

11-25-2008

ISOLASI DAN PENGKLONAN FRAGMENT cDNA DARI GEN PENYANDI MULTIDRUG RESISTANCE ASSOCIATED PROTEIN DARI *Melastoma affine*

Suharsono Suharsono

*Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680, Indonesia.
Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680, Indonesia, sony-sh@ipb.ac.id*

Syarifin Firdaus

Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680, Indonesia.

Utut Widyastuti Suharsono

*Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680, Indonesia.
Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680, Indonesia*

Follow this and additional works at: <https://scholarhub.ui.ac.id/science>

Recommended Citation

Suharsono, Suharsono; Firdaus, Syarifin; and Suharsono, Utut Widyastuti (2008) "ISOLASI DAN PENGKLONAN FRAGMENT cDNA DARI GEN PENYANDI MULTIDRUG RESISTANCE ASSOCIATED PROTEIN DARI *Melastoma affine*," *Makara Journal of Science*: Vol. 12: Iss. 2, Article 22.
Available at: <https://scholarhub.ui.ac.id/science/vol12/iss2/22>

This Article is brought to you for free and open access by the Universitas Indonesia at UI Scholars Hub. It has been accepted for inclusion in Makara Journal of Science by an authorized editor of UI Scholars Hub.

ISOLASI DAN PENGKLONAN FRAGMENT cDNA DARI GEN PENYANDI MULTIDRUG RESISTANCE ASSOCIATED PROTEIN DARI *Melastoma affine*

Suharsono^{1,2}, Syarifin Firdaus¹, dan Utut Widyastuti Suharsono^{1,2}

1. Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680, Indonesia

2. Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680, Indonesia

E-mail: sony-sh@ipb.ac.id; sony@rcbio.org; sony.suharsono@yahoo.com

Abstrak

Melastoma affine mampu tumbuh baik pada tanah asam dengan kelarutan Al yang tinggi. Salah satu protein yang penting dalam detoksifikasi cekaman xenobiotik termasuk cekaman asam dan Al adalah *multidrug resistance associated protein* (MRP) yang disandi oleh gen *mrp*. Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan mengklon fragmen cDNA *MaMrp* yang menyandi MRP dari *M. affine*. cDNA total telah berhasil disintesis dari RNA total sebagai cetakan melalui transkripsi balik. Fragmen cDNA *MaMrp* telah berhasil diisolasi dengan PCR dengan menggunakan cDNA total sebagai cetakan dan primer *mrp* yang dirancang dari *Arabidopsis thaliana*, ragi dan manusia. Fragmen ini telah berhasil disisipkan ke dalam plasmid pGEM-T Easy, dan plasmid rekombinan ini telah berhasil diintroduksi ke dalam *Escherichia coli* DH5 α . Analisis urutan nukleotida menunjukkan bahwa fragmen *MaMrp* berukuran 633 pb yang menyandi 208 asam amino. Analisis kesejajaran lokal berdasarkan urutan nukleotida menunjukkan bahwa fragmen *MaMrp* memiliki kesamaan 69% dengan mRNA *AtMrp1* dan 63% dengan mRNA *AtMrp2* dari *A. thaliana*. Berdasarkan deduksi urutan asam amino, MaMRP memiliki kesamaan 84% dengan AtMRP13, 77% dengan AtMRP12, dan 73% dengan AtMRP1 dari *A. thaliana*. Analisis kesejajaran dengan AtMRP1 menunjukkan bahwa fragmen MaMRP terletak di antara domain TM1 dan NBF1 dan mempunyai urutan asam amino yang spesifik QCKAQLQNMEEEE.

Abstract

Isolation and Cloning of cDNA Fragment of Gene Encoding for Multidrug Resistance Associated Protein from *M. affine*. *M. affine* can grow well in acid soil with high level of soluble aluminum. One of the important proteins in the detoxifying xenobiotic stress including acid and Al stresses is a multidrug resistance associated protein (MRP) encoded by *mrp* gene. The objective of this research is to isolate and clone the cDNA fragment of *MaMrp* encoding MRP from *M. affine*. By reverse transcription, total cDNA had been synthesized from the total RNA as template. The fragment of cDNA *MaMrp* had been successfully isolated by PCR by using total cDNA as template and *mrp* primer designed from *A. thaliana*, yeast, and human. This fragment was successfully inserted into pGEM-T Easy and the recombinant plasmid was successfully introduced into *E. coli* DH5 α . Nucleotide sequence analysis showed that the length of *MaMrp* fragment is 633 bp encoding 208 amino acids. Local alignment analysis based on nucleotide of mRNA showed that *MaMrp* fragment is 69% identical to *AtMrp1* and 63% to *AtMrp2* from *A. thaliana*. Based on deduced amino acid sequence, MaMRP is 84% identical to part of AtMRP13, 77% to AtMRP12, and 73% to AtMRP1 from *A. thaliana* respectively. Alignment analysis with AtMRP1 showed that MaMRP fragment is located in TM1 and NBF1 domains and has a specific amino acid sequence QCKAQLQNMEEEE.

