

Kloning parsial gen penyandi P5CS dari tebu (*Saccharum officinarum* L.)

Cloning of P5CS-encoding gene fragment from sugarcane (Saccharum officinarum L.)

Hayati MINARSIH^{1*)}, SUPRIYADI²⁾, Soekarno Mismana PUTRA¹⁾ & Asmini BUDIANI¹⁾

¹⁾ Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Jl. Taman Kencana No. 1, Bogor 16151 Indonesia

²⁾ Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia

Diterima tgl 19 Maret 2012/Disetujui tgl 28 Mei 2012

Abstract

Abiotic stress such as drought stress is one of the important factors that affect plant growth. Plants have an adaptation mechanism to overcome the stress condition by accumulating osmoprotectant compounds. Proline is a well known compatible solute and can be accumulated to a high concentration in plant cells under drought or osmotic stress. One of the important enzymes in proline biosynthesis is Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) encoded by P5CS gene. This research is aimed to clone partial length of P5CS gene from *S. officinarum*, variety PSJT 941. The amplification of P5CS gene fragment was done by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), using specific primers. DNA fragment of 984 bp, 975 bp and 1725 bp were cloned into *Escherichia coli* XL1-Blue using pGEM-T Easy plasmid vector. Results from BLAST analysis showed that the P5CS sequences have high homology (99%) with the P5CS gene of *S. officinarum* in the GenBank database.

[Key words: Pyrroline-5-carboxylate synthetase, proline, P5CS gene, sugarcane]

Abstrak

Cekaman abiotik seperti kekeringan merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan tanaman. Tanaman mempunyai strategi adaptasi dalam mengatasi cekaman tersebut dengan mengakumulasi senyawa osmoprotektan yang terakumulasi dalam konsentrasi tinggi. Prolin merupakan salah satu senyawa osmoprotektan yang dapat melindungi tanaman dari cekaman kekeringan maupun osmotik. Salah satu enzim yang berperan penting dalam biosintesis prolin adalah Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) yang disandi oleh gen P5CS. Penelitian ini bertujuan untuk mengklon fragmen gen P5CS dari *S. officinarum* varietas PSJT 941. Amplifikasi fragmen gen P5CS dilakukan dengan teknik Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) menggunakan primer spesifik gen P5CS. Fragmen DNA hasil RT-PCR berukuran 984 bp, 975 bp, dan 1725 bp diklon ke dalam *Escherichia coli* XL 1-Blue menggunakan vektor plasmid pGEM-T Easy. Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa sekuen fragmen gen produk RT-PCR yang berasal dari *S. officinarum* PSJT 941 memiliki homologi yang sangat tinggi (99%) dengan gen P5CS pada *S. officinarum* yang ada dalam pusat data Genbank.

[Kata kunci: Pyrroline-5-carboxylate synthetase, prolin, gen P5CS, tebu]

Pendahuluan

Cekaman kekeringan merupakan salah satu faktor pembatas pertumbuhan tanaman, antara lain melalui penghambatan aktivitas fotosintesis dan translokasi hasil fotosintesis (Mahajan & Tuteja, 2005). Pengaruh cekaman kekeringan tidak hanya terjadi pada fase vegetatif tetapi juga pada fase generatif (Toruan-Mathius *et al.*, 2004). Pada tebu, cekaman kekeringan dilaporkan dapat secara langsung mempengaruhi jumlah anakan dan berat batang yang berakibat pada menurunnya produksi sukrosa (Sugiharto, 2004). Penelitian lain menunjukkan pula bahwa kondisi kekeringan mempengaruhi proses biokimia dan fisiologi seperti fotosintesis, ukuran sel daun, transpirasi, potensial air, laju pertumbuhan dan penutupan stomata pada daun (Reddy *et al.*, 2004). Pada tanaman lain misalnya kelapa sawit, cekaman kekeringan dapat mengakibatkan perubahan pada sex ratio, gugurnya bunga dan buah muda, serta tandan buah gagal masak yang berakibat pada turunnya produksi tandan buah segar hingga 40 % dan CPO hingga 65% (Toruan-Mathius *et al.*, 2004).

Tanaman memiliki banyak strategi adaptasi dalam merespon cekaman lingkungan abiotik seperti cekaman kekeringan dan tekanan osmotik yang berlebihan. Mekanisme adaptasi tersebut dapat berupa perubahan fisiologis dan proses biokimia, melalui penyesuaian metabolik yang mendorong terjadinya akumulasi beberapa senyawa organik seperti gula, polyol, betain, dan prolin (Minarsih *et al.*, 2001; Mohammadkhani & Heidari, 2008). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa tanaman yang tercekam kekeringan mengakumulasi prolin lebih tinggi dibandingkan tanaman kontrolnya (Kishor *et al.*, 2005; Hien *et al.*, 2003). Tinggi rendahnya akumulasi prolin di bawah kondisi cekaman kekeringan berbeda antar spesies tanaman (Verbruggen & Hermans, 2008). Pada tanaman kelapa sawit misalnya, peningkatan konsentrasi prolin dapat mencapai 600% tergantung berat atau lamanya cekaman kekeringan yang terjadi dan genotipe tanaman atau tingkat toleransi tanaman (Toruan-Mathius *et al.*, 2004). Sedangkan kandungan prolin pada batang tebu yang diberi perlakuan cekaman

*) Penulis korespondensi: hmiskan@yahoo.com

kekeringan (tanpa penyiraman) selama 15 hari meningkat hingga hampir 20 kali lipat (Iskandar et al., 2011).

Jalur utama sintesis prolin dipercaya dimulai dari glutamat, yang dikonversi menjadi *glutamic semi-aldehyde* (GSA) oleh enzim *pyrroline-5-carboxylate synthetase* (P5CS). GSA kemudian berubah secara spontan menjadi *pyrroline-5-carboxylate* (P5C) dan P5C kemudian direduksi menjadi prolin oleh enzim *P5C reductase* (P5CR) (Kishor et al., 2005). Gen penyandi P5CS telah diisolasi dan diteliti lebih lanjut dari beberapa komoditas pertanian, di antaranya *Phaseolus vulgaris* (Chen et al., 2009; Chen et al., 2010), *Sorghum bicolor* (Su et al., 2011), *Oryza sativa* (Hur et al., 2004; Su & Wu, 2004), dan *Triticum aestivum* (Sawabel & Hasan., 2002).

