

Ekspresi dan kloning gen penyandi ADP-Glucose Phyrophosphorylase dari tanaman sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.)

*Expression and cloning of gene encoding ADP-Glucose Phyrophosphorylase
from sago palm (Metroxylon sagu Rottb.)*

Asmini BUDIANI^{1)*}, Riza Arief PUTRANTO¹⁾, Hayati MINARSIH¹⁾, Imron RIYADI¹⁾,
SUMARYONO¹⁾ & Barahima ABBAS²⁾

¹⁾Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, Jl. Taman Kencana No.1 Bogor, Indonesia

²⁾Pusat Penelitian Ubi-ubian dan Sagu, Universitas Negeri Papua,
Jl. Gunung Salju, Amban, Manokwari 98314, Papua Barat, Indonesia

Diterima tanggal 15 Juni 2015/disetujui tanggal 1 September 2015

Abstract

Sago palm (Metroxylon sagu Rottb.) is a potential food and energy resources because it is the highest starch producing plant. Breeding of sago palm should be directed to produce elite genotype with superior characters such as high starch content, wider pith diameter, without spine and high starch quality. However, research on sago palm in Indonesia so far is limited especially in the field of cultivation and breeding, and attempt to produce such elite would take long time. Availability of molecular marker for starch content would be beneficial to shorten the length period of breeding. ADP-Glucose Phyrophosphorylase is one of the important enzymes in starch biosynthesis. Therefore its gene is an interesting subject in order to develop molecular marker of high starch content. This research was aimed to study the expression of gene encoding AGP in the sago palm with high starch content versus low starch content, and to clone the full cds of the gene. RNA was isolated from leaf and pith of both palms. Expression analysis and amplification of full cds were conducted by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) using specific primers. The results showed that sago palm with higher starch content expressed AGP higher than that of sago palm with lower starch content. Expression of AGP in the full developing leaf was higher than in the young leaf, and there was no expression detected in the pith. The full cds of AGP was successfully amplified and cloned. Even though the DNA sequence showed high homology with DNA sequence of the same gene that has been deposited in GenBank, there were differences in several nucleotide including that in the active domain of the enzyme.

[Keywords: *Metroxylon sagu*, starch content, expression analysis, active domain]

Abstrak

Tanaman sagu merupakan sumber pangan dan energi yang sangat potensial untuk dikembangkan karena merupakan tanaman penghasil karbihidrat tertinggi. Pemuliaan tanaman sagu mestinya diarahkan untuk menghasilkan bibit sagu yang selain memiliki rendemen pati tinggi, juga memiliki diameter empulur besar, tidak berduri dan memiliki cita rasa pati yang enak. Namun, sampai saat ini riset mengenai sagu di Indonesia masih sangat terbatas, sehingga pemuliaan sagu untuk menghasilkan bibit unggul demikian akan memerlukan waktu lama. Ketersediaan penanda rendemen pati akan sangat membantu mempercepat pemuliaan tanaman tersebut. ADP-Glucose Pyrophosphorylase adalah salah satu enzim yang berperan penting dalam biosintesis pati, sehingga gene penyandinya merupakan subjek yang menarik dalam pengembangan marka kandungan pati tinggi. Sebagai bagian dari upaya untuk mendapatkan penanda rendemen pati tinggi pada tanaman sagu, penelitian ini bertujuan untuk mempelajari ekspresi gen penyandi AGP. RNA diisolasi dari daun tanaman sagu rendemen pati rendah dan tanaman sagu rendemen pati tinggi. Perbedaan tingkat ekspresi gen penyandi AGP dari tanaman sagu rendemen pati tinggi vs rendemen pati rendah, dianalisis dengan teknik Reverse-Transcriptase PCR menggunakan primer spesifik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanaman sagu rendemen pati tinggi mengekspresikan AGP lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman sagu rendemen pati rendah. Ekspresi gen tersebut pada daun tua (*full developing leaf*) lebih tinggi dibandingkan dengan pada daun muda, dan pada empulur tidak dideteksi ekspresi gen tersebut. Daerah penyandi lengkap AGP subunit kecil telah diklon. Meskipun memiliki homologi yang tinggi dengan sekuen DNA gen yang sama yang telah dideposit pada GenBank, namun terdapat perbedaan beberapa

^{*)} Penulis korespondensi: asminib@yahoo.com

nukleotida termasuk pada daerah domain aktif dari enzim tersebut.

[Kata kunci: *Metroxylon sagu*, kandungan pati, analisis ekspresi, domain aktif]

Pendahuluan

Tanaman sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.) merupakan sumber pangan dan energi yang sangat potensial, karena merupakan penghasil karbohidrat tertinggi, yaitu 15-25 ton pati kering/Ha/Th (Flach, 1997, Tenda *et al.*, 2009). Luas areal tanaman sagu di dunia lebih kurang dua juta hektar, dan sekitar 60% areal sagu dunia berada di Indonesia, 90% di antaranya tersebar di Papua dan Papua Barat (Novariant, 2013). Meskipun memiliki potensi besar sebagai sumber pangan dan energi, dan telah lama menjadi bahan makanan pokok bagi sebagian besar penduduk Indonesia bagian Timur, namun riset terkait dengan budidaya dan pemuliaan tanaman ini jauh tertinggal dibandingkan dengan tanaman pangan maupun perkebunan lain. Sejauh ini riset terkait tanaman ini lebih banyak dilakukan pada aspek hilir seperti pengolahan dan pemanfaatan pati sagu (Ngampongsai & Chanjula, 2009) dan limbahnya (Awg-Adeni *et al.*, 2010), hingga keamanan pati sagu sebagai bahan pangan (Greenhill, 2006). Untuk mengatasi keterbatasan bibit yang diperlukan, Riyadi *et al.* (2005) dan Sumaryono *et al.* (2009) melaporkan hasil perbanyakan klonal tanaman ini melalui embriyogenesis somatik. Abbas *et al.* (2009) mempelajari hirarki dan diferensiasi genetik serta hubungan kekerabatan genetik tanaman sagu di Indonesia menggunakan teknik RAPD. Sedangkan hubungan antara distribusi geografis dengan jarak genetik tanaman sagu dilaporkan oleh Ehara (2003). Dalam bidang molekuler, Wee & Roslan (2012) mengkonstruksi pustaka cDNA dan analisis EST dari daun muda tanaman sagu. Hasil analisis sekuen DNA menunjukkan bahwa mayoritas transkript yang dihasilkan terlibat dalam metabolisme primer dan toleran stress.

