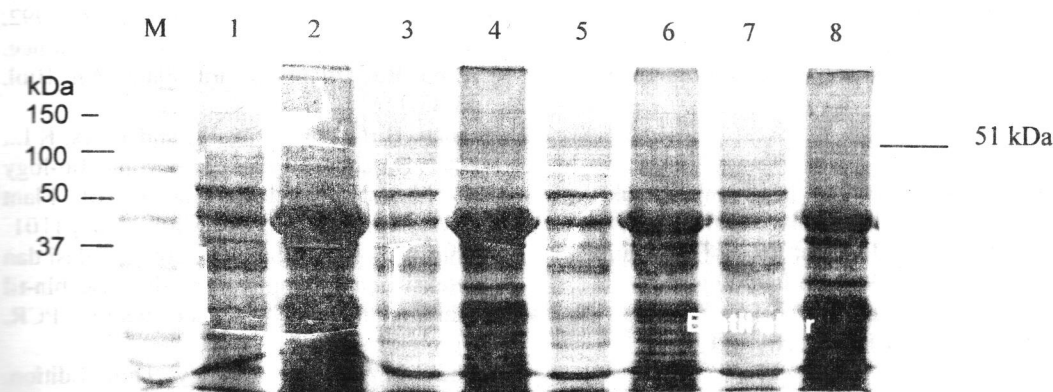
Kadar hGSH dan Aktivitas Enzim hGSHS Bintil Akar

Kadar hGSH bintil akar dipengaruhi secara signifikan oleh over-ekspresi gen hGSHS pada kondisi air tanah terbatas (Tabel 1). Bintil akar tanaman transgenik memproduksi senyawa hGSH dengan kadar yang lebih tinggi dibandingkan dengan bintil akar tanaman non-transgenik. Varietas rinjani, kepet, wilis dan merbabu transgenik sebagai contoh, memproduksi masing-masing sekitar 2, 2, 3 dan 4 kali lipat kadar hGSH yang diproduksi bintil akar tanaman non-transgenik.

Tingginya kadar hGSH pada bintil akar tanaman transgenik, disebabkan karena tingginya aktivitas enzim hGSHS pada bintil akar

tersebut, dibandingkan dengan aktivitas enzim yang sama pada bintil akar tanaman non-transgenik (Tabel 1). Sebagai gambaran, aktivitas enzim hGSHS bintil akar tanaman kedelai transgenik varietas rinjani, kepet, wilis dan merbabu, masing-masing sekitar 50, 56, 53 dan 53 nmol per mg protein per menit, jauh lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas enzim yang sama pada bintil akar tanaman kedelai non-transgenik yang hanya mencapai 8, 7, 9 dan 7 nmol per mg protein per menit, masing-masing untuk varietas rinjani, kepet, wilis dan merbabu. Dengan demikian, maka dengan tingginya aktivitas enzim hGSHS bintil akar, maka γ -glutamil sistein dapat dikonversi homoglutation (Bergmann dan Rennenberg, 1993; Matamoros *et al.*, 1999) di bintil akar tanaman kedelai pada kondisi air tanah terbatas.

Tingginya kadar hGSH dan aktivitas enzim hGSHS bintil akar tanaman kedelai transgenik pada kondisi air tanah terbatas mempengaruhi rata-rata jumlah bintil akar tanaman kedelai transgenik. Rata-rata jumlah bintil akar tanaman kedelai transgenik varietas rinjani, kepet, wilis dan merbabu, masing-masing sekitar 40, 35, 44 dan 43 per tanaman (Tabel 2). Jumlah tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan jumlah bintil akar tanaman kedelai non-transgenik, masing-masing sekitar 30, 27, 30 dan 28 per tanaman untuk varietas rinjani, kepet, wilis dan merbabu. Fenomena tersebut konsisten dengan kenyataan bahwa kadar hGSH mempengaruhi jumlah bintil akar legum liar (Matamoros *et al.*, 1999; Moran *et al.*, 2000).



Gambar 4. Kenampakan protein pada gel poliakrilamid (SDS-PAGE) 10 %. Kolom bernomor ganjil merupakan kenampakan protein pada bintil akar tanaman non-transgenik. Sedangkan kolom bernomor genap merupakan kenampakan protein pada bintil akar tanaman transgenik. M, marker protein; 1-2, varietas rinjani; 3-4, varietas kepet; 5-6, varietas wilis; 7-8, varietas merbabu.