Tanaman transgenik yang mengoverekspresikan gen *P5CS* mengakumulasi prolin lebih tinggi dan terbukti lebih toleran terhadap cekaman kekeringan dibanding tanaman kontrolnya (Yusniwati, 2008). Introduksi gen *P5CS* asal *Vigna aconitifolia* ke tanaman tembakau terbukti meningkatkan aktivitas enzim P5CS dan produksi prolin 10 sampai 18 kali lebih tinggi dibanding tanaman kontrolnya (Kishor et al., 2005). Aktivitas enzim P5CS pada tanaman padi transgenik yang ditransformasi dengan gen *P5CS* meningkat 5,3 hingga 9,8 kali, sedangkan kandungan prolinnya meningkat 167% sampai 252%. Di samping peningkatan akumulasi prolin, tanaman transgenik yang dihasilkan juga menunjukkan pertumbuhan yang lebih baik pada kondisi cekaman salinitas dan cekaman air jika dibandingkan dengan tanaman kontrol yang tidak ditransformasi dengan gen tersebut (Hur et al., 2004). Hasil penelitian Molinari et al (2007) menunjukkan bahwa pada tanaman tebu, akumulasi prolin berkorelasi positif dengan meningkatnya level ekspresi gen *P5CS*. Penelitian rekayasa genetika tebu untuk toleransi kekeringan menggunakan gen *P5CS* menunjukkan bahwa pada cekaman salinitas dan kekeringan, ekspresi gen *P5CS* yang meningkat menyebabkan akumulasi prolin pada tanaman tersebut juga meningkat (Molinari et al., 2007). Selain aktivitas *P5CS* dan kandungan prolin yang meningkat, pada kondisi cekaman kekeringan biomassa tanaman transgenik hasil transformasi menggunakan gen penyandi *P5CS* juga dilaporkan meningkat, melalui peningkatan panjang akar, berat tajuk dan berat akar (Kishor et al., 2005; Molinari et al., 2007). Sebagai langkah awal dari upaya rekayasa genetika tebu toleran kekeringan, penelitian ini bertujuan untuk mengklon fragmen gen *P5CS* dari tanaman tebu.

Bahan dan Metode

Bahan tanaman yang digunakan untuk isolasi gen *P5CS* adalah daun tebu varietas PSJT 941 yang merupakan salah satu varietas bina yang direkomendasikan oleh P3GI, Pasuruan, yang relatif toleran terhadap cekaman kekeringan.

Perancangan primer

Dua pasang primer dirancang menggunakan Program Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Sebagai input sekuen digunakan sekuen DNA gen penyandi *P5CS* (EU005373.2) yang terdeposit pada *GenBank*.

Isolasi RNA total dari daun tebu

RNA total diisolasi dari daun tebu menurut metode Chang et al (1993) dengan penambahan CTAB pada bufer ekstraksi. Helai daun dipotong kecil-kecil kemudian dibekukan dengan nitrogen cair dan digerus menggunakan mortar dan pestel. Hasil gerusan yang sudah berbentuk bubuk kemudian diekstraksi dengan bufer ekstraksi (1 : 5) yang mengandung CTAB pada suhu 65°C dan kemudian divortex. Campuran selanjutnya diekstraksi dua kali dengan kloroform : isoamilalkohol (24 : 1) dengan volume berimbang dan disentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 20 menit. Pelet atau endapan yang dihasilkan dilarutkan dalam bufer SSTE (1,0 M NaCl, 0,5% SDS, 10 mM Tris-HCl pH 8,0 dan 1 mM EDTA), dan selanjutnya diekstraksi kembali dengan kloroform : isoamilalkohol. Ke dalam supernatan yang diperoleh ditambahkan dua kali volume ethanol 100% dan diinkubasi pada suhu -70°C selama 30 menit, dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 20 menit untuk mengendapkan RNA. Supernatan dipisahkan dan endapan yang diperoleh dicuci dengan ethanol 70% dingin, kemudian dilarutkan dalam 0,5 – 1,0 mL H₂O steril. Kualitas dan kuantitas RNA ditetapkan dengan elektroforesis pada gel agarose dan dengan mengukur absorbansinya pada panjang gelombang (λ) 260, 280 dan 230 nm. Absorbansi pada λ_{260} menunjukkan kuantitas RNA sedangkan nisbah $A_{260}/_{280}$ menunjukkan kemurnian RNA terhadap kontaminan protein, dan nisbah $A_{260}/_{230}$ menunjukkan kemurnian RNA terhadap polisakarida.

Amplifikasi fragmen DNA gen *P5CS*

Amplifikasi fragmen DNA gen *P5CS* parsial dilakukan menggunakan RT-PCR (*Reverse Trans-cryptase Polymerase Chain Reaction*). dengan templat RNA. Utas pertama cDNA disintesis menggunakan kit *Superscript First Strand cDNA Synthesis* (Invitrogen) dengan templat RNA total hasil isolasi dari daun tebu. cDNA utas tunggal yang diperoleh selanjutnya digunakan sebagai templat untuk amplifikasi fragmen gen *P5CS* pada mesin PCR menggunakan primer spesifik yang telah dirancang sebelumnya. Optimasi kondisi PCR dilakukan untuk menghasilkan fragmen DNA target, yang meliputi suhu *annealing*, jumlah siklus dan konsentrasi ion Mg²⁺. Produk PCR dicek pada gel agarosa, kemudian dimurnikan dari gel menggunakan kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen).

Kloning and analisis DNA produk PCR terklon

DNA hasil RT-PCR diekstraksi dan dimurnikan dari gel agarose menggunakan kit *PureLink™ Quick Gel Extraction* (Invitrogen), kemudian diligasikan ke vektor kloning pGEM-T Easy (Promega). Pemurnian DNA dan ligasinya dilakukan sesuai prosedur yang dikemukakan dalam buku manual yang tersedia dalam kit. Konstruk vektor rekombinan selanjutnya diintroduksi ke dalam sel *E. coli* XL1-Blue kompeten. Preparasi *E. coli* kompeten dilakukan dengan metode CaCl₂, sedangkan transformasinya menggunakan vektor rekombinan pembawa fragmen produk RT-PCR dilakukan dengan metode *heat shock* (Sambrook *et al.*, 2001). *E. coli* transforman diseleksi pada media LB yang mengandung 100 mg/L ampisilin, 0,1 mM IPTG dan 40 mg/L X-Gal. Beberapa koloni putih yang tumbuh pada media seleksi kemudian dianalisis untuk mengkonfirmasi adanya fragmen DNA target dengan PCR menggunakan primer spesifik. Selanjutnya plasmid rekombinan diisolasi dari koloni yang telah teruji positif menggunakan *GeneJet™ Plasmid Miniprep* kit (Fermentas) dengan prosedur sebagaimana yang direkomendasikan dalam buku manual yang tersedia, dilanjutkan dengan digesti menggunakan enzim restriksi *EcoRI*, dan diseku. Sekuen DNA yang diperoleh dianalisis menggunakan BLAST dan dilakukan penajajaran dengan *software* Bioedit v7.0.5 dan DNASTAR Lasergene.v7.1.

