

Penapisan Pustaka Genom Tanaman Kedelai Kultivar Lumut Menggunakan Pelacak Gen Peroksidase dari *Arabidopsis thaliana*

Screening of Genomic Library of Soybean Cultivar Lumut by Using Peroxidase Gene from Arabidopsis thaliana as Probe

Suharsono^{1,2)}, Teguh Julianto³⁾, Muhammad Jusuf^{1,2)}
¹Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi IPB
²Departemen Biologi, FMIPA IPB
³Universitas Muhammadiyah Solo

ABSTRACT

Screening to genomic library of soybean cv. Lumut by using gene encoding for peroxidase (*per*) from *A. thaliana* as a probe has an objective isolate the whole gene of *per* from soybean. The probe was labeled by non-radioisotope alkaline phosphatase. Screening was done by two steps. The first, screening was done to 10⁵ recombinant lambda phages containing genome of soybean cv. Lumut. After southern hybridization, positive signal of plaques were isolated and screened for the second time. After second screening, some recombinant lambda phages containing putatively *per* genes were isolated. Excision from recombinant lambda phages into recombinant plasmid was successfully done in *Escherichia coli* strain BM25.8. The plasmid DNAs were isolated from *E. coli* strain BM25.8 and introduced into *E. coli* strain DH5 α for multiplication. Plasmid DNAs were digested by *EcoRI* and transferred onto nylon membrane hybrid N⁺. Southern hybridization analysis showed that one clone, L10/R/3/4, contain *per* gene in the 7.7 kb *EcoRI* fragment. This fragment is inserted into pSportI.

Keywords: Genomic library, soybean, peroxidase, screening

PENDAHULUAN

Peroksidase merupakan enzim oksidoreduktase yang menghidrolisis hidrogen peroksida yang tersebar di seluruh bagian tanaman. Enzim peroksidase berhubungan erat dengan proses lignifikasi (Mäder & Füssl 1982), perkecambahan (Likies *et al.* 2010), penyembuhan luka, oksidasi fenol, cekaman garam NaCl (Hong *et al.* 2007), dan sistem pertahanan terhadap patogen. Gen utuh *ApxI* penyandi peroksidase dari kacang kapri (*Pisum sativum*) yang berukuran 2,5 kb yang mengandung 9 intron telah berhasil diisolasi melalui penapisan terhadap pustaka genom (Mittler & Zilinska 1992). Melalui penapisan terhadap pustaka cDNA dari *Arabidopsis thaliana*, Intaprak *et al.* (1994) telah mengisolasi cDNA dari gen peroksidase *A. thaliana* yang mengandung kerangka baca (open reading frame) 1059 pb yang menyandi 353 asam amino.

Dengan menggunakan pelacak cDNA dari gandum, Reimann *et al.* (1992) telah berhasil mengisolasi gen peroksidase dari padi yang ekspresinya diinduksi oleh serangan patogen.

Dari kotiledon kapas yang mendapat cekaman garam, Ritter *et al.* (1993) telah mengisolasi cDNA penyandi peroksidase. Dari *Arabidopsis thaliana*, melalui penapisan diferensial, cDNA dari gen peroksidase yang ekspresinya diinduksi oleh cekaman aluminium telah diisolasi (Richards & Gardner 1998). Ekspresi gen *Apx* yang menyandi peroksidase askorbat diinduksi oleh cekaman intensitas cahaya tinggi dan metil viologen pada daun bayam (Yoshimura *et al.* 2000). Analisis berdasarkan hibridisasi southern terhadap DNA genom kedelai menunjukkan bahwa gen peroksidase dari *A. thaliana* dapat digunakan untuk melacak keberadaan gen peroksidase dari tanaman kedelai (Anggraini 1999). Pustaka genom kedelai kultivar Lumut yang peka terhadap cekaman aluminium telah dikonstruksi (Suharsono 2007). Pustaka genom sangat diperlukan dalam usaha mengisolasi gen secara utuh, yang meliputi daerah penyandi dan bukan penyandi dan pengatur ekspresi gen tersebut. Dengan menggunakan gen yang berasal dari spesies lain sebagai pelacak, melalui penapisan

terhadap pustaka genom, gen yang sama dari tanaman kedelai dapat diisolasi.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi gen penyandi peroksidase melalui penapisan terhadap pustaka genom kedelai dari kultivar lumut.