Keragaman tanaman sagu yang tersebar di Indonesia dapat dikelompokkan berdasarkan beberapa karakter, yaitu tinggi rendahnya rendemen pati, kualitas (rasa) pati, ketebalan empulur, dan berduri atau tidak berduri. Sebagaimana pada tanaman tahunan lainnya, pemuliaan pada tanaman sagu untuk menghasilkan bibit unggul dengan beberapa karakter terpilih seperti tidak berduri, memiliki diameter batang besar dengan rendemen pati tinggi akan menghadapi berbagai kendala, salah satunya adalah lamanya masa seleksi. Aplikasi *Marker Assisted Selection* (MAS) dalam pemuliaan sagu dapat membantu mempercepat masa seleksi, sehingga usaha perakitan bibit unggul dapat dilakukan dengan lebih cepat. Pemilihan marka untuk

suatu karakter spesifik merupakan tahapan yang penting, dan dilakukan dengan berbagai pertimbangan seperti seberapa jauh pengetahuan biokimia dan biologi molekuler yang mendasarinya telah diketahui.

Pati (*starch*) disintesis dalam plastid (Martin & Smith, 1995) melalui serangkaian reaksi yang melibatkan tiga enzim utama yaitu: (1) ADP-glucose pyrophosphorylase (AGP); (2) starch synthase (SS); dan (3) starch branching enzyme (SBE). AGP berperan mengkatalisis reaksi pembentukan ADP-glucose dari Glucose-1P.SS mengkatalisis pembentukan pati dari ADP-Glucose melalui pembentukan ikatan (1-4) antara ujung nonreduksi (*nonreducing end*) dari satu rantai glucan dengan gugus glucosyl dari ADP-glucose dengan melepaskan satu molekul ADP. Sedangkan SBE menghasilkan ikatan α -(1,6)-dengan memutus ikatan α -(1,4)-internal dan mentransfer ujung tereduksi yang dilepaskan ke C6 hidroksil untuk menghasilkan struktur bercabang molekul amylopectin (Tetlow *et al.*, 2004). AGP dari tanaman merupakan enzim heterotetramer yang terdiri dari dua subunit besar (AGP-L) dan dua subunit kecil (AGP-S) (Martin & Smith, 1995).

Studi pada berbagai tanaman menunjukkan bahwa AGP merupakan enzim pengontrol aliran ('flux') ke dalam biosintesis pati (Loong, 2001) dan reaksi yang dikatalisisnya merupakan tahapan penentu pertama pada biosintesis pati (Tetlow *et al.*, 2004). Satu cDNA lengkap dan 3 cDNA parsial AGP telah diisolasi dari tanaman sagu (Loong, 2001). Di samping mempengaruhi jumlah pati yang dihasilkan, AGP juga mempengaruhi komposisi pati. Mutasi pada kacang polong yang mempengaruhi subunit besar dilaporkan menurunkan produksi total pati dan mengubah kualitas pati dengan meningkatnya proporsi amylopectin (Martin & Smith, 1995). Meskipun demikian, berdasarkan hasil-hasil penelitian lain, Martin & Smith (1995) mengemukakan bahwa komposisi pati tidak semata-mata dipengaruhi oleh aktivitas AGP, tetapi merupakan hasil akhir dari keseluruhan tahapan biosintesis pati. Over ekspresi AGP pada gandum, padi dan jagung dilaporkan meningkatkan produksi dan jumlah biji, yang membuktikan bahwa AGP menentukan akumulasi pati secara keseluruhan (Geigenberger, 2011).

Berdasarkan publikasi hasil penelitian pada berbagai tanaman diduga AGP merupakan enzim kunci yang menentukan kandungan pati pada tanaman sagu. Aktivitas AGP ditentukan oleh ekspresi gen penyandinya, sedangkan ekspresi suatu gen dikontrol melalui beberapa mekanisme, yang pada umumnya melibatkan sekuen DNA daerah 5' upstream (promoter) dari gen tersebut. Oleh karena itu sebagai langkah awal dari penelitian untuk mendapatkan marka rendemen pati pada tanaman sagu, penelitian ini bertujuan untuk mengamplifikasi

fragmen gen penyandi AGP dan mempelajari ekspresinya pada tanaman sagu rendemen pati tinggi dan rendemen pati rendah.

Bahan dan Metode

Pemilihan tanaman sagu sebagai bahan penelitian dan analisis kandungan pati

Tahap awal dari penelitian ini adalah menentukan tanaman yang akan digunakan, yaitu dua jenis tanaman sagu dengan rendemen yang berbeda, tinggi dan rendah. Sampel tanaman sagu diambil dari koleksi BPPT di Bogor. Tanaman sagu yang dipilih untuk analisis pati adalah tanaman yang sedang aktif mensintesis pati. Bahan tanaman yang telah diperoleh dikonfirmasi kembali kandungan patinya. Analisis kandungan pati pada batang tanaman dilakukan dengan metode Anthron yang dimodifikasi sebagaimana dilaporkan oleh Tjasadiahardja (1987).

Isolasi RNA total

Daun sagu yang digunakan sebagai sumber RNA adalah daun yang telah berkembang penuh dan diambil dari tanaman yang sedang aktif mensintesis pati. RNA total diisolasi dari jaringan daun dan empulur sagu menggunakan prosedur hasil modifikasi dari metode Chang *et al.* (1993), sebagaimana dilaporkan oleh Budiani *et al.* (2006). Integritas RNA hasil isolasi dianalisis dengan elektroforesis pada gel agarosa 1%. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 50 volt selama satu jam. Setelah selesai elektroforesis, visualisasi RNA dilakukan di bawah penerangan sinar UV. Kandungan dan kemurnian RNA dianalisis secara spektrofotometri pada panjang gelombang 260 nm, 280 nm dan 230 nm. Kuantitas RNA ditunjukkan berdasarkan serapannya pada λ 260 nm. Kemurnian RNA dari protein ditunjukkan oleh nilai ratio A_{260}/A_{280} , sedangkan kemurnian RNA dari senyawa lainnya seperti polisakarida ditunjukkan oleh nilai A_{260}/A_{230} .

Perancangan Primer

Dari studi bioinformatika diperoleh informasi sekuen DNA lengkap dari gen AGP subunit kecil dan sekuen DNA parsial dari gen AGP subunit besar. Berdasarkan sekuen tersebut dirancang primer untuk analisis ekspresi AGP subunit kecil dan AGP subunit besar, serta untuk amplifikasi cds lengkap penyandi AGP subunit kecil. Perancangan primer dilakukan dengan program Primer3 yang dapat diakses secara online (<http://www.biotoools.umassmed.edu/>).