Hasil dan Pembahasan

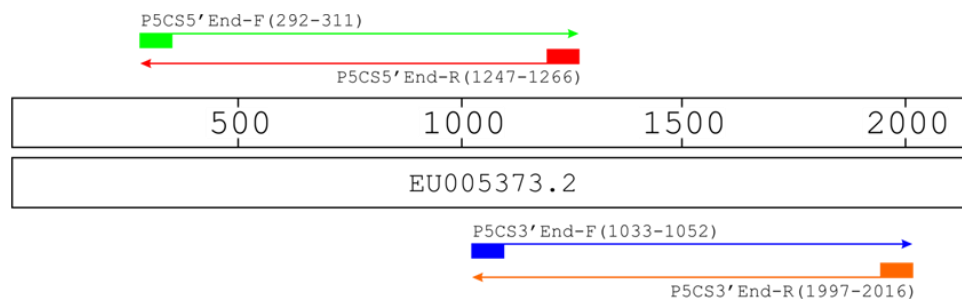
Perancangan primer dan amplifikasi fragmen P5CS

Tabel 1 menyajikan susunan nukleotida dua pasang primer yang dirancang menggunakan input sekuen gen P5CS dari tebu yang terdeposit pada *GenBank*, sedangkan Gambar 1 menunjukkan posisi keempat primer tersebut. Pasangan primer no 1 dengan no 2 (P5CS_5F/P5CS_5R) dirancang untuk mengamplifikasi fragmen gen P5CS dari bagian ujung 5'-coding sequence (cds), sedangkan pasangan primer no 3 dengan no 4 (P5CS_3F/P5CS_3R) dirancang untuk mengamplifikasi fragmen gen P5CS dari bagian ujung 3'-coding sequence (cds), masing-masing dengan ukuran sekitar 800 – 900 bp.

Isolasi RNA dan amplifikasi fragmen gen P5CS

Gambar 2A menyajikan profil elektroforesis RNA total yang diisolasi dari daun tebu. Dari Gambar tersebut nampak bahwa selain tidak terdegradasi, RNA yang diisolasi juga bebas dari kontaminan DNA. Hasil pengukuran absorbansi pada λ260, λ280 dan λ230 menunjukkan bahwa RNA yang diperoleh mempunyai kemurnian terhadap protein dan polisakarida yang cukup memadai untuk reaksi RT-PCR (data tidak disajikan).

RT-PCR untuk amplifikasi fragmen gen P5CS dengan templat RNA yang telah diisolasi dari daun



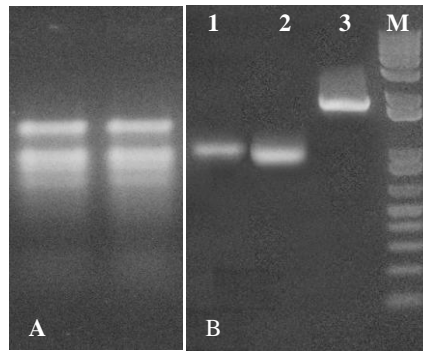
Gambar 1. Posisi pasangan primer yang digunakan dalam penelitian ini relative terhadap sekuen full cds gen P5CS tebu dari *Genbank* (EU005373.2).

Figure 1. The position of primer pairs used in this research relative to the full length cds of sugarcane P5CS gene from *Genebank* (EU005373.2).

Tabel 1. Sekuen primer yang digunakan untuk amplifikasi fragmen gen P5CS.

Table 1. Primer sequences used to amplify P5CS gene fragment.

No	Pasangan primer <i>Primer Pairs</i>	Sekuen primer <i>Primer sequences</i>
1	P5CS_5F	5'GTTGGACAGAGTGGCCTCAT
2	P5CS_5R	5'AATCTGGACCAAGGCATGAG
3	P5CS_3F	5'GCAGCACAAGATGCTGGATA
4	P5CS_3R	5'TGTGCTTATGCCAACCTCAG



Gambar 2. (A) Profil elektroforesis RNA total hasil isolasi dari daun tebu. (B) Hasil amplifikasi fragmen gen P5CS dengan beberapa primer; Lajur 1: Hasil amplifikasi fragmen gen P5CS dengan primer P5CS_5F/ P5CS_5R; Lajur 2: Hasil amplifikasi fragmen P5CS dengan primer P5CS_3F/P5CS_3R; Lajur 3: Hasil amplifikasi fragmen P5CS dengan pasangan primer P5CS_5F/P5CS_3R. Lajur M: marka DNA 1 Kb plus.

Figure 2. (A) Electrophoretic profile of total RNA isolated from sugarcane leaf (B) Amplification of P5CS gene fragment using various primer pairs; lane 1: amplification of P5CS gene fragment using P5CS_5F/ P5CS_5R primer pair, Lane 2: Amplification of P5CS gene fragment using P5CS_3F/P5CS_3R primer pair; Lane 3: Amplification of P5CS gene fragment using P5CS_5F/P5CS_3R primer pair. Lane M: DNA marker 1 Kb plus.

tebu dilakukan menggunakan kedua pasang primer hasil rancangan sebagaimana disajikan pada Tabel 1. Hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer P5CS_5F/P5CS_5R dan P5CS_3F/P5CS_3R dapat dilihat pada Gambar 2B lajur 1 dan lajur 2, masing-masing menghasilkan fragmen DNA berukuran sekitar 850 – 1000 bp, yang sesuai dengan ukuran target DNA (Gambar 1). Selain kedua fragmen DNA tersebut, dalam penelitian ini juga dicoba amplifikasi menggunakan kombinasi primer P5CS_5F/P5CS_3R untuk menghasilkan fragmen DNA yang lebih panjang, berukuran mendekati *cds* P5CS yang utuh. Hasil amplifikasi berupa fragmen DNA berukuran sekitar 2000 bp ditunjukkan pada Gambar 2B lajur 3. Nampak bahwa fragmen yang diperoleh berukuran mendekati panjang *cds* lengkapnya yaitu sekitar 2150 bp.