METODE

Bahan penelitian

Pustaka genom kedelai kultivar Lumut (Suharsono 2007) digunakan sebagai bahan untuk penapisan. Peta fisik fage λ BlueSTAR-1 (Novagen) rekombinan yang mengandung DNA kedelai penyusun pustaka genom kedelai kultivar Lumut disajikan pada Gambar 1. Bakteri *Escherichia coli* galur ER 1647 digunakan sebagai inang untuk memperbanyak fage rekombinan. *E. coli* galur BM 25.8 digunakan sebagai inang untuk proses eksisi dari bentuk fage λ rekombinan menjadi plasmid rekombinan. *E. coli* galur DH5 α digunakan sebagai inang memperbanyak plasmid rekombinan. Gen penyandi enzim peroksidase (gen *per*) dari *A. thaliana* digunakan sebagai pelacak dalam hibridisasi southern.

Transveksi fage λ rekombinan ke dalam *E. coli*

Transveksi fage λ rekombinan ke dalam bakteri dilakukan seperti yang dilakukan oleh Suharsono (2002, 2007), yaitu dengan mencampurkan 100 μ l bakteri *E. coli* galur ER 1647 ($OD_{600} = 1$) dan 100 μ l fage λ . Pada penapisan tahap I, fage λ rekombinan yang digunakan berjumlah 10^5 tiap cawan petri dengan diameter 18 cm. Pada penapisan tahap II, fage λ yang digunakan adalah sekitar 50 fage tiap cawan petri dengan diameter 8 cm. Campuran diinkubasi dalam inkubator 37°C selama 30 menit, dan dimasukkan ke dalam 4 ml agarose cair permukaan (*molten top agarose*) (10 g/l tripton, 5 g/l NaCl dan 6 g/l agarose) yang mempunyai suhu 47°C. Campuran disebar di atas permukaan media H (10 g/l tripton, 8 g/l NaCl, 15 g/l agar-agar) dalam cawan petri dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama semalam.

Pembuatan replika fage di membran nilon

Setelah transveksi diinkubasikan semalam di suhu 37°C, plak yang terbentuk dipindahkan ke membran nilon hybond N⁺ (Amersham, Pharmacia). Untuk itu, membran nilon diletakkan di atas plak yang ada di dalam cawan petri sedemikian rupa sehingga permukaan membran bersentuhan langsung dengan plak selama 1-3 menit. Fage yang terdapat di membran didenaturasi dengan cara meletakkan permukaan membran yang mengandung fage di atas 3 ml larutan denaturasi (1,5M NaCl; 0,5M NaOH) selama 1 menit. Dengan cara yang sama, membran kemudian dipindah ke atas 3 ml larutan netralisasi (1,5M NaCl; 0,5M Tris-HCl pH 8) selama 1 menit. Setelah dikeringanginkan, DNA fage yang ada

membran nilon difiksasi dengan menggunakan UV *cross Linker* (Vilber Lourmat BLX-254).

Isolasi dan pelabelan DNA pelacak

Gen *per* yang tersisip di dalam pSport-1 diperbanyak dengan PCR dengan menggunakan primer T7 dan SP6 dengan menggunakan 30 siklus (PTC-100TM, MJ Research Inc.) dengan kondisi pra-PCR 94°C 2 menit, denaturasi 92°C 30 detik, penempelan primer 55°C 30 detik, pemanjangan 75°C 1 menit, dan pasca-PCR pada suhu 75°C 5 menit. Hasil PCR dimigrasikan di dalam 0,8% gel agarose di dalam 1 x bufer TAE (0,04 M Tris-acetate, 0,001 M EDTA). Gel yang mengandung pita gen *per* diisolasi dan dimasukkan ke dalam kolom yang mempunyai filter 0,22 μ m (*Ultrafree MC Centrifugal Filter, Millipore*) yang kemudian dimasukkan ke dalam N₂ cair. Kolom yang mengandung gel ditambahi dengan larutan TE (10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA), kemudian disentrifugasi pada kecepatan 18.407 x g selama 5 menit, pada suhu 25° C. Perlakuan ini diulang 3 kali. Cairan yang dihasilkan dipresipitasi dengan penambahan 0,1 volume 3 M Natrium Acetat pH 5,2 dan 2 volume etanol absolut, dan diinkubasikan pada suhu -20° C selama semalam. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 18.407 x g pada suhu 4° C selama 20 menit. Endapan DNA dibilas dengan etanol 70% dan dikeringkan dengan *vacuum dryer*, kemudian dilarutkan dengan H₂O.