Tabel 1. Kadar hGSH dan Aktivitas Enzim hGSHS Bintil Akar Tanaman Kedelai Non-Transgenik dan Transgenik Varietas Rinjani, Kepet, Wilis dan Merbabu yang Ditumbuhkan pada Kondisi Air Tanah Terbatas.

Varietas	Kadar hGSH (nmol gram ⁻¹ berat basah)		Aktivitas enzim hGSHS (nmol mg ⁻¹ prot menit ⁻¹)	
	Nontransgenik	Transgenik	Nontransgenik	Transgenik
Rinjani	0,30±0,02	0,67±0,05	8,11±0,5	50,16±7,3
Kepet	0,21±0,01	0,72±0,05	7,21±0,5	55,72±3,9
Wilis	0,24±0,02	0,70±0,06	9,12±0,5	53,12±4,1
Merbabu	0,23±0,02	0,85±0,05	7,17±0,4	52,72±4,8

Tabel 2. Rata-rata Jumlah Bintil Akar Tanaman Kedelai Non-Transgenik dan Transgenik Varietas Rinjani, Kepet, Wilis dan Merbabu yang Ditumbuhkan pada Kondisi Air Tanah Terbatas.

Varietas	Rata-rata jumlah bintil akar per tanaman	
	Nontransgenik	Transgenik
Rinjani	30,2±2,5	40,1±3,7
Kepet	27,4±2,1	35,2±2,3
Wilis	29,9±1,8	43,6±2,9
Merbabu	27,7±2,1	42,9±4,1

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan analisis ekspresi dengan RT-PCR dan SDS-PAGE, maka dapat disimpulkan bahwa tanaman kedelai transgenik yang membawakan gen hGSHS yang diisolasi dari legum liar *Crotalaria striata*, mampu mengekspresikan gen tersebut pada kondisi air tanah terbatas. Dengan demikian, tanaman kedelai tersebut mampu memproduksi hGSH dengan kadar yang memadai untuk menunjang pembentukan bintil akar dan pertumbuhan tanaman.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk memahami kestabilan dan faktor yang meregulasi ekspresi gen tersebut pada tanaman kedelai dalam berbagai kondisi lingkungan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih yang sebesar-besarnya disampaikan kepada Direktur DP3M Dikti yang telah menyediakan dana penelitian ini melalui proyek Hibah Bersaing X. Selain itu, disampaikan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada Prof. Dr. Nobuyuki Uozumi, Bioscience dan Biotechnology Center, Nagoya University,

Nagoya-Jepang yang telah memberikan dukungan fasilitas Biologi Molekular untuk menunjang pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Asada, K., 1997. The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. In *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defences* (Scandalios, J.G. eds.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 715-735.
- Bergmann, L. and Rennenberg, H., 1993. Glutathion metabolism in plants. -In: *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants* (L.J. De Kok, I. Stulen, H. Rennenberg, C.H. Brunold & W.E. Rauser, eds), pp 109-124. SPB academic Publishing, The Hague, The Netherlands. ISBN 90-5103-084-X.
- Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. A review. *Annals Bot.* 91:170-194.
- Bowler, C., Montagu, M.V. and Inze, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:83-116.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Jones, R.L., 2001. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland. p1101
- Budianto, V.F.A. dan Sunarpi, 2003. Isolasi dan deteksi gen homoglutation sintetase bintil akar legum liar dengan teknik PCR. *Agroteksos* 13:174-180.
- Campbell, N.A., 1992. *Biology*. Third Edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California. p756.
- Creissen, G., Firmin, J., Fryer, M., Kular, B., Leyland, N., Reynolds, H., Pastori, G., Wellburn, F., Baker, N., Wellburn, A. and Mullineaux, P., 1999. Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of

- transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *Plant Cell* 11:1277-1291.
- Frendo, P., Jimenez, M.J.H., Mathieu, C., Duret, L., Gallesi, D., Sype, G.V., Herouart, D. dan Puppo, A., 2001. A *Medicago truncatula* homoglutathione synthetase is derived from glutathione synthetase by gene duplication. *Plant Physiol.* 126:1706-1715.
- Foyer, C.H., Lelandais, M. and Kunert, K.J., 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* 92:696-717.
- Klaueck, S., Zopes, H., Levels, H.G. dan Bergmann, L., 1988. Properties and localization of the homoglutathione synthetase from *Phaseolus coccineus* leaves. *Physiol. Plant.* 74:733-739.
- 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.
- May, M.J., Vernoux, T., Leaver, C., Montagu, V. dan Inze, D., 1998a. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J. Exp. Bot.* 49:649-667.
- May, M.J., Verneux, T., Sanchez-Fernandez, R., Montagu, V. dan Inze, D., 1998b. Evidence for posttranscriptional activation of γ -glutamylcysteine synthetase during plant stress responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:12049-12054.
- Moran, J.F., Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, M.A., Rubio, M.C., Clemente, M.R., Brewin, N.J. dan Becana, M., 2000. Glutathione and homoglutathione synthetases of legume nodules. Cloning, expression and subcellular localization. *Plant Physiol.* 124:1381-1392.
- Moran, J.F., Sun Z., Sarath, G., Peter, R.A., James, E.K., Becana, M. dan Klucas, R.V., 2002. Molecular cloning, functional characterization and subcellular localization of soybean nodule dihydro-lipoamide reductase. *Plant Physiol.* 128:300-313.
- Noctor, G. and Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol.* 49:249-279.
- Noctor, G., Arisi, A.C.M., Jouanin, L., Kunert, K.J., Rennenberg, H. dan Foyer, H., 1998. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J. Exp. Bot.* 49:623-647.
- Riccillo, P.M., Muglia, C.I., de Bruijn, F.J., Roe, A.J., Booth, I.R. dan Aguilar, O.M., 2000. Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *J. bacteriol.* 182:1748-1753.
- Salisbury, F.B. and Ross, C.W., 1992. *Plant Physiology*. Fourth Edition. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California. p549.
- Santoso, B.B., dan Sunarpi 2004. Kloning dan transformasi gen homoglutathione sintetase yang diisolasi dari bintil akar legum liar pada *Agrobacterium tumefaciens*. *Agroteksos.* 14(2):80-87.
- Serraj, R. dan Sinclair, T., 1996. Processes contributing to N₂-fixation insensitivity to drought in the soybean cultivar jackson. *Crop Sci.* 36:961-968.
- Serraj, R. dan Sinclair, T., 1997. Variation among soybean in dinitrogen fixation response to drought. *Agron. J.* 89:963-969.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y. and Yoshimura, K., 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.* 53:1305-1319.
- 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.
- Sunarpi, 2003a. Akumulasi beberapa metabolit pada sistem perakaran tanaman kedelai yang diberikan nitrogen dan sulfur pada kondisi defisit air. *Jurnal Biologi Tropika* 4:58-63.
- Sunarpi, 2003b. Kadar homoglutathione dan aktivitas enzim homoglutathione sintetase pada bintil akar beberapa jenis legume liar. *Oryza* 3:25-36.
- Sunarpi, 2004. Kadar hGSH dan aktivitas enzim hGSHS pada bintil akar beberapa jenis legum liar. *Oryza* 3:25-36.
- Sunarpi, 2005. Ekspresi gen hGSHS yang diisolasi dari bintil akar legume liar pada beberapa varietas kedelai. *Agroteksos* (in press).
- Sunarpi, Santoso, B.B. dan Budiarto, V.F.A., 2005. Ekspresi gen homoglutathione sintetase yang diisolasi dari bintil akar legum liar pada beberapa varietas kedelai. *Agroteksos* 15(1):9-18.
- Taiz, L. and Zeiger, E., 1998. *Plant Physiology*. 2nd edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts. 792 p.
- Uozumi, N., Kim, E.J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, A., Bakker, E.P., Nakamura, T. and Schroeder, J.I., 2000. The

- Arabidopsis HKT1 gene homolog mediates inward Na current in *Xenopus* laevis Oocytes and Na uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol.* 122:1249-1259.
- 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.
- Xiang, C. dan Oliver, D.J., 1998. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1539-1550.
- Yoshimura, K., Miyao, K., Gaber, A., Takeda, T., Kanaboshi, H., Miyasaka, H. And Shigeoka, S., 2004. Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing *Chlamydomonas* glutathione peroxidase in chloroplast or cytosol. *Plant. J.* 37:21-33.