Reverse-Transcriptase PCR untuk analisis ekspresi

Ekspresi gen AGP pada sagu rendemen pati tinggi dan rendemen pati rendah dianalisis secara

kualitatif dengan *Reverse Transcriptase PCR* (RT-PCR) menggunakan primer spesifik yang telah dirancang sebelumnya (Tabel 1, primer 5/6, 7/8, 9/10, 11/12, dan 13/14). Optimasi kondisi RT-PCR akan dilakukan untuk mendapatkan produk amplifikasi yang baik, yang meliputi suhu *annealing* dan jumlah siklus amplifikasi. Produk RT-PCR dianalisis untuk mengkonfirmasi bahwa fragmen tersebut adalah bagian dari gen penyandi AGP.

Amplifikasi dan kloning cds lengkap penyandi AGP subunit kecil

Amplifikasi cds lengkap AGP subunit kecil juga dilakukan dengan RT-PCR menggunakan primer spesifik. Produk RT-PCR untuk *cds* lengkap AGP subunit kecil dimurnikan dari gel, diligasikan pada plasmid pGEM-T easy, kemudian diinsersikan ke dalam *E. coli* kompeten. Sel *E. coli* transforman kemudian diseleksi pada media seleksi yang mengandung IPTG dan X-Gal. Koloni putih yang tumbuh pada media seleksi diklon diisolasi, kemudian dianalisis adanya sisipan fragmen DNA target. Koloni yang telah teruji mengandung sisipan DNA target, kemudian diisolasi plasmid rekombinannya untuk sekuensing DNA. Sekuen DNA yang dihasilkan kemudian dianalisis untuk mengetahui homologinya dengan gen yang sama yang telah terdeposit di *GenBank*.

Hasil dan Pembahasan

Sampel tanaman sagu

Berdasarkan analisis kandungan pati, baik sampel asal Bogor maupun asal Papua, telah ditetapkan dua jenis sampel untuk analisis ekspresi, yaitu yang memiliki rendemen pati tinggi dan tanaman lainnya dengan rendemen pati lebih rendah. Kedua jenis tanaman tersebut untuk selanjutnya digunakan dalam preparasi RNA untuk analisis ekspresi, sedangkan untuk kloning gen AGP hanya dipilih salah satu sampel yang memiliki rendemen pati tinggi. Data hasil analisis kandungan pati tidak ditampilkan.

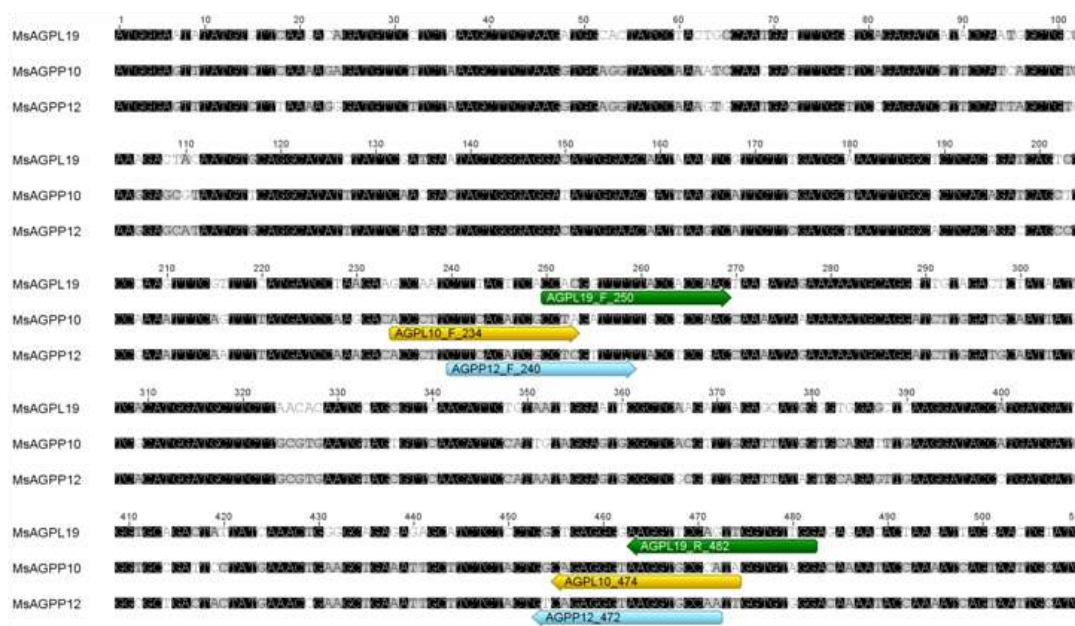
Primer spesifik dan analisis ekspresi AGP

Lima pasang primer untuk analisis ekspresi AGP dan dua pasang primer untuk amplifikasi cds lengkap penyandi AGP subunit kecil, beserta susunan nukleotidanya disajikan pada Tabel 1. Pasangan primer 1/2 dan 3/4 untuk amplifikasi cds lengkap penyandi AGP subunit kecil, pasangan 5/6 dan 7/8 untuk analisis ekspresi AGP subunit kecil, sedangkan tiga pasang primer lainnya untuk analisis ekspresi AGP subunit besar. Posisi primer terhadap sekuen gennya disajikan pada Gambar 1 dan Gambar 2.

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk amplifikasi cds lengkap dan analisis ekspresi AGP.