DNA pelacak dilabel dengan menggunakan alkaline fosfatase menggunakan kit *AlkPhos DirectTM Labelling and Detection System* (Amersham, Pharmacia Biotech). Untuk itu, 100 ng DNA pelacak yang telah didenaturasi dengan pemanasan pada suhu 100° C selama 5 menit dan pendinginan di dalam es selama 5 menit, dicampur dengan 10 μ l buffer pereaksi, 2 μ l *labelling reagent* dan 10 μ l *Cross Linker*, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit.

Hibridisasi Southern

Membran nilon yang mengandung DNA fage dan larutan prehibridisasi (0,5M NaCl; 0,4% blocking reagent) dimasukkan ke dalam tabung hibridisasi. Prehibridisasi dilakukan selama 2 jam pada suhu 55°C di dalam oven hibridisasi (Hybaid). Hibridisasi dilakukan dengan menambahkan pelacak yang sudah dilabel dengan alkaline fosfatase dari Amersham (Pharmacia) ke dalam larutan (pre)hibridisasi pada suhu 55°C selama semalam. DNA pelacak dilabel dengan cara mencampur 100 ng DNA (dalam 10 μ l) yang telah didenaturasi dengan pemanasan selama 5 menit yang diikuti dengan penyimpanan di dalam es, 10 μ l buffer reaksi, 2 μ l reagen pelabelan dan 10 μ l larutan cross-linker (AlkPhos direct labeling, Amersham Pharmacia). Campuran ini kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 30 menit.

Setelah hibridisasi membran dicuci dengan *Primary Washing Buffer* (2 M Urea; 0,1% SDS; 50 mM Na fosfat pH7; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl₂ dan 0,2% Blocking Reagent) pada suhu 55°C di dalam oven hibridisasi sebanyak 2 kali, masing-

masing 10 menit. Membran kemudian dicuci dengan *Secondary Washing Buffer* (50 mM Tris; 100 mM NaCl; 2 mM MgCl₂, pH 10) pada suhu ruang sebanyak 2 kali, masing-masing selama 5 menit.

Untuk mendeteksi signal hibridisasi, membran diletakkan diatas larutan deteksi (*CDP-Star Chemiluminescent Detection Reagent*) dari Amersham, Pharmacia selama 3 menit pada suhu ruang. Setelah dibebaskan dari kelebihan larutan deteksi, membran dibungkus dengan plastik dan film X-ray diletakkan di atasnya di dalam kaset hibridisasi. Inkubasi dilakukan selama 4 jam di suhu ruang.

Film X-ray dicuci dengan perendaman secara berurutan di dalam larutan developer (Fuji) selama 3 menit, fixer selama 15 menit dan H₂O. Hasil hibridisasi dibandingkan dengan plak yang ada di cawan petri.

Isolasi fage dari gel agarosa

Plak-plak yang menunjukkan signal hibridisasi diisolasi dari media H mengikuti prosedur Suharsono (2002). Fage dielus dari gel agarosa dengan memasukan gel yang mengandung plak ke dalam 500 µl media SM (5,8 g/l NaCl; 2 g/l MgSO₄.7H₂O; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1g/l gelatin) yang mengandung 25 µl chloroform, dan menginkubasikannya pada suhu 4° C selama satu malam.

Eksisi dari fage menjadi plasmid

Eksisi dilakukan dengan mengikuti prosedur Suharsono (2002, 2007) yaitu dengan mencampurkan 100 µl *E. coli* galur BM 25,8 (OD₆₀₀ = 1) dengan 100 µl fage λ. Campuran diinkubasikan di balok pemanas pada suhu 37°C selama 30 menit dan disebar di atas media LB padat (10 g/l tripton, 5 g/l ekstrak khamir, 10 g/l NaCl, 15 g/l agar-agar, pH 7,5) yang mengandung 100 ppm ampisilin, dan kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C di dalam incubator selama satu malam. Koloni bakteri yang terbentuk diisolasi dan dibiakkan dalam media cair untuk diisolasi DNA plasmidnya.