Konstruksi vektor rekombinan dan kloning DNA produk amplifikasi

Koloni putih hasil transformasi dianalisis dengan PCR koloni menggunakan primer spesifik gen P5CS yang sama dengan primer yang digunakan dalam reaksi RT-PCR (Gambar 3.). Hal ini dilakukan untuk memastikan ada tidaknya sisipan fragmen DNA hasil RT-PCR yang terklon. Gambar 3A menyajikan elektroforesis hasil PCR dari koloni transforman yang membawa fragmen P5CS 3F – 3R, yaitu koloni hasil transformasi menggunakan produk amplifikasi dengan pasangan primer P5CS_3F/P5CS_3R. Nampak bahwa tiga koloni positif mengandung fragmen DNA sisipan yang berukuran sekitar 950 bp (antara 850 bp – 1000

bp). Elektroforesis hasil PCR dari koloni transforman yang membawa sisipan fragmen P5CS 5F – 5R dapat dilihat pada Gambar 3B. Pada gambar tersebut nampak bahwa koloni yang dianalisis positif mengandung sisipan DNA berukuran antara 850 - 1000 bp, kurang lebih sama dengan ukuran produk RT-PCRnya. Sedangkan Gambar 3C menunjukkan hasil PCR dari koloni transforman yang mengandung fragmen DNA hasil amplifikasi dengan pasangan primer P5CS 5F – 3R. Hasil elektroforesis tersebut menunjukkan bahwa ketiga fragmen produk RT-PCR telah diklon ke dalam *E. coli*. Untuk mengkonfirmasi lebih lanjut bahwa fragmen DNA produk RT-PCR telah terklon, serta untuk keperluan analisis sekuens DNA melalui sekuensing, dilakukan isolasi plasmid dari koloni *E. coli* rekombinan yang pada uji PCR koloni telah terbukti positif mengandung sisipan fragmen DNA, dilanjutkan dengan digesti menggunakan enzim *EcoRI*. Hasil isolasi plasmid dan digestinya dengan *EcoRI* dapat dilihat pada Gambar 4. Dari gambar tersebut nampak bahwa digesti plasmid dengan enzim *EcoRI* menghasilkan dua pita yang masing-masing berukuran sekitar 3 kb dan 984 bp (pada lajur 1 dan 2), 3 kb dan 975 bp (pada lajur 3), serta sekitar 3 kb dan 1725 bp (pada lajur 4 dan 5). Lajur 6 hanya menghasilkan satu pita yang berukuran 3 kb. Hal ini disebabkan karena pada lajur 6, plasmid yang dipotong merupakan plasmid pGEM-T *Easy* tanpa sisipan (sebagai kontrol). Plasmid pGEM-T *Easy* mempunyai dua situs pemotongan *EcoRI* di kanan kiri daerah sisipan. Apabila daerah tersebut tidak tersisipi oleh fragmen DNA, kemudian dipotong dengan *EcoRI* maka akan

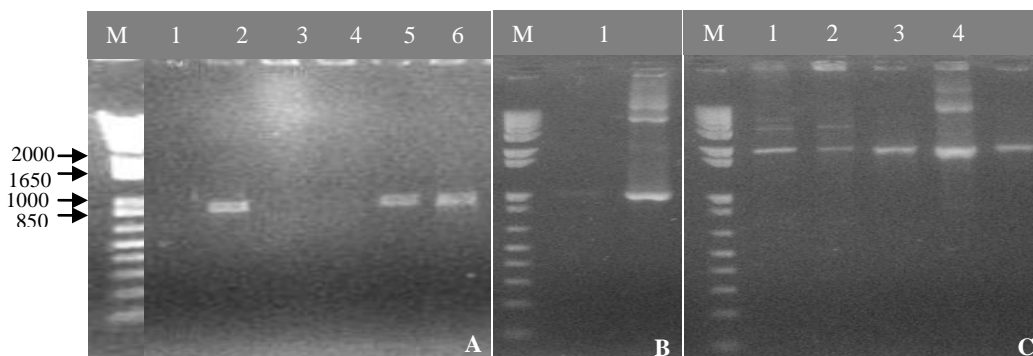
memperlihatkan satu pita ketika dilakukan elektroforesis gel agarose. Hasil tersebut memperkuat hasil PCR koloni yang menunjukkan kembali bahwa fragmen gen P5CS telah terklon dalam *E. coli*.

Sekuensing dan analisis DNA terklon

Konfirmasi fragmen gen *P5CS* hasil RT-PCR dilakukan dengan sekuensing fragmen gen *P5CS* dan penjarannya dengan fragmen gen *P5CS* yang ada di *Genbank*. Sampel yang digunakan untuk sekuensing pada penelitian ini yaitu fragmen gen hasil RT-PCR (*P5CS* 3'F-3'R dan *P5CS* 5'F-3'R) yang telah diekstraksi dan dipurifikasi. Fragmen gen *P5CS* 5'F-

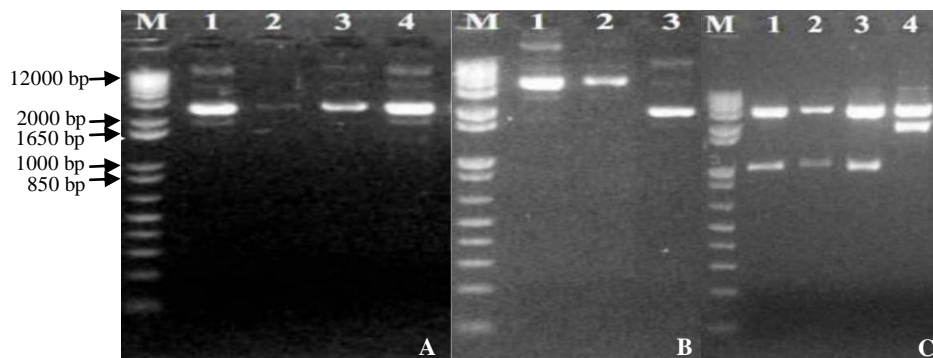
5'R tidak disekuen. Sekuensing fragmen gen tersebut dilakukan dua arah yaitu dengan menggunakan primer *P5CS Forward* dan *P5CS Reverse*. Primer yang digunakan dalam sekuensing yaitu pasangan primer *P5CS* 3'F-3'R dan *P5CS* 5'F-3'R. Hasil sekuensing disajikan pada Gambar 5 & 6. Sekuensing DNA tersebut menghasilkan sekuen DNA yang berukuran 854 bp untuk fragmen gen *P5CS* 3'F-3'R sedangkan fragmen gen *P5CS* 5'F-3'R menghasilkan sekuen berukuran 1187 bp dengan tambahan *gaps* sekitar 295 bp.

Apabila dicermati lebih lanjut, berdasarkan hasil sekuensing dapat diketahui bahwa ukuran fragmen DNA yang didapatkan mengalami pengurangan.



Gambar 3. Profil elektroforesis hasil PCR dari (A) Koloni *E. coli* rekombinan yang membawa fragmen *P5CS* 3F - 3R; (B) Koloni *E. coli* rekombinan yang membawa fragmen *P5CS* 5F - 5R. (C) Koloni *E. coli* rekombinan yang membawa fragmen *P5CS* 5F - 3R. M = marker 1 kb plus DNA Ladder.