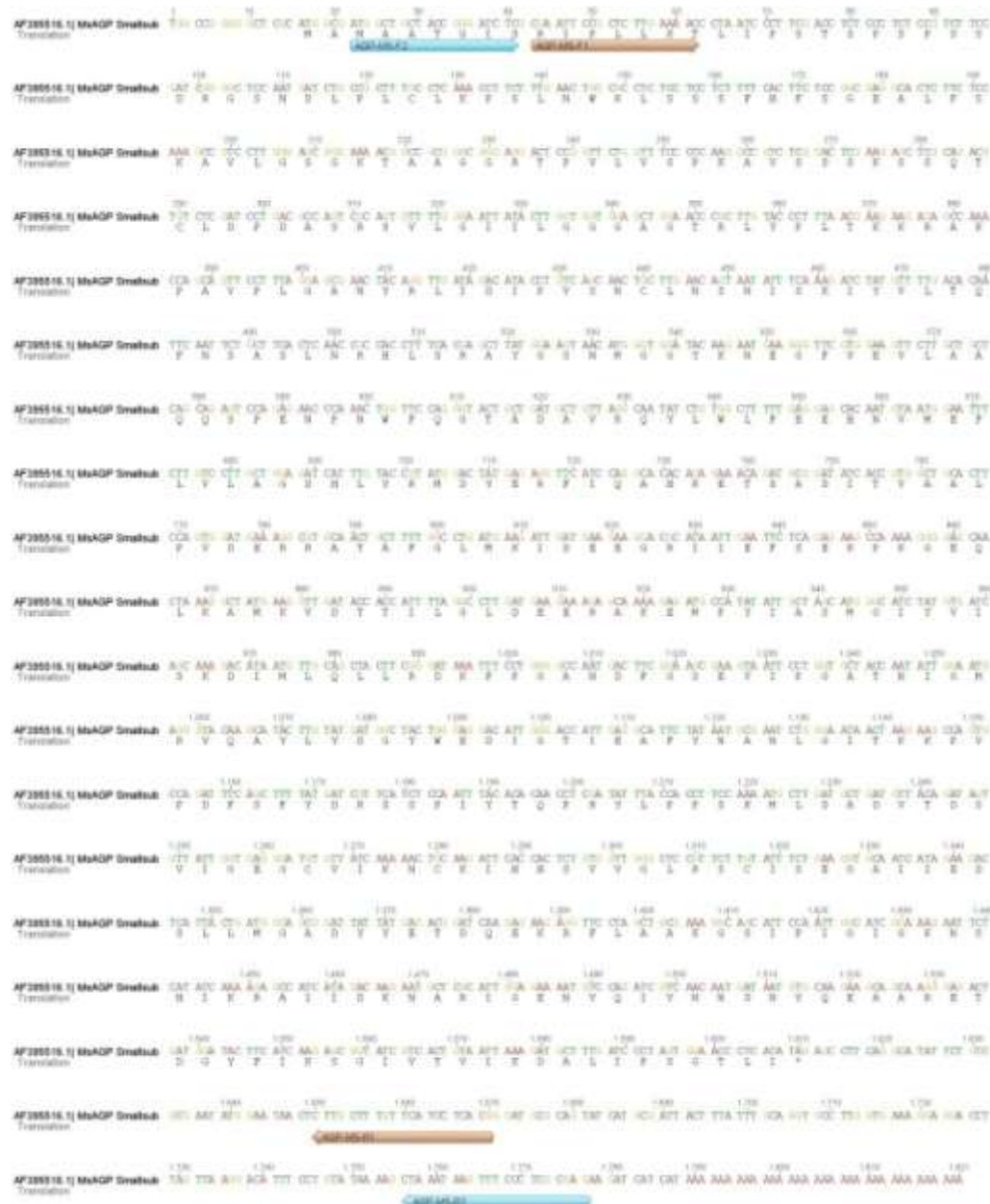
Table 1. Primers used for amplification of full cds and expression analysis of AGP.

No. No.	Primer Primers	Sekuen DNA DNA sequence	Ukuran produk Product size
1	AGP-MS-F1	5'- CGAATTCCGCTCTTGAAAAC -3'	1628 pb
2	AGP-MS-R1	5'- CGTGAGGATGAACAA AGCAAG -3'	
3	AGP-MS-F2	5'- ATGGCTGCTACCGGGATCTC -3'	
4	AGP-MS-R2	5'- CTCGCGAGGGAACTTATTTAG -3'	1753 pb
5	AGPS1 (F1)	5'- CAAGGAGCGTAATGTTTCAGGC -3'	
6	AGPS1 (R1)	5'- TCATAGGAATCGGCACCCATC -3'	
7	AGPS2 (F2)	5'- AGATCCTTCCATCAGCTGTCA -3'	336 pb
8	AGPS2 (R2)	5'- AATCGGCACCCATCATCATG -3'	
9	AGPL10_F_234	5'-ACCCTTCTTCACATCGCCTA-3'	
10	AGPL10_R_474	5'-TATGGGCACCTTACCCTCTG-3'	240 bp
11	AGPL19_F_250	5'CCACGGTTTTTACCACCAAC-3'	
12	AGPL19_R_482	5'-CCAACACCAACTGGAACCTT-3'	
13	AGPL12_F_240	5'-CTTCACATCGCCTCGTTTTT-3'	232 bp
14	AGPL12_R_472	5'-TTGGCACCTTACCCTCTGAC-3'	



Gambar 1. Sekuen DNA tiga cds parsial penyandi AGP subunit besar (AGPP10, AGPP19, dan AGPP12) dari tanaman sago yang telah terdeposit pada GenBank dan posisi primer.

Figure 1. DNA sequences of three parsial cds AGP large subunit (AGPP10, AGPP19 and AGPP12) from sago palm that have been deposited in GenBank and position of the primers.



Gambar 2. Sekuen DNA cds lengkap penyandi AGP subunit kecil dari tanaman sago yang telah terdeposit pada GenBank dan posisi primer untuk amplifikasi cds lengkap.

Figure 2. DNA sequence of complete cds AGP small subunit of sago palm deposited in GenBank and position or primer for amplification of the complete cds.

Hasil elektroforesis pada gel agarosa menunjukkan bahwa RNA yang diperoleh memiliki integritas yang tinggi. Analisis spektrofotometer juga menunjukkan kemurnian RNA yang tinggi, baik terhadap kontaminan protein (A260/A280) maupun terhadap kontaminan polisakarida (A260/A230) (data tidak disajikan), sehingga cukup memadai untuk digunakan dalam penelitian selanjutnya, yaitu analisis ekspresi maupun untuk isolasi gen. Dari lima pasang primer yang dirancang untuk analisis ekspresi

(Tabel 1), hanya dua primer yaitu AGPS2 dan AGPL-19 yang menghasilkan produk amplifikasi. Elektroforesis hasil RT-PCR dengan kedua primer tersebut disajikan pada Gambar 2. Dari gambar tersebut, dapat dilihat bahwa primer AGPS2 yang mengamplifikasi fragmen DNA AGP subunit kecil menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran yang lebih kurang sama dengan ukuran fragmen DNA target, yaitu 336 pb. Primer AGPL-19 yang mengamplifikasi fragmen AGP subunit besar menghasil-