Isolasi DNA plasmid

Isolasi DNA plasmid dilakukan sesuai dengan prosedur Suharsono (2002) yaitu dengan menumbuhkan satu koloni bakteri *E. coli* yang mengandung DNA plasmid di dalam 10 ml media LB cair yang mengandung 100 ppm ampisilin pada incubator bergoyang (250 rpm) pada suhu 37°C selama satu malam. Bakteri diendapkan dengan sentrifugasi menggunakan rotor *swing-out* dengan kecepatan 3026 xg (Jouan BR-4i) pada suhu 4°C selama 20 menit. Bakteri disuspensi dengan 600 µl larutan suspensi sel (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA), kemudian dilisis dengan 600 µl larutan pelisis (0,2 M NaOH; 1% SDS). Selanjutnya, ke dalam sel yang telah mengalami lisis ditambahkan 600 µl larutan buffer netralisasi (1,32 M sodium asetat, pH 4,8). Campuran disentrifugasi

pada kecepatan 18500 xg selama 20 menit pada suhu 4°C. Cairan yang mengandung DNA plasmid diekstraksi dengan menggunakan 1x volume PCIAA (phenol:chloroform:isoamil alkohol dengan perbandingan 25:24:1), kemudian diperlakukan dengan RNase (100 µg RNase/ml DNA) pada suhu 37°C selama satu malam. RNase dihilangkan dengan melakukan ekstraksi menggunakan PCIAA. Cairan yang mengandung DNA dipresipitasi dengan menambahkan 0,1 x volume 3 M natrium asetat pH 5,2, 2 x volume etanol absolut dan diinkubasi pada suhu -35°C selama 2 jam. DNA plasmid diendapkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 18500 x g pada suhu 4°C selama 20 menit. DNA plasmid dibilas dengan etanol 70% dan dikeringkan dalam *vacuum dryer*, kemudian disuspensi dengan H₂O.

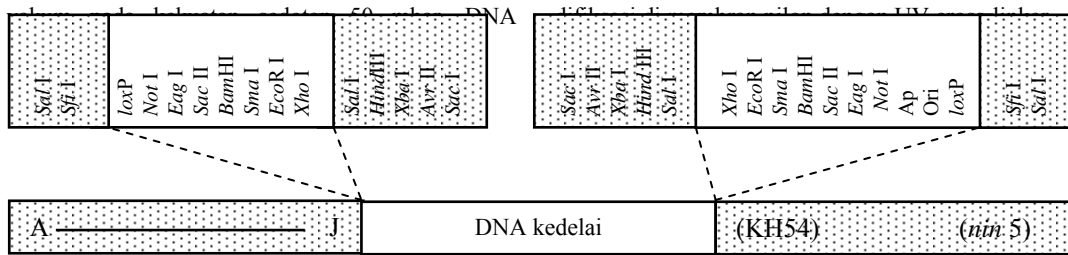
Transformasi bakteri *E. coli* galur DH5α.

Pembuatan bakteri kompeten mengikuti prosedur Sambrook *et al.* (1989). Satu koloni bakteri *E. coli* galur DH5α dikultur dalam 2 ml media LB cair selama 8-10 jam dalam incubator bergoyang (kecepatan 250 rpm) pada suhu 37°C, kemudian disubkultur dalam 10 ml media LB cair hingga mencapai OD₅₅₀ = 0,45-0,55. Bakteri diendapkan dengan sentrifugasi menggunakan rotor *swing-out* pada kecepatan 3026 x g (Jouan BR-4i) suhu 4°C selama 20 menit. Endapan bakteri disuspensikan dengan 1 ml 0,1 M CaCl₂ kemudian diinkubasi di dalam es selama 20 menit. Bakteri diendapkan dengan sentrifugasi dan disuspensikan lagi di dalam 200 µl 0,1M CaCl₂, dan kemudian diinkubasikan dalam es selama 30-60 menit.

Transformasi bakteri dilakukan sesuai dengan prosedur Suharsono (2002), yaitu dengan mencampur 100 µl bakteri kompeten dengan 10 µl (50-100 ng) DNA plasmid dan menginkubasikannya dalam es selama 30 menit. Campuran bakteri-DNA plasmid ini kemudian diperlakukan dengan *heat-shock* pada suhu 42°C selama 60 detik, kemudian diinkubasikan lagi di dalam es selama 5 menit. Selanjutnya campuran ditambah 250 µl media 2xYT (16 g/l tripton, 10 g/l ekstrak khamir, 5 g/l NaCl, pH 7,0) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Bakteri disebar di atas media LB padat yang mengandung 100 ppm ampisilin dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu malam.