Figure 3. Electrophoretic profile of PCR from: (A) *E. coli* recombinant colony carrying *P5CS* 3F - 3R fragment; (B) *E. coli* recombinant colony carrying *P5CS* 5F - 5R fragment; (C) *E. coli* recombinant colony carrying *P5CS* 5F - 3R fragment. M= 1 kb plus DNA ladder marker.



Gambar 4. Elektroforesis plasmid hasil isolasi dari *E. coli* rekombinan yang membawa fragmen *P5CS* 3'F-3'R, *P5CS* 5'F-5'R, dan *P5CS* 5'F-3'R. (A) Lajur 1-3= pGEM-T Easy /*P5CS* 3'F-3'R, lajur 4= pGEM-T Easy /*P5CS* 5'F-5'R; (B) lajur 1-2 = pGEM-T Easy /*P5CS* *P5CS* 5'F-3'R, lajur 3 = pGEM-T Easy; (C) Elektroforesis hasil digesti plasmid rekombinan menggunakan *EcoRI*. lajur 1= pGEM-T Easy/*P5CS* 3'F-3R, lajur 2= pGEM-T Easy/*P5CS* 5'F-5'R, lajur 3= pGEM-T Easy/*P5CS* 5'F-3'R. M = marker 1 kb plus DNA Ladder.

Figure 4. Electrophoretic of plasmid isolated from recombinant *E. coli* carrying fragments of *P5CS* 3'F-3'R, *P5CS* 5'F-5'R, dan *P5CS* 5'F-3'R. (A) Lane 1-3= pGEM-T Easy /*P5CS* 3'F-3'R, Lane 4= pGEM-T Easy /*P5CS* 5'F-5'R, (B) Lane 1-2= pGEM-T Easy /*P5CS* *P5CS* 5'F-3'R, Lane 3= pGEM-T Easy, (C) Electrophoretic of recombinant plasmid digested with *EcoRI*. Lane 1= pGEM-T Easy/*P5CS* 3'F-3R, lane 2= pGEM-T Easy/*P5CS* 5'F-5'R, lane 3= pGEM-T Easy/*P5CS* 5'F-3'R. M= 1 kb plus DNA ladder marker.

<i>S. offic_P5CS</i> 5'-	TTGAAGCCAGGAAAGATAGCAAGCCTCGCAAAATCCATCCGCACTCTTGACATATGGAA	1140
P5CS 3'F-3'R 5'-	AGCAAGCCTCGCAAAATCCATCCGCACTCTTGACATATGGAA	43
<i>S. offic_P5CS</i>	GACCCAATCAACCAGATACTCAAAGAACAGAGGTTGCTGAAGATTGGTTCCTTGAGAAA	1200
P5CS 3'F-3'R	GACCCAATCAACCAGATACTCAAAGAACAGAGGTTGCTGAAGATTGGTTCCTTGAGAAA	103
<i>S. offic_P5CS</i>	ACATCTTGCCCATAGGGGTGCTATTGATCGTTTTTGGAGTCCAGGCCTGATGCCTTGGTC	1260
P5CS 3'F-3'R	ACATCTTGCCCATAGGGGTGCTATTGATCGTTTTTGGAGTCCAGGCCTGATGCCTTGGTC	163
<i>S. offic_P5CS</i>	CAGATTGCGTCGTTAGCAATTGCAAGTGGCAACGGTCTTCTCCTGAAAGGTGGAAAAGAA	1320
P5CS 3'F-3'R	CAGATTGCGTCGTTAGCAATTGCAAGTGGCAACGGTCTTCTCCTGAAAGGTGGAAAAGAA	223
<i>S. offic_P5CS</i>	GCCATGAGATCAAACACAGTATTGCATAAGGTTATAACTGGTGCAATTCCTAGCAACGCTG	1380
P5CS 3'F-3'R	GCCATGAGATCAAACACAGTATTGCATAAGGTTATAACTGGTGCAATTCCTAGCAACGCTG	283
<i>S. offic_P5CS</i>	GGTGA AAAACTTATTGGACTTGTACAAGTAGAGATGAAATCGCTGATTTACTAAAGCTT	1440
P5CS 3'F-3'R	GGTGA AAAACTTATTGGACTTGTACAAGTAGAGATGAAATCGCTGATTTACTAAAGCTT	343
<i>S. offic_P5CS</i>	GATGATGTCATTGATCTTGTTCATTCCAAGAGGCAGCAATAAGCTGGTTTCACAAATCAAG	1500
P5CS 3'F-3'R	GATGATGTCATTGATCTTGTTCATTCCAAGAGGCAGCAATAAGCTGGTTTCACAAATCAAG	403
<i>S. offic_P5CS</i>	GCATCAACTAAGATCCCTGTCTTGGTCATGCTGATGGTATTGGCCATGTATACATCGAC	1560
P5CS 3'F-3'R	GCATCAACTAAGATCCCTGTCTTGGTCATGCTGATGGTATTGGTCATGTATACATCGAC	463
<i>S. offic_P5CS</i>	AAATCAGCTGACATGAATATGGCAAAACGAATAGTATGGATGCTAAAATTGATTACCCA	1620
P5CS 3'F-3'R	AAATCAGCTGACATGAATATGGCAAAACGAATAGTATGGATGCTAAAATTGATTACCCA	523
<i>S. offic_P5CS</i>	GCAGCTGCAATGCTATGGAGACATTGCTTGTTCATAAAGATCTTATAAAGGCTCCAGGT	1680
P5CS 3'F-3'R	GCAGCTGCAATGCTATGGAGACATTGCTTGTTCATAAAGATCTTATAAAGGCTCCAGGT	583
<i>S. offic_P5CS</i>	CTTGAGGACCTACTGCTATCTCTCAAACAGAGGAGTTATTCTTTATGGAGGCGCTGTT	1740
P5CS 3'F-3'R	CTTGAGGACCTACTGCTATCTCTCAAACAGAGGAGTTACTCTTTATGGAGGCGCTGTT	643
<i>S. offic_P5CS</i>	GCGCAGGAACTATTGTGCATTCCAAAAGCAGATTCATTCCATCATGAATATAGCTCTATG	1800
P5CS 3'F-3'R	GCGCAGGAACTATTGTGCATTCCAAAAGCAGATTCATTCCATCATGAATATAGCTCTATG	703
<i>S. offic_P5CS</i>	GCCCGCACAAATTGAGTTCGTTGATGATGTACAGTCAGCAATTGACCATATACATCGCTAT	1860
P5CS 3'F-3'R	GCCTGCACAAATTGAGTTCGTTGATGATGTACAGTCAGCAATTGACCATATACATCGCTAT	763
<i>S. offic_P5CS</i>	GGAAAGTGGACATACAGATTGCATTGTTACTACAGATGATAAAGTAGCAGAACTTTTCTG	1920
P5CS 3'F-3'R	GGAAAGTGGACATACAGATTGCATTGTTACTACAGATGATAAAGTAGCAGAACTTTTCTG	823
<i>S. offic_P5CS</i>	CGCCAAGTTGATAGTGTCTGCTGATTTTATAATGTGAGCACACGATTCTCTGATGGGGCT	1980 -3'
P5CS 3'F-3'R	CGCCAAGTTGATAGTGTCTGCTGATTTTATA	854 -3'

