

Isolasi dan kloning fragmen cDNA dari tanaman karet dengan sifat resisten dan rentan terhadap *Corynespora cassiicola* menggunakan metode cDNA-AFLP

Isolation and cloning of cDNA fragments from rubber plant with resistant and susceptible characters to Corynespora cassiicola using cDNA-AFLP method

NURHAIMI-HARIS¹⁾, Antonius SUWANTO²⁾,
Maggy T. SUHARTONO²⁾ & Hajrial ASWIDINNOOR³⁾

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

²⁾ Fakultas MIPA, Kampus Darmaga, Institut Pertanian Bogor, Indonesia

³⁾ Fakultas Pertanian, Kampus Darmaga, Institut Pertanian Bogor, Indonesia

Terima tgl 30 Januari 2010/Disetujui 3 Mei 2010

Abstract

Leaf fall disease caused by Corynespora cassiicola fungi is one of the most important diseases in rubber plant. Rubber clone AVROS 2037 is considered resistant to this pathogen while clone PPN 2444 is susceptible. These two rubber clones were used to identify genes or transcripts differentially expressed during interaction between rubber plants and the fungi, using cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism (cDNA-AFLP) method. Induced genes/transcripts expression was examined to compare differences between plants uninfected and infected with C. cassiicola at 24, 36, 48 and 72 hours after inoculation. cDNA-AFLP analysis was performed using restriction enzyme VspI and TaqI so the adapters and primers also have the recognition site of these enzymes. By using 29 specific primers, 35 out of approximately 1450 fragments were differentially expressed between AVROS and PPN 2444 clones. All of these fragments were cloned and sequenced. The homology-based grouping of these sequences resulted in 19 contigs and nine individual sequences. Among these, 10 contigs and five sequences have significant sequence homology with known genes in gene bank data base, such as Ran binding protein, protein transporter and transcriptional regulators of some organisms; arginase, GTP-binding protein, heat shock protein (HSP) and aconitase. Ran binding protein, GTP-binding protein and protein transporter were known as membrane proteins while arginase and HSP usually expressed as a response to wounding or toxin treatment. The presence of arginase is usually related to the availability of nitric oxide (NO) in plant tissue. NO is well known as a signal molecule on plant defense response.

[Key words: Leaf-fall disease, Hevea brasiliensis, cDNA-AFLP, Corynespora cassiicola]

Abstrak

Penyakit gugur daun yang disebabkan oleh fungi *Corynespora cassiicola* merupakan salah satu penyakit penting tanaman karet. Klon karet AVROS 2037 menunjukkan sifat resisten terhadap patogen tersebut sedangkan klon PPN 2444 merupakan klon yang rentan. Kedua klon karet tersebut digunakan untuk mengidentifikasi gen atau transkrip yang diekspresikan secara

diferensial selama terjadi interaksi antara tanaman karet dengan *C. cassiicola* menggunakan teknik *cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism* (cDNA-AFLP). Ekspresi gen/transkrip dipelajari untuk membandingkan perbedaan antara tanaman yang tidak diinfeksi dengan yang diinfeksi patogen pada waktu 24, 36, 48 dan 72 jam setelah inokulasi. Analisis cDNA-AFLP dilaksanakan dengan menggunakan pasangan enzim restriksi *VspI* dan *TaqI* sehingga adapter dan primer memiliki sekuen pengenalan kedua enzim restriksi tersebut. Dengan menggunakan 29 pasang primer spesifik, sebanyak 35 dari sekitar 1450 fragmen memiliki ekspresi berbeda antara klon AVROS 2037 dan PPN 2444. Semua fragmen yang berbeda tersebut kemudian diklon pada vektor kloning dan diseku. Hasil sekuensing dikelompokkan berdasarkan homologi sekuennya dan menghasilkan 19 *contigs* serta sembilan macam sekuen yang tidak mengelompok. Sebanyak 10 dari 19 *contigs* dan lima dari sembilan sekuen tersebut memiliki homologi dengan produk gen yang telah dikenal yang terdapat di pangkalan data GenBank, seperti *putative Ran binding protein*, protein transporter, regulator transkripsi, arginase, *GTP-binding protein*, *heat shock protein* (HSP) dan aconitase. Beberapa di antaranya seperti *putative Ran binding protein*, protein transporter dan *GTP-binding protein* dikenal sebagai protein membran, sedangkan arginase dan HSP merupakan protein atau enzim yang ekspresinya pada tanaman antara lain dipengaruhi oleh adanya pelukaan dan perlakuan toksin. Keberadaan arginase sering berhubungan dengan ketersediaan *nitric oxide* (NO) pada jaringan tanaman. NO dikenal sebagai salah satu sinyal molekuler dalam mekanisme pertahanan tanaman.

[Kata kunci: Penyakit gugur-daun, *Hevea brasiliensis*, cDNA-AFLP, *Corynespora cassiicola*]