Transfer DNA plasmid ke membran nilon

DNA plasmid dipotong dengan enzim restriksi *EcoRI*, kemudian dimigrasikan di 0,8% gel agarosa di dalam buffer TAE (40 mM Tris-asetat, 1 mM EDTA, pH8). DNA plasmid di dalam gel kemudian didenaturasi selama 20 menit dan direndam di dalam larutan netralisasi selama 20 menit. Larutan denaturasi dan netralisasi sama dengan yang dipakai pada fage. DNA yang di gel agarosa kemudian ditransfer ke membran nilon hybond N+ (Amersham, Pharmacia) menggunakan pompa



Gambar 1. Peta fisik fage λ BlueSTAR-1 rekombinan yang mengandung DNA kedelai kultivar Lumut dari pustaka genom kedelai. Fragmen yang mengandung *SalI*, *HindIII*, *XbaI*, *AvrII* dan *SacI* di kedua sisi DNA kedelai hilang pada saat penyisipan DNA kedelai ke dalam situs *XhoI* untuk membentuk fage λ BlueSTAR-1 rekombinan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penapisan pustaka genom

Fage λ rekombinan yang menginfeksi dan melisis bakteri *E. coli* galur ER 1647 membentuk plak. Inkubasi selama semalam menghasilkan plak yang berdiameter sekitar 1-2 mm (Gambar 2). Plak berbentuk bulat jernih/bening diantara hamparan bakteri yang berwarna putih keruh. Setiap plak tersusun dari satu jenis fage yang melisis bakteri yang jumlahnya sangat banyak tergantung dari lamanya waktu inkubasi. Semakin lama waktu inkubasi, maka ukuran plak akan bertambah besar dan jumlah fage penyusunnya akan semakin besar. Plak ini digunakan sebagai bahan yang ditapis.

Penapisan I, menggunakan fage dalam jumlah besar (10^5) untuk memperbesar peluang mendapatkan gen sasaran. Semakin besar jumlah fage yang akan ditapis, semakin besar pula peluang mendapatkan gen sasaran. Untuk gen yang jumlah kopinya rendah, maka jumlah pustaka genom yang diperlukan untuk ditapis semakin besar agar gen sasaran tersebut dapat diisolasi. Gen peroksidase merupakan gen yang jumlah kopinya cukup tinggi karena terdapat hampir di semua jaringan tanaman sehingga dengan jumlah 10^5 fage rekombinan sudah mencukupi untuk dilakukan penapisan.

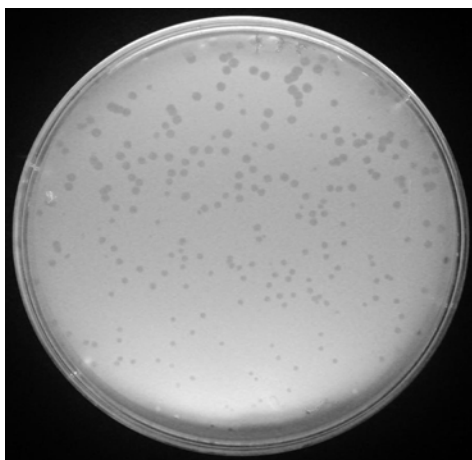
Penapisan untuk mendapatkan fage yang mengandung gen sasaran dilakukan dengan teknik hibridisasi southern terhadap pustaka genom. Untuk itu, plak yang terbentuk dari proses trasveksi fage λ ke dalam *E. coli* dipindahkan ke membran dengan membuat replikanya. Penempelan membran nylon hybon N^+ di atas plak selama 1 menit mampu memindahkan sebagian fage yang ada di plak ke membran. Karena fage λ mengandung protein yang membungkus DNA sedangkan hibridisasi southern dilakukan terhadap DNA,