Keywords: Multidrug resistance protein, cDNA, cloning, PCR, Melastoma affine

1. Pendahuluan

Indonesia mempunyai lahan podsolik merah-kuning yang sangat luas, yaitu sekitar 47,5 juta ha [1] yang bersifat asam dengan kelarutan aluminium yang tinggi.

Aluminium adalah toksik bagi tumbuhan sehingga dapat dikelompokkan ke dalam bahan xenobiotik. *Melastoma* (*Melastoma affine* dan *M. malabathricum*) dapat tumbuh dengan baik di tanah asam dengan kelarutan Al yang tinggi. *Melastoma* mampu mengakumulasi Al di

daun tanpa menyebabkan gejala keracunan dan bahkan Al memacu pertumbuhannya [2]. Tumbuhan ini diduga mempunyai sistem detoksifikasi Al, sehingga *Melastoma* sangat penting sebagai sumber gen toleransi tumbuhan terhadap cekaman asam dan Al.

Detoksifikasi internal senyawa xenobiotik dilakukan melalui dua tahap yaitu (1) pembentukan *glutathione (GSH) S-conjugate*, dan (2) pembuangan konjugat toksik dari sel oleh *GSH S-conjugate export pump* (pompa GS-X) [3]. *Multidrug resistance associated protein* (MRP) yang disebut juga dengan *Mg²⁺ATP-dependent glutathione s-conjugate export pump/carrier* (pompa GS-X) merupakan subfamili dari *ABC (ATP Binding Cassette) transporter* yang tidak membutuhkan perbedaan gradien elektrokimia, tetapi bergantung pada *Mg²⁺* dan ATP. Pompa GS-X berperan dalam detoksifikasi berbagai senyawa xenobiotik [4], lokalisasi senyawa-senyawa flavonoid [5,6] dan distribusi auksin [7].

Ekspresi berlebih gen penyandi MRP meningkatkan aktivitas pompa GS-X pada membran plasma vesikula yang berperan dalam eliminasi senyawa xenobiotik [8]. Protein *yeast cadmium factor* yang disandi *ScYcf1* berperan dalam resistensi ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) terhadap kadmium [9]. *ScYcf1* memiliki kesamaan urutan nukleotida sebesar 43% (65% pada protein) dengan *mrp* manusia (*HmMrp*). Ekspresi *ScYcf1* dan *HmMrp* pada ragi menunjukkan komplementasi, HmMRP terdapat pada tonoplas dan membran plasma sedangkan ScYCF hanya di tonoplas [10].

Gen penyandi MRP telah diisolasi dari Arabidopsis yaitu *AtMrp1* [11] dan *AtMrp2* [12]. *AtMRP1* berperan dalam transportasi *glutathione S-conjugate (GS conjugate)* xenobiotik termasuk herbisida dan antosianin [11], dan *AtMRP2* berperan dalam transportasi *GS conjugate* dan metabolit klorofil seperti *nonfluorescent chlorophyll catabolite* dari *Brassica napus* (BnNCC) [12]. *AtMRP5* berperan sebagai pengangkut konjugat auksin [7]. *YCF1* secara selektif mengkatalisis transportasi bis(glutathionato) kadmium (*Cd.GS2*) yang berkontribusi dalam detoksifikasi *Cd²⁺* pada ragi [13]. Gen *TaMDR1* penyandi *multidrug resistance (MDR) like protein* telah diisolasi dari gandum dan ekspresinya diinduksi oleh cekaman Al [14]. Pada *Melastoma*, MRP diduga terlibat dalam toleransi terhadap cekaman asam dan Al. Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan mengklon fragmen cDNA gen *mrp* penyandi MRP dari *M. affine*.