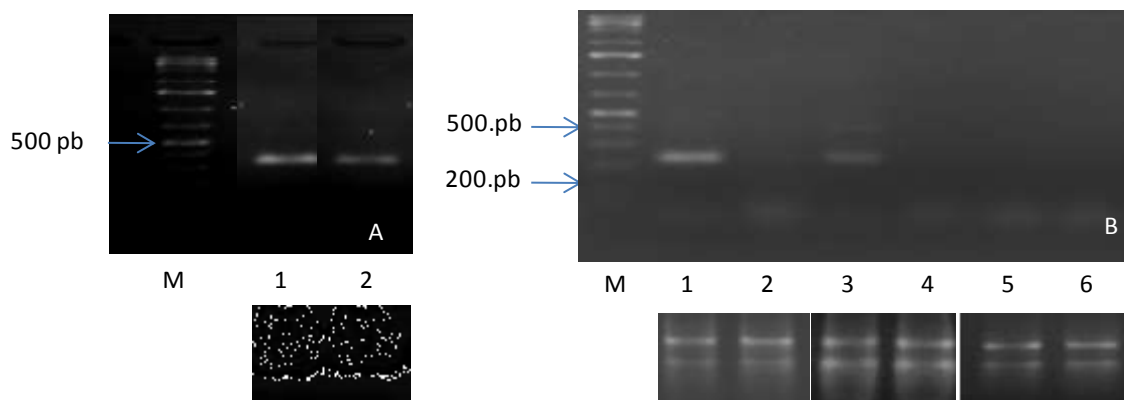
kan produk dengan ukuran antara 200 – 300 pb sejalan dengan ukuran fragmen DNA target. Nampak bahwa produk amplifikasi dari kedua primer tersebut lebih intensif pada tanaman sagu rendemen pati tinggi dibandingkan dengan sagu rendemen pati rendah. Hal ini menunjukkan bahwa tanaman sagu yang memiliki kandungan pati tinggi mengekspresikan gen tersebut pada lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman sagu dengan kandungan pati rendah. Dari gambar tersebut juga terlihat bahwa ekspresi AGP subunit besar pada daun tua, lebih tinggi dibandingkan dengan pada daun muda. Sedangkan pada empulur, tidak dideteksi ekspresi gen terbut. Dari Gambar 2 juga dapat dilihat bahwa primer AGP-MS-F1 terletak pada basa ke-22 dari ATG (Open Reading) dan pasangannya primer AGP-MS-R1 pada basa ke-1670 pada daerah 3'-UTR, sedangkan primer AGP-MS-F2 terletak pada basa ke-01 dari ATG dan pasangannya primer AGP-MS-R2 pada basa ke-1756 pada daerah 3'-UTR. Sekuen DNA produk sekuensing dua arah dari fragmen DNA hasil amplifikasi dengan primer AGPL19 kemudian dianalisis dengan BlastN. Hasilnya menunjukkan bahwa fragmen tersebut adalah benar bagian dari gen penyandi AGP (Gambar 4). Dengan cara yang sama, fragmen hasil amplifikasi dari sagu rendemen pati rendah juga disekuen dan dianalisis dengan BastN. Hasilnya mengkonfirmasi bahwa fragmen produk RT-PCR tersebut juga merupakan bagian dari gen AGP. Terdapat sedikit perbedaan pada sekuen DNA

antara sagu rendemen pati tinggi dengan sagu rendemen pati (data sekuen tidak ditampilkan).

Perbedaan tingkat ekspresi AGP (satu subunit kecil dan satu subunit besar) antara tanaman sagu rendemen pati tinggi dan rendemen pati rendah yang ditunjukkan pada hasil penelitian ini, dapat dijadikan dasar untuk mengkaji lebih lanjut sekuen DNA gen terkait maupun sekuen daerah regulatori, seperti promoter, apakah perbedaan ekspresi tersebut terkait dengan perbedaan sekuen DNA pada daerah promoter atau bahkan pada daerah penyendinya.

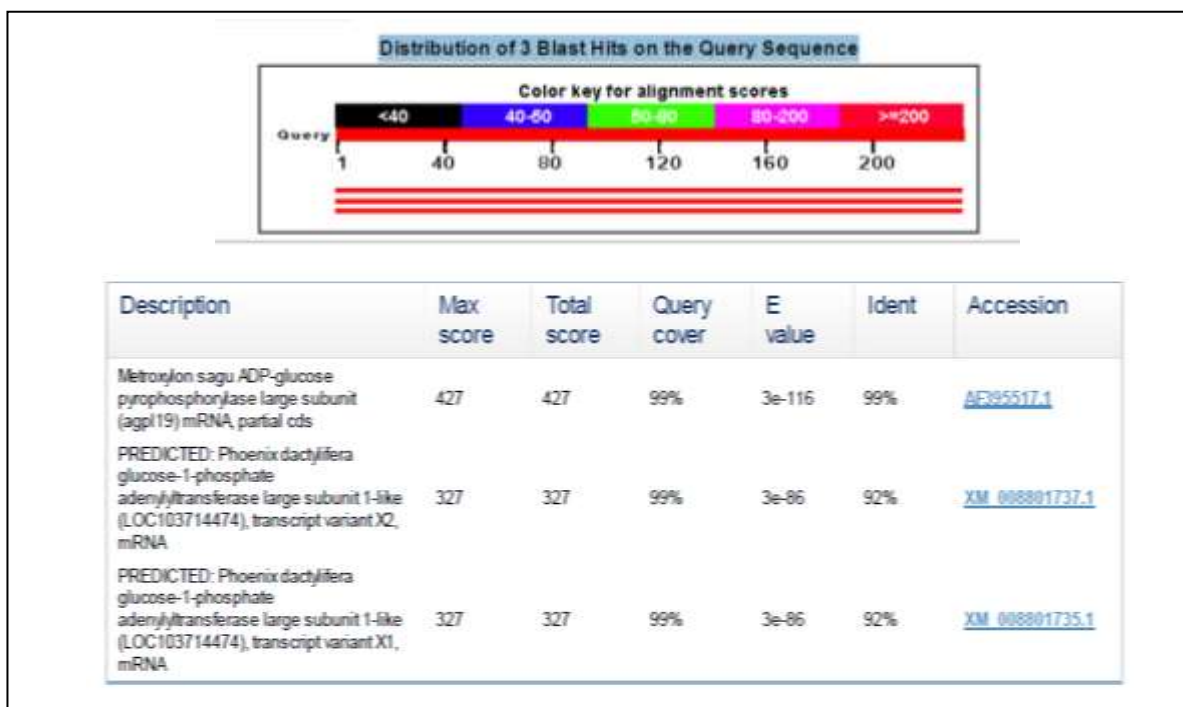
Amplifikasi dan kloning cds lengkap AGP subunit kecil