maka fage λ harus didenaturasi. Selain membuang protein pembungkus, denaturasi juga dimaksudkan untuk membuat DNA fage menjadi utas tunggal sehingga bisa berpasangan secara komplementer dengan DNA pelacak yang juga sudah mengalami denaturasi. Pada penapisan I, karena rapatnya antara satu plak dengan plak lainnya, hibridisasi southern dengan pelacak gen peroksidase telah memberikan signal hibridisasi pada beberapa plak yang saling bersinggungan. Untuk memisahkan satu jenis fage rekombinan dari yang lainnya, maka plak yang memberikan signal hibridisasi diisolasi dan ditapis kembali dengan jumlah fage yang sedikit. Pengenceran $100 \times$ dari $500 \mu\text{l}$ suspensi fage yang dielus dari 1 plak menghasilkan sebaran plak yang memuaskan untuk penapisan kedua. Hampir semua plak pada penapisan II memberikan signal hibridisasi (Gambar 3). Dari plak-plak ini, beberapa fage rekombinan yang diduga mengandung gen *per* telah berhasil diisolasi dalam bufer SM.

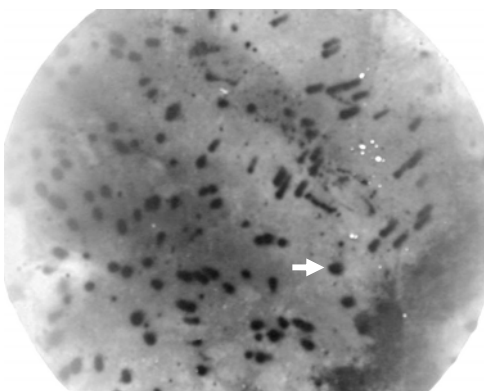
Eksisi dan transformasi bakteri

Untuk memudahkan dalam menganalisis DNA sisipan yang diduga mengandung gen *per*, fage rekombinan yang membawa sisipan tersebut diinduksi untuk melakukan eksisi sehingga membentuk plasmid rekombinan. Proses eksisi terjadi bila fage rekombinan diinfeksi ke *E. coli* galur BM 25.8. Proses eksisi terjadi karena adanya proses rekombinasi yang terjadi pada dua daerah *loxP* yang mengapit DNA tanaman kedelai yang merupakan DNA sisipan yang terdapat pada fage λ BlueSTAR-1 rekombinan (Suharsono 2007). Dua daerah *loxP* yang homolog dapat berpasangan. Dengan adanya rekombinase yang disandi oleh gen *cre* yang terdapat pada kromosom *E. coli* galur

BM25.8 menyebabkan kedua daerah *loxP* dapat mengalami pindah silang (*cross over*).



Gambar 2. Plak hasil transveksi fage λ rekombinan ke dalam bakteri *E. Coli*.



Gambar 3. Signal hibridisasi pada penapisan tahap II. Panah menunjukkan signal hibridisasi.

Sebagai akibat proses pindah silang, kedua potongan *loxP* dapat menyambung sehingga membentuk molekul sirkuler yang membentuk plasmid. Karena *ori E. coli* (titik asal replikasi) terdapat di antara dua *loxP*, maka plasmid ini dapat memperbanyak diri sedangkan fragmen DNA di luar kedua *loxP* yaitu fragmen A-J, KH54, nin 5, dan fragmen yang mengandung situs *Sall* dan *SfiI* (Gambar 1) yang tidak mengandung *ori* tidak dapat memperbanyak diri sehingga bila *E. coli* melakukan pembelahan sel secara berulang mengakibatkan fragmen tersebut hilang dari populasi sel.

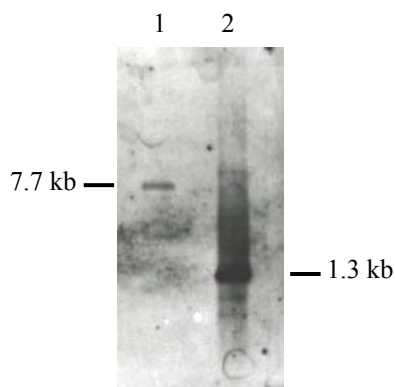
Pengenceran 100 \times dari 500 μ l suspensi fage yang dielusi dari plak yang memberikan signal hibridisasi pada penapisan kedua, menghasilkan sebaran

koloni bakteri yang saling terpisah setelah dilakukan proses eksisi. Karena bakteri *E coli* galur BM 25.8 tidak baik dalam mendukung perbanyakan plasmid yang dikandungnya, maka plasmid rekombinan yang diduga mengandung gen *per* diisolasi dan diintroduksi ke dalam *E coli* galur DH5 α .