2. Metode Penelitian

Isolasi RNA total. RNA total diisolasi dengan mengikuti [15] yang dimodifikasi. Sebanyak 1 g bahan tanaman digerus di dalam 10 ml buffer ekstraksi (2% CTAB, 2% PVP 25000, 100 mM Tris-HCl pH 8, 25

mM EDTA, 2 M NaCl dan 1% β -mercapto ethanol) hangat hingga membentuk suspensi sel. Suspensi sel dimasukkan ke tabung 20 ml dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit, kemudian didinginkan dan ditambah dengan 10 ml kloroform:isoamil alkohol (24:1). Setelah dicampur dengan menggunakan vorteks, campuran disentrifugasi pada kecepatan 42000 xg (rotor SW11, Sorvall Ultra Pro 80) pada suhu 4°C selama 10 menit. Cairan bagian atas dipindahkan ke tabung 20 ml, ditambah dengan 0.25 volume 10 M LiCl dan diinkubasi pada suhu -32°C selama 2.5 jam. Campuran disentrifugasi pada 42000 xg (rotor SW11, Sorvall Ultra Pro 80) pada suhu 4°C selama 10 menit. Cairan dibuang, dan endapan RNA total disuspensikan dalam 500 μ l TE (10 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA) kemudian dipindahkan ke tabung 1.5 ml. Suspensi RNA total diekstraksi dengan penambahan 1 x volume fenol pH 9, divorteks dan disentrifugasi pada kecepatan 14000 rpm (Jouan BR4i) suhu 20°C selama 10 menit. Cairan bagian atas yang mengandung RNA total diambil, dimasukkan ke dalam tabung 1.5 ml dan diekstraksi kembali dengan 1 volume fenol:kloroform:isoamilalkohol (25:24:1), divorteks dan disentrifugasi pada kecepatan 14000 rpm suhu 20°C selama 10 menit. Cairan bagian atas diambil, dimasukkan ke dalam tabung 1.5 ml, kemudian ditambah dengan 0.25 volume 10 M LiCl dan diinkubasi pada suhu -32°C selama 2.5 jam. Cairan disentrifugasi pada 14000 rpm suhu 4°C selama 15 menit. Endapan RNA total ditambah dengan 500 μ l alkohol 70%, disentrifugasi 15000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Endapan RNA total dikeringkan dengan *vacuum dryer*, dan disuspensikan di dalam H₂O yang telah diperlakukan dengan DEPC. Kualitas dan kuantitas RNA total ditentukan dengan spektrofotometer UV (Cecil CE 2020) pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm [16]. Keutuhan RNA total dianalisis dengan elektroforesis di gel agarose 1% (FMC, USA) di dalam larutan penyangga MOPS (4.2 g/l MOPS, 0.41 g/l Na-asetat, 0.37 g/l Na₂-EDTA). Visualisasi RNA total dilakukan di atas UV transiluminator GelDoc (Labquip) setelah diwarnai dengan EtBr (0.5 μ g/ml) selama 30 menit dan dibilas dengan air.

Sintesis cDNA total. Komposisi sintesis cDNA total adalah 5 μ g RNA total, 1x *RT buffer*, 20 pmol oligodT, 4 mM dNTP, 10 mM DTT, 40 U enzim *SuperScriptTM II RTase* (Invitrogen) dan H₂O-DEPC dengan volume reaksi 20 μ l. Sintesis cDNA total dilakukan pada suhu 52°C selama 50 menit. Keberhasilan sintesis cDNA total dan kemurnian cDNA total dari kontaminan DNA dianalisis menggunakan PCR dengan primer *actF* (ATGGCAGATGCCGAGGATAT) dan *actR* (CAGTTGTGCGACCACTTGCA) yang spesifik untuk ekson1-ekson2 aktin dari kedelai (Ac.V00450). Komposisi PCR untuk amplifikasi cDNA aktin adalah 1 μ l cDNA total, 1x buffer taq, 40 mM MgCl₂, 4 mM

dNTP mix, 20 pmol primer *ActF*, 20 pmol primer *ActR*, 4% DMSO, 0.5 U enzim taq DNA polymerase (Toyobo) dan H₂O dengan volume reaksi 20 µl. PCR dilakukan pada kondisi praPCR pada 95°C, 5 menit, denaturasi pada 94°C, 30 detik, penempelan primer pada 57°C, 30 detik, dan pemanjangan pada 72°C, 1.5 menit, dengan 35 siklus, dan pascaPCR pada 72°C, 5 menit, diikuti dengan 15°C, 10 menit.