Gambar 5. Hasil sekuensing fragmen P5CS 3'F-3'R dan penjarannya dengan gen P5CS dari *S. officinarum* (EU005373.2). *S.offic_P5CS* = *S. officinarum delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) mRNA, complete cds* (EU005373.2), P5CS 3'F-3'R = fragmen hasil sekuensing.

Figure 5. Sequencing of P5CS 3'F-3'R fragment and its alignment with P5CS gene from *S. officinarum* (EU005373.2). *S.offic_P5CS* = *S. officinarum delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) mRNA, complete cds* (EU005373.2), P5CS 3'F-3'R = sequenced fragment.

Pembandingan fragmen gen P5CS 3'F-3'R hasil sekuensing dengan fragmen gen P5CS 3'F-3'R hasil RT-PCR yang berukuran 984 bp memperlihatkan pengurangan basa nukleotida sebesar 130 bp. Hal ini disebabkan ketika sekuensing menggunakan primer P5CS 3'F dan P5CS 3'R yang menyebabkan nukleotida terbaca oleh alat sekuensing dimulai dari beberapa basa nukleotida primer atau beberapa basa nukleotida setelah sekuen primer.

Begitu pula dengan fragmen P5CS 5'F-3'R juga mengalami pengurangan panjang sekuen yang seharusnya 1725 bp hanya dihasilkan sekitar 1187 bp. Pengurangan panjang sekuen fragmen P5CS 5'F-3'R selain disebabkan oleh penggunaan primer gen P5CS sewaktu sekuensing juga disebabkan oleh adanya kesenjangan (*gap*) sekitar 295 bp. Berdasarkan Gambar 6 dapat diketahui bahwa *gap* tersebut terdapat di tengah-tengah antara hasil sekuen dengan meng-

gunakan primer P5CS 5'F dan hasil sekuen dengan primer P5CS 3'R. Gaps tersebut ditunjukkan dengan garis putus-putus (-----) dan diduga terjadi terkait dengan penggunaan primer dalam proses sekuensing yaitu hanya menggunakan satu pasang primer gen P5CS dan juga terkait dengan kinerja alat sekuensing yang hanya mampu membaca nukleotida dengan optimal sampai sekitar 600-800 bp.

Setelah dilakukan sekuensing, selanjutnya dilakukan analisis BLASTN (Blast nukleotida) untuk mengetahui tingkat homologi fragmen DNA produk RT-PCR dengan sekuen gen P5CS yang ada di *Genbank*. Hasil BLASTN akan menunjukkan tingkat homologi antara sekuen nukleotida fragmen DNA yang dianalisis dengan sekuen nukleotida yang terdapat di dalam *Genbank*. Data hasil analisis BLASTN disajikan pada Tabel 2.