Analisis DNA sisipan

Analisis DNA sisipan yang diduga mengandung gen *per* dilakukan dengan cara memotong plasmid rekombinan (turunan dari fage λ rekombinan) yang diisolasi dari *E. coli* galur DH5 α dengan menggunakan enzim restriksi *EcoRI*. Ukuran rata-rata DNA yang tersisip ke dalam vektor lebih dari 15 kb, lebih besar dari ukuran vektornya, yaitu 2,13 kb seperti pada penelitian Suharsono (2002) dan Suharsono (2007).

Hibridisasi southern terhadap plasmid yang dipotong dengan *EcoRI* dengan pelacak gen *per* menunjukkan bahwa salah satu klon dari bakteri L10/R/3/4 mengandung plasmid yang diduga membawa gen *per* (Gambar 4). Di dalam klon L10/R/3/4, gen *per* tersisip di dalam fragmen 7.7 kb sehingga kemudian disebut dengan fragmen *EcoRI* 7.7 kb. Fragmen ini saat ini sedang dalam proses pengklonan ke dalam vector pSportI.



Gambar 4. Hasil hibridisasi southern terhadap plasmid rekombinan klon L10/R/3/4 yang dipotong dengan *EcoRI* (lajur 1) dengan menggunakan gen *per* (lajur 2) sebagai pelacak.

KESIMPULAN

Beberapa fage rekombinan yang diduga mengandung gen *per* dari kedelai kultivar Lumut telah berhasil diisolasi. Salah satu dari klon bakteri (L10/R/3/4) yang mengandung plasmid yang diturunkan dari salah satu fage rekombinan terpilih membawa gen *per* pada fragmen *EcoRI* 7.7 kb.

Ucapan terimakasih

Terima kasih diucapkan kepada Proyek RUT VIII yang telah membiayai penelitian ini dengan judul: Isolasi dan karakterisasi gen-gen pada tanaman kedelai yang mendapat cekaman aluminium.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggraini V. 1999. *Identifikasi gen-gen toleran aluminium pada kedelai menggunakan gen pelacak dari Arabidopsis dan Gandum*. Thesis S2. Program Pascasarjana IPB.
- Hong C-Y, Hsu YT, Tsai Y-C & Kao CH. 2007. Expression of ASCORBATE PEROXIDASE 8 in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings in response to NaCl. *J. Exp. Bot.* **58** (12):3273-3283
- Linkies A, Schuster-Sherpa U, Tintelnot S, Leubner-Metzger G. & Müller K. 2010. Peroxidases identified in a subtractive cDNA library approach show tissue-specific transcript abundance and enzyme activity during seed germination of *Lepidium sativum*. *J. Exp. Bot.* **61** (2): 491-502.
- Mäder M & Füssl R. 1982. Role of Peroxidase in Lignification of Tobacco Cells: II. Regulation by Phenolic Compounds. *Plant Physiol.* **70**: 1132-1134.
- Mittler R. & Zilinska BA. 1992. Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *J. Biol. Chem.* **267** (30): 21802-21807.
- Reimann C, Ringli C & Dudler R. 1992. Complementary DNA cloning and sequence analysis of pathogen-induced putative peroxidase from rice. *Plant Physiol.* **100**: 1611-1612.
- Richards KD & Gardner RC. 1998. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **116**: 409-418.
- Ritter D, Allen RD, Trolinder N, Hughes DW & Galau GA. 1993. Cotton cotyledon cDNA encoding a peroxidase. *Plant Physiol.* **102**: 1351.
- Sambrook J, Frisch EF & Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab. CSH. New York.
- Suharsono. 2002. Konstruksi pustaka genom kedelai kultivar Slamet. *Hayati* **9** (3): 67-70.
- Suharsono. 2007. Pembuatan pustaka genom kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) kultivar lumut di dalam fag lambda. *Biosfera* **24** (2): 83-90.
- Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T & Shigeoka S. 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol.* **123**: 223-233.
- Intapruk C, Takano M & Shinmyo A. 1994. Nucleotide sequence of a new cDNA for peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **104**: 285-286.