Isolasi fragmen cDNA *MaMrp*. Fragmen cDNA *MaMrp* diisolasi dengan PCR menggunakan primer spesifik *mrpF* (GAGAATCGGCAATTGGTCATCC) dan *mrpR* (GTAGAGGAATGGCAGGAATCAA), yang didesain berdasarkan cDNA *AtMrp1* and *AtMrp2* dari *A. thaliana*, *ScYcf1* dari ragi dan *HmMrp1* dari manusia. Komposisi PCR untuk *MaMrp* sama dengan untuk aktin, hanya primernya yang diganti dengan *mrpF* dan *mrpR*. Kondisi PCR untuk *MaMrp* adalah sama dengan untuk aktin.

Pengklonan fragmen cDNA *MaMrp*. Fragmen cDNA *MaMrp* diligasikan dengan pGEM-T Easy (Promega Inc.) dengan mencampur 3 µl hasil PCR, 10 ng pGEM-T Easy, 40 Unit T4 DNA ligase dan 5 µl 2x *rapid buffer* ligasi dan H₂O dalam volume 10 ml, dan diinkubasi pada 4°C semalam. Hasil ligasi diintroduksi ke dalam *E. coli* galur DH5α mengikuti prosedur [17].

Seleksi *E. coli* yang mengandung vektor rekombinan. *E. coli* galur DH5α yang mengandung pGEM-T easy rekombinan diseleksi menggunakan seleksi resistensi terhadap ampisilin dan seleksi biru-putih. Koloni putih yang tumbuh di media mengandung ampisilin digunakan sebagai bahan cetakan untuk PCR untuk mendeteksi keberadaan *mrp*. Untuk itu, koloni diambil dengan tusuk gigi kemudian disuspensikan ke dalam 5 µl H₂O, kemudian suspensi dipanaskan pada 95°C selama 10 menit dan didinginkan pada suhu 15°C selama 5 menit. Suspensi ini digunakan sebagai cetakan untuk PCR dengan komposisi dan kondisi PCR sama dengan PCR untuk isolasi fragmen cDNA *MaMrp*. Keberadaan pGEM-T easy rekombinan di dalam koloni putih dikonfirmasi dengan melakukan isolasi plasmid menggunakan prosedur [17]. DNA plasmid rekombinan dipotong dengan enzim *EcoR1* (Promega Inc.) dengan mencampur 100 ng DNA plasmid, 10 U enzim restriksi *EcoR1*, buffer 1x dan H₂O dalam volumenya 20 µl, diinkubasikan pada suhu 37°C selama 2 jam.

Pengurutan DNA dan Analisis Urutan DNA. Pengurutan (*sequencing*) DNA dilakukan dengan menggunakan Automated DNA Sequencer ABI Prism 310. Analisis kesejajaran lokal cDNA *MaMrp* dilakukan dengan menggunakan program BLAST2 (<http://www.ebi.ac.uk/blast2>) [18]. Analisis situs restriksi dilakukan dengan menggunakan program NEBCutter (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>). Analisis kesejajaran

dan filogenetik dilakukan dengan menggunakan program MAFFT ver.5.8 [19].

3. Hasil dan Pembahasan

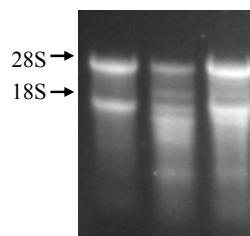
Isolasi RNA total

RNA total dari *M. affine* telah berhasil diisolasi dari daun dewasa, pucuk batang, dan ujung akar. Kuantifikasi RNA total dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm menunjukkan bahwa rendemen isolasi RNA berkisar antara 170.5 µg dan 247 µg tiap g bahan tanaman (Tabel 1). Rasio OD₂₆₀/OD₂₈₀ dari RNA total pada penelitian ini adalah berkisar antara 1.86 dan 1.9 yang menunjukkan bahwa RNA total yang diisolasi mempunyai kemurnian yang tinggi dari kontaminan protein. Daun pucuk menghasilkan rendemen RNA total paling tinggi dibandingkan daun dewasa dan ujung akar. Hal ini terjadi karena sel pada daun pucuk sangat aktif dalam pembelahan sel sehingga memerlukan sintesis RNA yang sangat intensif.

Hasil elektroforesis RNA total menunjukkan adanya 2 pita RNA yang dominan pada RNA total yang diisolasi dari ujung akar, pucuk batang dan daun dewasa yang kemungkinan adalah RNA ribosomal (rRNA) 28S dan 18S (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa RNA total yang diisolasi mempunyai keutuhan yang tinggi sehingga sangat baik digunakan sebagai cetakan untuk sintesis cDNA total. Selain kedua pita dominan tersebut, RNA total dari daun dewasa dan daun pucuk, juga mengandung beberapa pita RNA yang kemungkinan adalah rRNA yang terdapat pada mitokondria dan kloroplas yang berukuran 23S, 16S, dan 5S.