<i>S. offic</i> P5CS 5'-	GTCTTCCCAACTTCTTGTGACAGACAGTATTTTGGAGAATCCAAACTTCCGGGAGAGGCTCCGTGAAACT	420
P5CS 5'F-3'R 5'-	AAACTTCCGGGAGAGGCTCCGTGAAACT	28
<i>S. offic</i> P5CS	GTTGAGTCACTATTAGATCTTAAAGTTGTACCAATATTTAATGAAAATGATGCCATCAGCACTAGAAAAGG	490
P5CS 5'F-3'R	GTTGAGTCACTATTAGATCTTAAAGTTGTACCAATATTTAATGAAAATGATGCCATCAGCACTAGAAAAGG	98
<i>S. offic</i> P5CS	CTCCATATGAGGATTCATCTGGTATATCTCTGGGATAATGACAGTTTAGCCGGTCTTCTAGCTATAGAACT	560
P5CS 5'F-3'R	CTCCATATGAGGATTCATCTGGTATATTTTGGGATAATGACAGTTTAGCCGGTCTTCTAGCTATAGAACT	168
<i>S. offic</i> P5CS	TAAAGCAGATCTCCTTGTCTACTCAGTGACGTGGATGGCCTCTACAATGGTCCACCAAGTGAACCTCAA	630
P5CS 5'F-3'R	TAAAGCAGATCTCCTTGTCTACTCAGTGACGTGGATGGCCTCTACAATGGTCCACCAAGTGAACCTCAA	238
<i>S. offic</i> P5CS	TCAAAGATAATACATACCTACATCAAAGAGAAACATCACAATGAGATCACATTTTGGTGATAAGTCACGTG	700
P5CS 5'F-3'R	TCAAAGATAATACATACCTACATCAAAGAGAAACATCACAATGAGATCACATTTTGGTGATAAGTCACGTG	308
<i>S. offic</i> P5CS	TTGGTAGAGGAGGAATGACAGCTAAAGTGAAGGCTGCTTTCGTGGCTTCAAACAGTGGCACGCCCTGTTGT	770
P5CS 5'F-3'R	TAGGTAGAGGAGGAATGACAGCTAAAGTGAAGGCTGCTTTCGTGGCTTCAAACAGTGGCACGCCCTGTTGT	378
<i>S. offic</i> P5CS	TATTACAAGTGGATTTGCATCTCAGAGCATCCTTAGAGTTCTCCAAGGAGAGAAAATTGGCACTCTCTTT	840
P5CS 5'F-3'R	TATTACAAGTGGATTTGCATCTCAGAGCATCCTTAGAGTTCTCCAAGGAGAGAAAATTGGCACTCTCTTT	448
<i>S. offic</i> P5CS	CATAAGGACGCAAGTCTGTGGGAACCATCCAAAGATGTTAGTGCCTGTGAGATGGCTGTCTCTGCAAGAG	910
P5CS 5'F-3'R	CATAAGGACGCAAGTCTGTGGGAACCATCCAAAGATGTTAGTGCCTGTGAGATGGCTGTCTCTGCAAGAG	518
<i>S. offic</i> P5CS	AATGTTCAAGGTGTTTGCAGAATTTGTCATCGGATGAGCGCAAGAAAATATTGCTAGATGTTGCAGATGC	980
P5CS 5'F-3'R	AATGTTCAAGGTGTTTGCAGAATTTGTCATCGGATGAGCGCAAGAAAATATTGCTA-----	574
<i>S. offic</i> P5CS	TTTGAGGAGAATGAGGATTTGATTAAGATGAGAATGAAGCTGATGTTGCTGCAGCACAAAGTCTGGA	1050
P5CS 5'F-3'R	-----	574
<i>S. offic</i> P5CS	TATGAAAATCTTTGATTGCTAGGTTGACTTTGAAGCCAGGAAAGATAGCAAGCCTCGCAAAATCCATCC	1120
P5CS 5'F-3'R	-----	574
<i>S. offic</i> P5CS	GCACCTTGCACATATGGAAGACCAATCAACCAGATACTCAAAGAACAGAGGTTGCTGAAGATTTGGT	1190
P5CS 5'F-3'R	-----	574
<i>S. offic</i> P5CS	TCCTTGAGAAAACATCTTGCCATTAGGGGTGCTATTGATCGTTTTTGGAGTCCAGGCCTGATGCCTTGCTC	1260
P5CS 5'F-3'R	-----	574
<i>S. offic</i> P5CS	CAGATTGCGTCGTTAGCAATTCGAAGTGGCAACGGTCTTCTCCTGAAAGGTGGAAAAGAAGCCATGAGAT	1330
P5CS 5'F-3'R	-AGATTGCATCGTTAGCAATTCGAAGTGGCAACGGTCTTCTCCTGAAAGGTGGAAAAGAAGCCATGAGAT	643
<i>S. offic</i> P5CS	CAAACACAGTATTGCATAAGGTTATAACTGTTGCAATTCCTAGCAACGTGGGTGAAAACCTTATTGGACT	1400
P5CS 5'F-3'R	CAAACACAGTATTGCATAAGGTTATAACTGTTGCAATTCCTAGCAACGTGGGTGAAAACCTTATTGGACT	713
<i>S. offic</i> P5CS	TGTTACAAGTAGAGATGAAATCGCTGATTTACTAAAGCTTGATGATGTCATTGATCTTGTCAATCCAAGA	1470
P5CS 5'F-3'R	TGTTACAAGTAGAGATGAAATCGCTGATTTACTAAAGCTTGATGATGTCATTGATCTTGTCAATCCAAGA	783
<i>S. offic</i> P5CS	GGCAGCAATAAGCTGGTTTCACAAATCAAGGCATCAACTAAGATCCCTGTCTTGGTCATGCTGATGGTA	1540
P5CS 5'F-3'R	GGCAGCAATAAGCTGGTTTCACAAATCAAGGCATCAACTAAGATCCCTGTCTTGGTCATGCTGATGGTA	853
<i>S. offic</i> P5CS	TTTGCCATGTATACATCGACAAATCAGCTGACATGAATATGGCAAAACGAATAGTGGATGCTAAAAT	1610
P5CS 5'F-3'R	TTTGTCATGTATACATCGACAAATCAGCTGACATGAATATGGCAAAACGAATAGTGGATGCTAAAAT	923
<i>S. offic</i> P5CS	TGATTACCCAGCAGCCTGCAATGCTATGGAGACATTGCTTGTTCATAAAGATCTTATAAAGGCTCCAGGT	1680
P5CS 5'F-3'R	TGATTACCCAGCAGCCTGCAATGCTATGGAGACATTGCTTGTTCATAAAGATCTTATAAAGGCTCCAGGT	993
<i>S. offic</i> P5CS	CTTGAGGACCTACTGCTATCTCTCAAACAGAAGGAGTTACTTTTATGGAGGGCCTGTTGCGCAGGAAC	1750
P5CS 5'F-3'R	CTTGAGGACCTACTGCTATCTCTCAAACAGAAGGAGTTACTTTTATGGAGGGCCTGTTGCGCAGGAAC	1063
<i>S. offic</i> P5CS	TATTGTGCATTCCAAAAGCAGATTCAATCCATCATGAATATAGCTCTATGGCCCGCACAATTGAGTTCGT	1820
P5CS 5'F-3'R	TATTGTGCATTCCAAAAGCAGATTCAATCCATCATGAATATAGCTCTATGGCCCGCACAATTGAGTTCGT	1133
<i>S. offic</i> P5CS	TGATGATGTACAGTCAGCAATTGACCATATACATCGCTATGGAAGTGGACATACAGATTGCATTGTTACT	1890 -3'
P5CS 5'F-3'R	TGATGATGTACAGTCAGCAATTGACCATATACATCGCTATGGAAGGGGACATAC	1187 -3'

Gambar 6. Hasil sekuensing fragmen P5CS 5'F-3'R dan penjarannya dengan gen P5CS dari *S. officinarum* (EU005373.2). *S.offic_P5CS* = *S. officinarum delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) mRNA, complete cds* (EU005373.2), P5CS 5'F-3'R = fragmen hasil sekuensing.

Figure 6. Sequencing result of P5CS 5'F-3'R fragment and its alignment with P5CS gene from *S. officinarum* (EU005373.2). *S.offic_P5CS* = *S. officinarum delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) mRNA, complete cds* (EU005373.2), P5CS 5'F-3'R = sequenced fragment.

Tabel 2. Analisis BLASTN fragmen P5CS 5’F-3’R

Table 2. BLASTN analysis of P5CS 5’F-3’R fragment

No. Akses Accession no	Deskripsi (Description)	Identitas (Identity) (%)
EU005373.2	<i>Saccharum officinarum</i> delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) mRNA, complete cds	99
EU113257.1	<i>Saccharum arundinaceum</i> delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase mRNA, complete cds	98
EF155655.1	<i>Saccharum officinarum</i> delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) mRNA, complete cds	97
GO377720.2	<i>Sorghum bicolor</i> delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase 2 (P5CS2), mRNA, complete cds	95

Berdasarkan nilai identitas dari analisis BLASTN (Tabel 2), dapat diketahui bahwa fragmen gen produk RT-PCR (P5CS 5’-3’) memiliki tingkat homologi yang sangat tinggi terhadap beberapa sekuen gen P5CS pada tebu (*Saccharum* sp.) yang terdapat di pusat data Genbank. Tingkat homologi tersebut ditunjukkan dengan nilai identitas masing-masing sebesar 99 % dan 98%, yaitu terhadap sekuen *S. officinarum* delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) mRNA, complete cds (EU005373.2), dan *S. arundinaceum* delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase mRNA, complete cds (EU113257.1). Selain itu, dari hasil BLAST diketahui pula bahwa fragmen gen P5CS tersebut memiliki homologi yang cukup tinggi dengan gen P5CS 2 pada tanaman lain yang sekerabat yaitu sorgum (*Sorghum bicolor*). Data tersebut dapat digunakan untuk identifikasi lanjutan dari gen P5CS pada tanaman. Menurut Hur et al. (2004) tanaman padi mempunyai dua gen yang menyandi P5CS yaitu OsP5CS1 dan OsP5CS2. Data terkini melaporkan bahwa kedua gen family P5CS tersebut (P5CS1 dan P5CS2) pada *Arabidopsis thaliana* menunjukkan peranan yang berbeda di dalam mengakumulasi prolin pada kondisi cekaman kekeringan (Szekely et al., 2008).