Gambar 5A menyajikan hasil amplifikasi *cds* lengkap AGP subunit kecil dengan primer AGP-MS-F2/R2. RT-PCR dengan pasangan primer AGP-MS-F1/R1 tidak menghasilkan fragmen DNA. Dari gambar tersebut dapat dilihat bahwa ukuran produk amplifikasi lebih kurang sama dengan prediksi ukuran fragmen DNA target (± 1700 pb). Fragmen produk RT-PCR tersebut diklon, dan koloni yang tumbuh pada media seleksi dianalisis untuk mengetahui adanya fragmen DNA terklon dengan PCR koloni menggunakan primer yang sama dengan primer untuk RT-PCR yaitu AGP-MS-F2/R2. Hasil PCR koloni menunjukkan bahwa fragmen DNA target produk RT-PCR telah terklon (Gambar 5B).



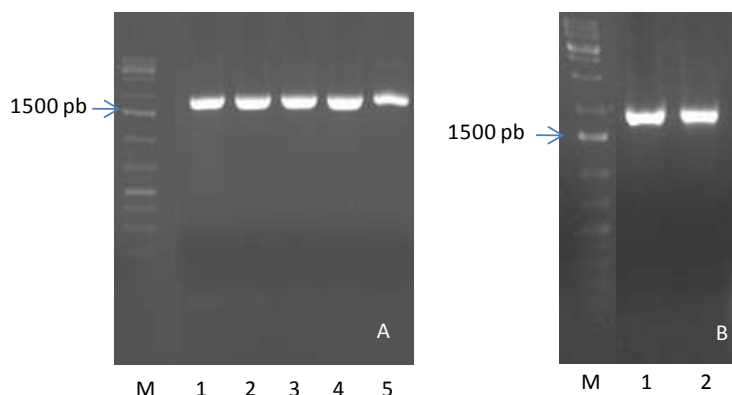
Gambar 3. Profil elektroforesis hasil RT-PCR.(A) menggunakan primer AGPS2_F/R. lajur 1: daun tanaman sagu pati tinggi; 2: daun, tanaman sagu pati rendah); (B) menggunakan primer AGPL19_F/R. Lajur 1 : daun tua tanaman sagu pati tinggi; 2 : daun tua tanaman sagu pati rendah;3: daun muda tanaman sagu pati tinggi; 4: daun muda tanaman sagu pati rendah; 5: empulur tanaman sagu pati tinggi, 6: empulur tanaman sagu pati rendah. M: marker 1 kb plus DNA ladder. Bagian bawah adalah profil RNA dari setiap sampel.

Figure 3. Electrophoretic profile of RT-PCR product. (A) using primer AGPS2_F/R. Lane 1: mature leaf, high starch content; 2: mature leaf, low starch content; 3: young leaf, high starch content; 4: young leaf, low starch content; 5: pith, high starch content; 6: pith, low starch content. M: 1 kb plus DNA ladder marker. Underneath: RNA profile of each sampel.



Gambar 4. Hasil analisis Blast sekuen DNA dari produk RT-PCR sampel daun tanaman sagu rendemen pati tinggi.

Figure 4. Result of Blast analysis of DNA sequence of the RT-PCR product from leaf, high starch sago plant.