Tabel 1. Hasil isolasi RNA total

Bahan	Rasio absorbansi $\lambda_{260}/\lambda_{280}$	Rendemen RNA total (µg/g bahan segar)
Ujung akar	1.87	192.4
Daun dewasa	1.86	170.5
Daun pucuk	1.90	247



Gambar 1. RNA total dari ujung akar (1), daun dewasa (2), dan daun pucuk (3)

Sintesis cDNA total

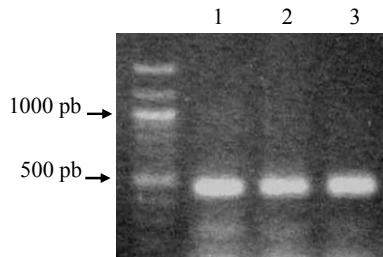
cDNA total telah berhasil disintesis melalui transkripsi balik dengan menggunakan RNA total sebagai cetakan. Dengan primer oligo-dT, hanya mRNA yang dapat disintesis menjadi cDNA karena mempunyai poliA pada ujung 3' sedangkan rRNA dan tRNA tidak mempunyai. PCR dengan menggunakan primer untuk ekson1-ekson2 dari gen aktin menghasilkan DNA yang berukuran sekitar 450 pb (Gambar 2) yang menunjukkan bahwa daerah yang diamplifikasi adalah cDNA ekson1-ekson2 bukan DNA ekson1-ekson2 dari gen aktin. DNA antara ekson1 dan ekson2 berukuran sekitar 640 pb, lebih besar daripada cDNAnya karena mengandung intron yang dibuang pada saat pembentukan mRNA. Teramplifikasinya cDNA dengan primer *ActF* dan *ActR* dengan ukuran 450 pb menunjukkan bahwa sintesis cDNA total melalui proses transkripsi balik telah berlangsung dengan baik. Hal ini juga menunjukkan bahwa RNA total yang telah diisolasi mempunyai kualitas yang sangat bagus, karena selain dapat digunakan untuk mensintesis cDNA juga terbebas dari kontaminasi DNA. Oleh sebab itu, cDNA total ini dapat digunakan sebagai bahan untuk mengisolasi fragmen cDNA *MaMrp* dengan PCR.

Isolasi fragmen cDNA *MaMrp* melalui PCR

PCR dengan cDNA total sebagai cetakan dan primer spesifik *mrpF* dan *mrpR* menghasilkan fragmen cDNA berukuran sekitar 640 pb, yang disebut dengan *MaMrp*. Adanya DNA yang berukuran sama yaitu sekitar 640 pb yang dihasilkan dari PCR dengan cDNA baik dari daun dewasa, daun pucuk, dan ujung akar (Gambar 3) menunjukkan bahwa *MaMrp* diekspresikan pada ketiga bagian *M. affine*. *AtMrp1* dan *AtMrp2* dari *A. thaliana* juga diekspresikan pada daun, batang dan akar [12].

Pengklonan fragmen *MaMrp* ke dalam plasmid pGEM-T Easy

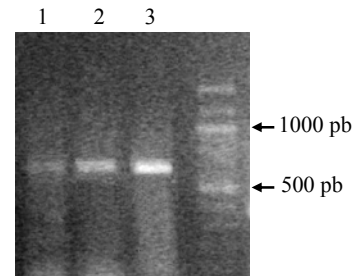
Fragmen cDNA *MaMrp* dari daun dewasa telah diligasikan dengan plasmid pGEM-T Easy di tengah gen *lacZ* dan hasil ligasi telah diintroduksi ke dalam *E. coli* galur DH5 α , dan diseleksi di media seleksi yang mengandung ampisilin, X-gal dan IPTG.