Hasil penjabaran sekuen fragmen gen P5CS 3’F – 3’R menunjukkan adanya perbedaan nukleotida antara sekuen fragmen gen hasil RT-PCR dengan sekuen gen P5CS dari *S. officinarum* (EU005373.2) dan *S. arundinaceum* (EU113257.1). Perbedaan tersebut terjadi karena beberapa nukleotida pada posisi tertentu tersubstitusi menjadi nukleotida lain yaitu basa purin yang tersubstitusi menjadi basa purin maupun pirimidin lain, dan basa pirimidin menjadi basa pirimidin maupun purin lain (data tidak ditampilkan).

Selain adanya substitusi basa nukleotida, juga terdapat perbedaan lain yaitu adanya penambahan nukleotida pada posisi tertentu. Perbedaan ini terlihat pada penjabaran fragmen gen P5CS 5’F-3’R dengan gen P5CS dari *S. officinarum* (EU005373.2) maupun

dengan gen P5CS dari *S. arundinaceum* (EU113257.1). Dari hasil penjabaran dengan *S. officinarum* tersebut diketahui adanya penambahan satu basa A (Adenin) pada posisi ke-575, sedangkan pada penjabaran dengan *S. arundinaceum* diketahui adanya penambahan satu basa C (Sitosin) pada posisi ke-221 dan posisi ke-222, serta penambahan satu basa A pada posisi ke-223 dan posisi ke-575 (data tidak ditampilkan).

Fragmen gen P5CS yang telah berhasil diisolasi belum merupakan gen lengkap. Akan tetapi dengan diperolehnya fragmen gen P5CS dan urutan basanya dengan ukuran yang hampir mendekati cds lengkapnya, maka peluang untuk mendapatkan gen lengkap P5CS semakin terbuka.

Kesimpulan

Fragmen gen P5CS berhasil diisolasi dari daun tebu varietas PSJT 941, dengan homologi yang sangat tinggi (99%) dengan gen P5CS dari *Saccharum officinarum* L. dan tanaman sekerabat. Fragmen gen tersebut telah dikloning ke *E. coli*.

Daftar Pustaka

- Chen J, S Wang, R Jing & X Mao (2009). Cloning The PvP5CS Gene from Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) and its Expression Patterns Under abiotic stresses. *J Plant Physiol* 166, 12-19.
- Chen J, X Zhang, R Jing, MW Blair, X Mao & S Wang (2010). Cloning and Genetic Diversity Analysis of New P5CS Gene from Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 120, 1393-1404.
- Hien DT, M Jacobs, G Angenon, C Hermans, TT Thu, LV Son & NH Roosens (2003). Proline accumulation and Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene properties in three rice cultivars differing in salinity and drought tolerance. *Plant Sci* 165, 1059-1068.

- Hur JH, KH Jung, CH Lee & GH An (2004). Stress-inducible OsP5CS2 gene is essential for salt and cold tolerance in rice. *Plant Sci* 167, 417–426.
- Iskandar HM, RE Casu, AT Fletcher, S Schmidt, J Xu, DJ Maclean, JM Manners & GD Bonnett (2011). Expression of abiotic stress-response genes differ during sucrose accumulation and water deficit in sugarcane culms. *BioMed Central Biol* 11,12 (doi:10.1186/1471-2229-11-12).
- Kishor PBK, Z Hong, GH Miao, C-AA Hu & Verma DPS (2005). Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol* 108,1387-1394.
- Mahajan S & N Tuteja (2005). Cold, salinity and drought stresses, An overview. *Arch Biochem Biophys* 444(2), 139-158.
- Minarsih H, D Santosa & N Fitrianty (2001). Identification of P5CS gene on sugarcane by PCR using heterologous primer. *Menara Perkebunan* 69 (1), 1-9.
- Molinari HBC, CJ Marur, E Daros, MKF de Campos, JFRP de Carvalho, JCB Filho, LFP Pereira & LGE Viera (2007). Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp), osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiol Plant* 130, 218-229.
- Mohammadkhani N & R Heidari (2008). Drought-Induced Accumulation of Soluble Sugars and Proline in Two Maize Varieties. Urmia University. Iran. *Word Appl Sci J* 3(3), 448-453.
- Reddy AR, KV Chaitanya & M Vivekanandan (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J Plant Physiol* 161, 1189–1202.
- Sambrook J & DW Russell (2001). *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 3rd Edition. New York, Cold-Spring Harbor Laboratory Press.
- Su J & R Wu (2004) Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. *Plant Sci* 166, 941–948.
- Su M, XF Li, XY Ma, XJ Peng, AG Zhao, LQ Cheng, SY Chen & GS Liu (2011). Cloning two P5CS genes from bioenergy sorghum and their expression profiles under abiotic stresses and MeJA treatment. *Plant Sci* 181, 652-659.
- Sugiharto B (2004) Biochemical and molecular studies on sucrose-phosphate synthase and drought inducible-protein in sugarcane (*Saccharum officinarum*). *J Ilmu Dasar* 5, 62–67.
- Szekely G, E Abraham, A Cseplo, G Rigo, L Zsigmond, J Csiszar, F Ayaydin, N Strizhov, J Jasik, E Schmelzer, C Koncz & L Szabados (2008). Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant J* 53, 11-28.
- Toruan-Mathius N, M Tony-Liwang, Ibrahim-Danuwikarsa, G Suryatmana, H Djajasukanta, D Saodah & IGP Wenten Astika (2004). Respons biokimia beberapa progeni kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) terhadap cekaman kekeringan pada kondisi lapang. *Menara Perkebunan* 72 (2), 38-56.
- Verbruggen N & C Hermans (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35, 753-759.
- Yusniwati (2008). Galur cabai transgenik toleran kekeringan dengan gen P5CS penyandi enzim kunci biosintesis prolina: Regenerasi dan karakterisasi regeneran. Bogor, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. *Disertasi*, 143 pp.