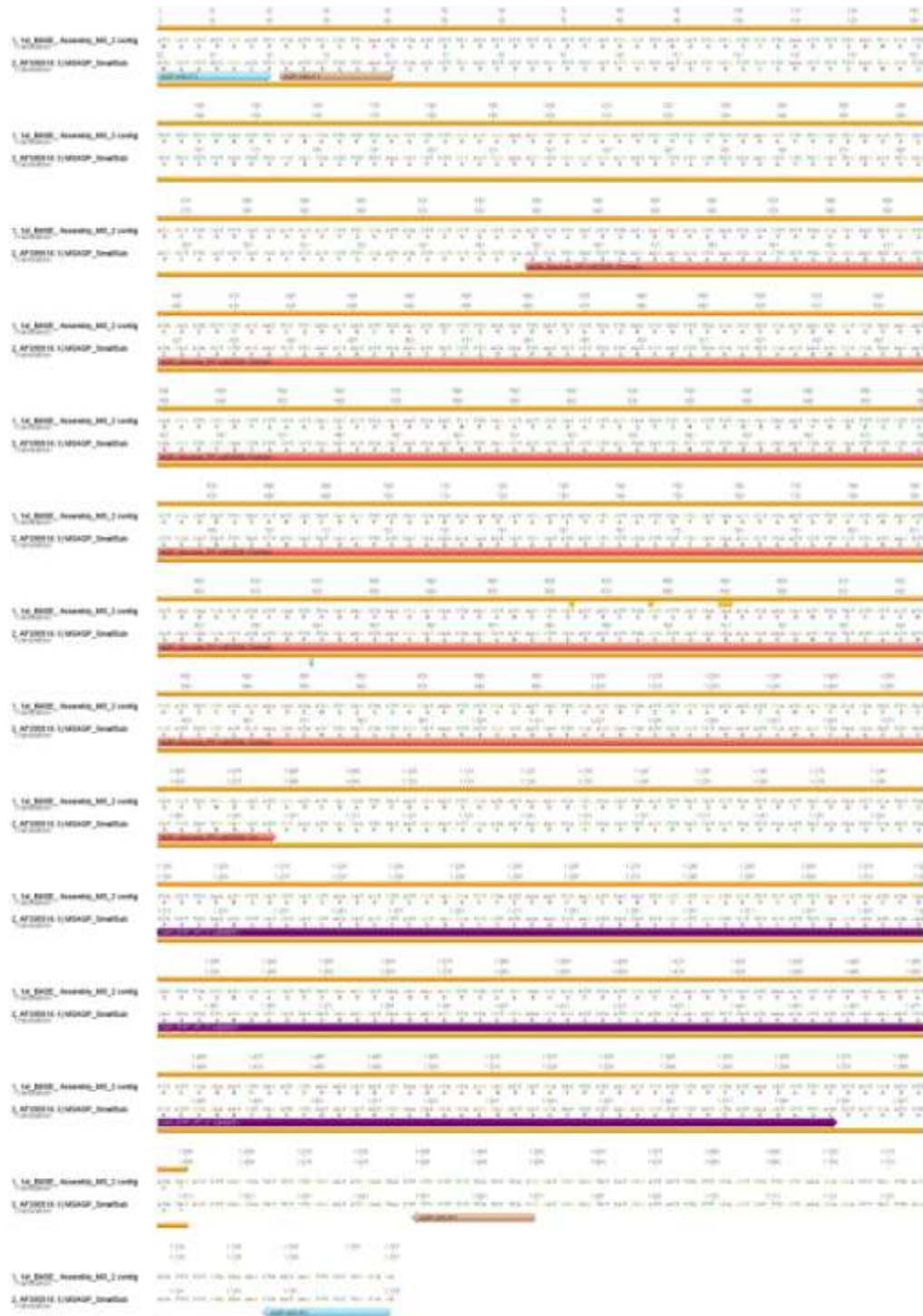


Gambar 5. (A) Profil elektroforesis hasil RT-PCR menggunakan pasangan primer AGP-MS-F2/R2, pada berbagai suhu annealing (lajur 1: 50°C; 2: 55°C; 3: 60°C; 4: 62°C; 5: 65°C), (B) hasil PCR koloni *E. coli* hasil transformasi dengan produk RT-PCR.

Figure 5. (A) Electrophoretic profile of RT-PCR product using primer pair AGP-MS-F2/R2, at different annealing temperature (lane 1: 50°C; 2: 55°C; 3: 60°C; 4: 62°C; 5: 65°C). (B) Result of colony PCR of transformed *E. coli* using RT-PCR product.

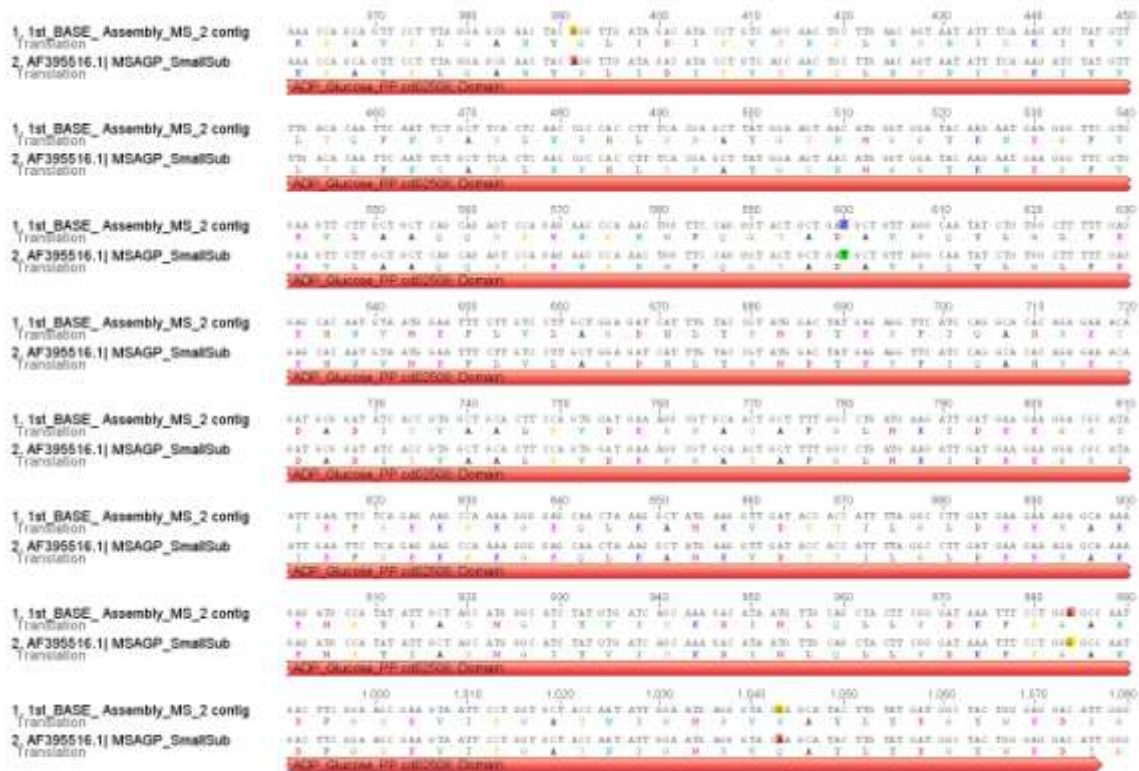
Sekuensing dan analisis DNA menggunakan plasmid rekombinan yang diisolasi dari koloni yang telah teruji positif menunjukkan bahwa fragmen DNA terklon berukuran dengan ukuran 1756 pb, sedangkan daerah coding sequence (ORF) berukuran panjang 1590 pb. Untuk mengetahui lebih jauh ada tidaknya perbedaan sekuen DNA dan asam amino terutama

pada domain aktif dari AGP, dilakukan analisis *conserved domain database* (CDD) pada situs NCBI. Hasil analisis menunjukkan bahwa Gen AGP terklon pada penelitian ini memiliki dua domain aktif yaitu domain ADP-G (No domain di NCBI cd02508) dan LbH-G1P (No domain di NCBI cd04651). Terdapat perbedaan basa tunggal (SNP, Single Nucleotide



Gambar 6. Penjajaran sekuen DNA cds AGP subunit kecil yang diperoleh pada penelitian ini dengan sekuen DNA dari *Genebank* serta posisi primer AGP-MS-F1/R1 dan AGP-MS-F2/R2.

Figure 6. DNA sequence alignment of the cloned cds AGP small subunit with the same gene deposited on GenBank, and position of primers AGP-MS-F1/R1 dan AGP-MS-F2/R2.



Gambar 7. Penjajaran domain aktif sekuen DNA penyandi AGP subunit kecil dari tanaman sagu yang diperoleh pada penelitian ini dan dari gen yang sama yang di Genebank.

Figure 7. Alignment of active domain of the DNA sequence encoding AGP small subunit produced from this research with that of the same gene deposited on the GenBank.