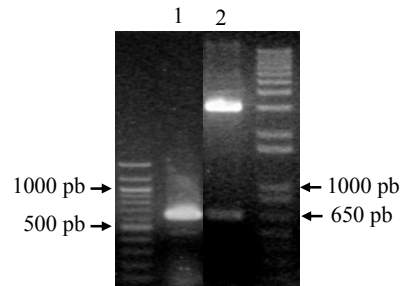
Gambar 2. Hasil PCR cDNA aktin menggunakan cetakan cDNA total dari daun dewasa (1), daun pucuk (2), dan ujung akar (3)

E. coli yang tumbuh di media seleksi mengandung plasmid, dan koloni yang berwarna putih di media seleksi adalah yang mengandung plasmid rekombinan, dan yang berwarna biru adalah yang mengandung plasmid non-rekombinan. Gen *lacZ* menyandi β -galactosidase (β -gal) yang mengubah substrat X-gal yang tidak berwarna menjadi berwarna biru. Bila fragmen *MaMrp* menyisip di dalam gen *lacZ*, maka gen *lacZ* tidak dapat diekspresikan sehingga koloni *E. coli* berwarna putih. Bila tidak ada penyisipan pada *lacZ*, maka koloni yang terbentuk berwarna biru.

Adanya sisipan fragmen *MaMrp* di dalam koloni putih dikonfirmasi dengan PCR. PCR terhadap koloni putih menghasilkan DNA yang berukuran sekitar 640 pb yang menunjukkan bahwa koloni putih mengandung fragmen *MaMrp* (Gambar 4). Untuk memastikan fragmen *MaMrp* tersisip di dalam pGEM-T Easy, DNA plasmid rekombinan telah diisolasi dari koloni putih ini. Pemotongan terhadap DNA plasmid rekombinan dengan *EcoRI* yang mengapit daerah penyisipan menghasilkan dua fragmen yaitu fragmen sekitar 3000 pb yang merupakan vektor pGEM-T Easy dan fragmen yang berukuran sama dengan fragmen *MaMrp* yaitu sekitar 640 pb (Gambar 4). Hasil ini menunjukkan bahwa fragmen *MaMrp* telah berhasil disisipkan ke dalam pGEM-T Easy.



Gambar 3. Fragmen *MaMrp* hasil PCR menggunakan cDNA total dari ujung akar (1), daun pucuk (2) dan daun dewasa (3) sebagai cetakan



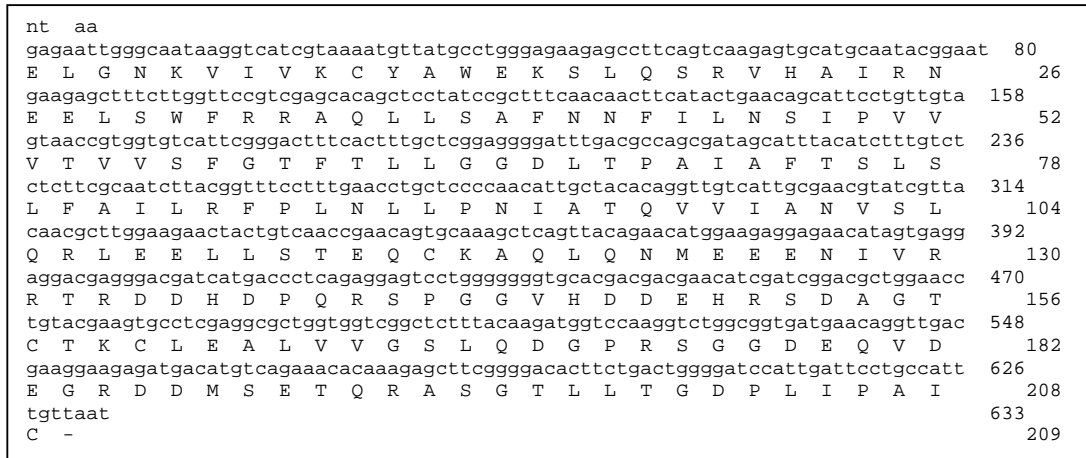
Gambar 4. Hasil analisis sisipan fragmen *MaMrp* dengan PCR-koloni (1) dan pemoangan DNA plasmid rekombinan dengan *EcoRI* (2)

Analisis fragmen *MaMrp*

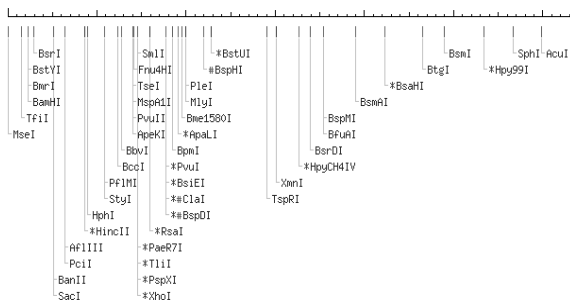
Pengurutan DNA terhadap fragmen *MaMrp* menghasilkan 633 pb yang menyandi 209 asam amino (Gambar 5). Analisis kesejajaran lokal berdasarkan urutan nukleotida dengan bank data di *GenBank* dengan program BLASTn menunjukkan bahwa fragmen *MaMrp* mempunyai kesamaan 69% dengan bagian *AtMrp1* (AF008124), dan 63% dengan bagian *AtMrp2* (AF020288) dari *A. thaliana*.