Polymorphism) pada daerah domain aktif MsAGP yang menentukan aktivitas MsAGP pada tanaman sagu, yaitu pada basa ke-391 G/A yang menghasilkan asam amino berbeda, G/R; pada basa ke-600 C/T yang tidak merubah asam amino (D); pada basa ke-984 A dan G yang juga tidak merubah asam amino (G); dan pada basa ke 1043 G/A yang menghasilkan dua asam amino berbeda R/Q. Secara total terdapat tujuh perbedaan basa tunggal sepanjang daerah CDS (termasuk di dalam domain aktif), yaitu pada basa ke-174 (G/A) menghasilkan perubahan pada asam amino (R/K), pada basa ke-1248 (A/T) yang tidak merubah asam amino (V), pada basa ke-1384 (G/A) menghasilkan perubahan asam amino (E/K). Hasil analisis Blastn dari NCBI terhadap sekuen Query menunjukkan 99% kesamaan sekuen nukleotida dengan MsAGP No akses AF395516.1. Dari alignment terdeteksi beberapa SNPs yang kemungkinan menunjukkan polymorphism dari query dan MsAGP NCBI. Adanya polymorphism pada daerah aktif domain AGP, kemungkinan akan berpengaruh terhadap aktivitas enzim tersebut. Perbedaan isoform antara sekuen yang diperoleh pada penelitian ini dengan sekuen yang telah terdeposit pada *GenBank* kemungkinan disebabkan oleh perbedaan jenis/tipe tanaman sagu yang digunakan sebagai sumber gen.

Studi mengenai gen AGP pada berbagai tanaman telah dilaporkan. Akihiro *et al.* (2005) melaporkan hasil penelitiannya mengenai ekspresi AGP dan kandungan pati pada kultur sel padi. Pada tanaman sagu, studi AGP dilaporkan oleh Greenhill. Hasil penelitian ini sejalan dengan yang dilaporkan oleh Greenhill (2006), namun adanya perbedaan pada sekuen DNA menunjukkan bahwa gen yang diklon kemungkinan menyandi AGP dengan aktivitas yang berbeda dengan yang telah dilaporkan oleh Greenhill (2006).

Kesimpulan

Tanaman sagu rendemen pati tinggi mengekspresikan dua gen AGP, yaitu satu gen penyandi subunit kecil dan satu gen penyandi subunit besar, lebih tinggi dibandingkan dengan pada tanaman sagu rendemen pati rendah. Ekspresi gen tersebut pada daun tua (*full developing leaf*) lebih tinggi dibandingkan dengan pada daun muda, dan pada empulur tidak dideteksi ekspresi gen tersebut. Daerah penyandi lengkap (*full cds*) AGP subunit kecil telah diklon dan sekuennya telah dikonfirmasi memiliki 99% kesamaan dengan gen yang sama yang telah dideposit pada *GenBank*, tetapi terdapat perbedaan beberapa basa termasuk pada daerah domain aktif yang dapat mempengaruhi aktivitas AGP.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kementerian Riset dan Teknologi, yang telah mendanai penelitian ini melalui proyek penelitian kerjasama SINAS tahun 2014.

Daftar Pustaka

- Abbas B, Blintoro M. H, Sudarsono, Surahman M & Ehara H (2009). Genetic relationship of sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) in Indonesia based on RAPD markers. *Biodiversitas* 10(4), 168 – 174.
- Akihiro T, K Mizuno & T Fujimura (2005). Gene Expression of ADP-glucose pyrophosphorylase and starch contents in rice cultured cells are cooperatively regulated by sucrose and ABA. *Plant Cell Physiol* 46(6), 937–946.
- Awg-AdeniDS, S Abd-Aziz, K Bujang & MA Hassan (2010). Bioconversion of sago residue into value added products. *African J of Biotechnol*, 9(14), 2016-2021.
- Budiani A, D Santoso, H Aswidinnoor, A Suwanto (2006). Aktivitas ACCase mesokarp kelapa sawit dan kloning fragmen gen penyandi ACCase subunit biotin karboksilase. *Menara Perkebunan*. 74(1), 33-43.
- Chang S, J Puryear & J Cairney (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep* 11, 98 – 100.
- Ehara H, S Kosaka, N Shimura, D Matoyama, O Morita, H Naito, C Mizota, S Susanto, MH Bintoro & Y Yamamoto (2003). Relationship between geographical distribution and genetic distance of sago palm in Malay Archipelago. *Sago Palm* 11, 8-13.
- Flach M (1997). *Sago Palm Metroxylon sagu Rottb. Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops*. 13. Rome-Italy, International Plant Genetic Resources Institute. 76p.
- Geigenberger P (2011). Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. *Plant Physiol* (155), 1566–1577.
- Greenhill (2006). Food safety and security of sago starch in rural Papua New Guinea. PhD. Thesis, James Cook University, Townville.
- Loong AS (2001). Isolation and characterisation of cDNA clones encoding ADP-Glucose Pyrophosphorylase (AGP) from sago palm (*Metroxylon sagu*). Thesis. Master Faculty of Food Science and Biotechnology, Universiti Putra Malaysia.
- Martin C & AM Smith (1995). Starch Biosynthesis. *The Plant Cell* (7), 971-985.
- Novariant H (2013). Sumber daya genetik sago mendukung pengembangan sago di Indonesia dalam penguatan inovasi teknologi mendukung kemandirian usahatani perkebunan rakyat (Karmawati E., Siswanto, RS Hartani, IM Trisawa), hal 1 – 14.
- Ngampongsai W & P Chanjula (2009). Effect of different levels of sago palm pith on nutrient utilization in Thai native cattle fed with plicatulum hay (*Paspalum plicatulum* Michx.) and soybean meal. *Songklanakarin J Sci Technol* 31 (2), 117-124.
- Riyadi I, JS Tahardi & Sumaryono (2005). The development of somatic embryos of sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) on solid media. *Menara Perkebunan* 2005, 73(2), 35-43.
- Sumaryono, I Riyadi & PD Kasi (2009). Clonal propagation of sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) through tissue culture. *J Appl Indust Biotech in Trop Region* 2(1), 1-4.
- Tenda E, H Mangindaan & J Kumaunang (2003). Eksplorasi jenis-jenis sago potensial di Sulawesi Tenggara. Dalam: Prosiding Seminar Sagu untuk Ketahanan Pangan, Manado 6 Oktober 2003. Balai Penelitian Tanaman Kelapa dan Palma lain.
- Tetlow II, MK Morell & MJ Emes (2004). Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J Exp Bot* 55, (406), 2131–2145.
- Tjasadhardja A (1987). Hubungan antara pertumbuhan pucuk, perkecambahan buah serta tingkat kandungan asam indol asetat di dalam biji dan layu pentil kakao (*Theobroma cacao* L.). Disertasi. Bogor, Fakultas Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Indonesia. 45p.
- Wee CC & HA Roslan (2012). Expressed sequence tags (ESTs) from young leaves of *Metroxylon sagu*. *Biotech* 2, 211–218.