Analisis kesejajaran lokal berdasarkan urutan asam amino dengan BLASTp menunjukkan bahwa fragmen

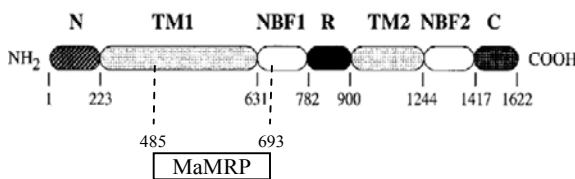
MaMRP mempunyai kesamaan 84% dengan *AtMRP13* (EC3.6.3.44), 77% dengan *AtMRP12* (EC.Q9C8H1), 74% dengan *AtMRP1* (EC.Q9C8G9). MRP memiliki dua domain transmembran yaitu TM1 dan TM2, dua domain pengikatan nukleotida yaitu NBF1 dan NBF2 dan satu domain regulator [11]. Berdasarkan analisis kesejajaran asam amino dengan *AtMRP1*, fragmen *MaMRP* terletak di daerah TM1 dan NBF1 (Gambar 7). TM1 menentukan spesifitas ligan dan merupakan pembeda dalam pengelompokan MRP dengan famili ABC transproter lainnya [11].



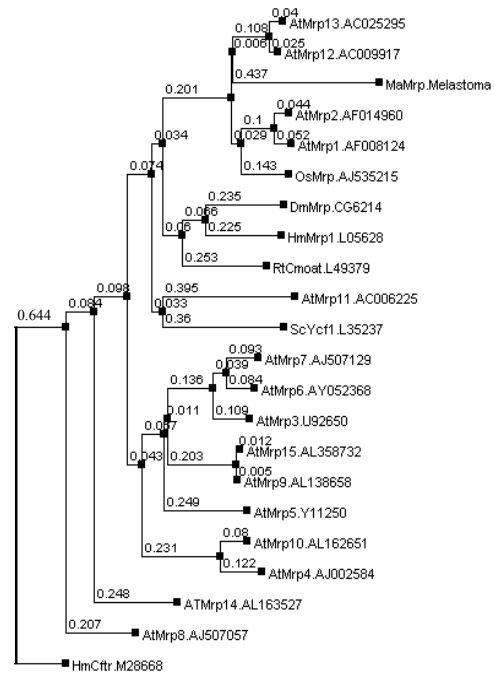
Gambar 5. Urutan nukleotida fragmen *MaMrp* dan deduksi asam aminonya



Gambar 6. Peta situs restriksi yang terdapat pada *MaMrp*



Gambar 7. Posisi fragmen *MaMRP* pada *AtMRP1*



Gambar 8. Pohon filogenetik berdasarkan urutan nukleotida *mrp* dari berbagai spesies. Angka menunjukkan ketidakmiripan

Analisis situs restriksi terhadap fragmen *MaMrp* menunjukkan bahwa kecuali *SphI* dan *SacI*, fragmen tersebut tidak mengandung situs restriksi yang terdapat pada situs multi pengklonan (*multicloning sites*) yang terdapat pada pGEM-T Easy (Gambar 6). *MaMrp* disisipkan di antara situs *ApaI*, *AatI*, *SphI*, *BstZI*, *NotI*, *SacII*, *EcoRI* di satu sisi dan *SpeI*, *EcoRI*, *NotI*, *BstZI*, *PstI*, *SalI*, *NdeI*, *SacI*, *BstXI*, *NsiI* di sisi lain sehingga kecuali *SphI* dan *SacI*, situs-situs tersebut dapat digunakan untuk mengeluarkan sisipan *Mamrp* dari plasmid rekombinan. Peta situs restriksi sangat penting dalam rekayasa genetika.

Berdasarkan urutan nukleotida, *MaMrp* terdapat di dalam satu kelompok dengan *AtMrp13*, *AtMrp12*, *AtMrp1* dan *AtMrp2* dari *A. thaliana*, dan *OsMrp* dari padi di dalam pohon filogenetik (Gambar 8). Karena susunan nukleotida dan asam amino yang memiliki kesamaan yang tinggi, MaMRP diduga mempunyai kesamaan peran dengan kelima MRP tersebut. AtMRP1 berperan dalam transportasi *GS conjugate* xenobiotik termasuk herbisida dan antosianin [11], dan AtMRP2 berperan dalam transportasi *GS conjugate* dan metabolit klorofil [12]. Konjugat spesifik yang ditransportasikan oleh AtMRP12, AtMRP13 dan OsMRP belum diketahui.

Analisis kesejajaran antar MRP berdasarkan urutan asam amino menunjukkan bahwa *M. affine* mempunyai urutan asam amino yang spesifik pada daerah antara TM1 dan NBF1 dengan urutan QCKAQLQNMEEE.

4. Kesimpulan

Fragmen cDNA *mrp* dari *M. affine* (*MaMrp*) yang berhasil diisolasi berukuran 633 pb dan memiliki kesamaan yang tinggi dengan *AtMrp*. Berdasarkan deduksi asam amino, MaMRP mempunyai kesamaan dengan daerah antara TM1 dan NBF1 dari AtMRP. MaMRP mempunyai daerah yang spesifik di antara TM1 dan NBF1 dengan urutan asam amino QCKAQLQNMEEE.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada Proyek Hibah Tim Penelitian Pascasarjana Angkatan III dari Ditjen Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional yang telah membiayai penelitian ini dengan judul "Isolasi dan karakterisasi gen-gen yang berhubungan dengan toleransi tanaman terhadap pH rendah dan aluminium tinggi" atas nama Suharsono.

Daftar Acuan

[1] Center for Soil and Agroclimate Research, Statistik Sumberdaya Lahan/Tanah Indonesia dan

- Agroklimat, Badan Litbang Departemen Pertanian Jakarta. 1997.
- [2] T. Watanabe, M. Osaki, T. Yoshihara, T. Tadano, *Plant Soil* 201 (1998)165-173.
- [3] T. Ishikawa, *Trends Biochem. Sci.*, 17 (1992) 463-468.
- [4] E. Pilon-Smits, M. Pilon. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 21 (2002) 439-456
- [5] B. Hinder, M. Schellenberg, S. Rodoni, S. Ginsburg, E. Vogt, E. Martinoia, P. Matile, S. Hörtensteiner, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 27233-27236.
- [6] M. Klein, G. Weissenbock, A. Dufaud, C. Gaillard, K. Kreuz, E. Martinoia. *J. Biol Chem.* 271(1996) 29666-29671.
- [7] N. Gaedeke, M. Klein, U. Kolukisaoglu, C. Forestier, A. Müller, M. Ansorge, D. Becker, Y. Mamnun, K. Kuchler, B. Schulz, B. Mueller-Roeber, E. Martinoia, *EMBO J.* 20 (2001) 1875-1887.
- [8] M. Mueller, C. Meijer, G.J.R. Zaman, P. Borst, R.J. Scheper, N.H. Mulder, E.G.E. de Vriest, P.L.M. Jansen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 13033-13037.
- [9] M.S. Szczyzka, J.A. Wemmie, W.S. Moye-Rowley, D.J. Thiele, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 22853-22857.
- [10] R. Tommasini, R. Evers, E. Vogt, C. Mornet, G.J.R. Zaman, A.H. Schinkel, P. Borst, E. Martinoia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 6743-6748.
- [11] Y-P. Lu, Z-S. Li, P.A. Rea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 8243-8248
- [12] Y-P. Lu, Z-S. Li, Y.M. Drozdowicz, S. Hörtensteiner, E. Martinoia, P.A. Rea. *Plant Cell* 10 (1998) 267-282.
- [13] Z-S. Li, Y-P. Lu, R-G. Zhen, M. Szczyzka, D.J. Thiele, P.A. Rea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 42-47.
- [14] T. Sasaki, B. Ezaki, H. Matsumoto, *Plant Cell Physiol.*, 43 (2002) 177-185.
- [15] S. Chang, J. Puryear, J. Cairney., *Plant Mol. Biol. Rep.* 11 (1993) 113-116.
- [16] G.C. Saunders, H.P. Parker, *Analytical Molecular Biology: Quality and Validation*, LGC Press, Teddington, 1999.
- [17] Suharsono, *Hayati* 9 (2002) 67-70.
- [18] D.W. Mount, *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.
- [19] K. Katoh, K. Kuma, H. Toh, T. Muyata. *Nucl. Acid Res.* 33 (2005) 511-518.