Pendahuluan

Corynespora cassiicola merupakan salah satu patogen penting pada tanaman karet yang menyebabkan penyakit gugur daun. Pada tahun 2009, patogen tersebut bersama dengan dua patogen lainnya yaitu *Colletotrichum gloeosporioides* dan *Oidium heveae* dilaporkan telah menginfeksi seluas 17.966 hektar tanaman karet di seluruh Indonesia sehingga sangat merugikan secara ekonomi. Penyakit gugur

daun *Corynespora* terutama muncul dan berkembang pada klon karet rentan dan di daerah beriklim basah (Pawirosoemardjo *et al.*, 2009). Klon karet dilaporkan memiliki kisaran respons yang sangat luas terhadap serangan *C. cassiicola*, mulai dari yang sangat tahan sampai sangat rentan. Klon RRIC 103, KRS 21 dan RRIM 725 yang masuk ke Indonesia melalui pertukaran klon internasional pada tahun 1974 tercatat sebagai klon yang sangat rentan, demikian juga klon seri PPN seperti PPN 2058, PPN 2444, dan PPN 2447 yang merupakan hasil seleksi lokal (Sinulingga *et al.*, 1996; Suwanto *et al.*, 1996). Hadi (2003) melaporkan bahwa beberapa klon seperti AVROS 2037, BPM 24, PPN 2058, PPN 2447, PR 300, PR 303, RRIC 110, RRIM 600 dan RRIM 712 memperlihatkan respons yang berbeda terhadap masing-masing isolat virulen. Akan tetapi beberapa klon seperti BPM 1, PB 260, PR 261, RRIC 100 dan RRIM 712 selalu menunjukkan respons ketahanan yang tinggi sedangkan klon PPN 2444 dan RRIC 103 selalu memberikan respon sangat rentan terhadap setiap isolat *C. cassiicola* yang diuji.

Pendekatan yang banyak dilakukan untuk mengendalikan penyebaran penyakit *C. cassiicola* adalah dengan menanam klon-klon karet yang resisten terhadap patogen tersebut. Klon-klon generasi lama yang dilaporkan resisten antara lain AVROS 2037, BPM 1 dan RRIC 100, sedangkan klon-klon baru dari seri IRR antara lain IRR 42, 112 dan 118 serta dari seri PB antara lain PB 260, 330 dan 340 (Pawirosoemardjo *et al.*, 2009). Selain itu, pemilihan klon juga dilakukan dengan memperhatikan daerah penanaman karena tidak semua klon resisten sesuai untuk berbagai lingkungan. Berdasarkan tingkat resistensinya, klon karet resisten dibedakan lagi atas yang sangat resisten seperti BPM 1, PB 340, IRR 32, 39, 112 dan 118 serta yang resisten seperti AVROS 2037, RRIC 100 dan IRR 5 (Pawirosoemardjo *et al.*, 2009).

Resistensi tanaman terhadap suatu patogen ditentukan oleh berbagai faktor, salah satunya adalah sifat genetik tanaman. Sejauh ini, molekul atau gen yang berperan dalam resistensi klon karet terhadap *C. cassiicola* belum diketahui sehingga dengan mempelajari transkrip/gen yang diekspresikan secara diferensial pada saat terjadinya interaksi inang-patogen akan membuka peluang untuk mengidentifikasi transkrip/gen yang berperan dalam resistensi tanaman. Salah satu teknik yang dapat digunakan untuk identifikasi perbedaan pola ekspresi gen antara tanaman resisten dan rentan adalah *cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism* (cDNA-AFLP) (Bachem *et al.*, 1996). Kepekaan teknik tersebut telah dibuktikan sebanding dengan analisis Northern sehingga banyak diaplikasikan untuk mengidentifikasi gen yang diekspresikan dalam interaksi inang-patogen, baik gen yang berasal dari tanaman maupun dari patogen (Avrora *et al.*, 2003; Durrant *et al.*, 2000; Petters *et al.*, 2002; Santaella *et al.*, 2004, Sugui & Deising 2002; Zhang *et al.*, 2003). Keistimewaan

teknik cDNA-AFLP adalah kemampuannya untuk mengidentifikasi gen yang terinduksi maupun tertekan ekspresinya pada satu percobaan yang sama. Teknik cDNA-AFLP memiliki sensitivitas tinggi, dapat diulang dan didasarkan pada reaksi amplifikasi dengan PCR serta tidak memerlukan pengetahuan tentang sekuen DNA dari genom target (Bachem *et al.*, 1996).

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi transkrip atau gen/bagiannya yang diekspresikan pada saat terjadi interaksi antara tanaman karet dengan *C. cassiicola* melalui teknik cDNA-AFLP. Hasil penelitian ini diharapkan akan membuka peluang untuk memahami terjadinya resistensi pada klon karet tertentu.

Bahan dan Metode

Inokulasi patogen

Bahan tanam karet yang digunakan adalah klon AVROS 2037 (resisten) dan klon PPN 2444 (rentan) yang ditanam dalam polibeg dan berada pada fase pertumbuhan dua unit daun. Sebagai patogen adalah isolat *C. cassiicola* cGT1 SS virulen yang diperoleh dari Balai Penelitian Sembawa. Konidia isolat dihasilkan berdasarkan metode Situmorang (2002). Daun umur 14 hari diinokulasi dengan suspensi (mengandung 4×10^4 konidia/mL) dengan cara menyemprotkan secara merata ke permukaan bawah daun, kemudian daun disungkup dengan kantong plastik. Sampel diambil dari daun yang diinokulasi masing-masing 24, 36, 48 dan 72 jam setelah inokulasi serta dari daun yang tidak diinokulasi sebagai kontrol. Daun dimasukkan ke dalam RNAlater[®] (Ambion) yaitu reagen yang berfungsi untuk melindungi RNA dari kerusakan.

Preparasi sampel mRNA

Preparasi mRNA menggunakan *mRNA Capture Kit* (Roche). Daun dikeringkan dengan alat *Lyophilisator* selama 48 jam kemudian digerus hingga berbentuk serbuk. Serbuk ditimbang 20 mg di dalam tabung mikro 1,5 mL, ditambahkan 200 μ L *lysis buffer*, dikocok kuat agar tercampur sempurna dan didiamkan dalam wadah berisi es selama lima menit. Campuran disentrifus dengan kecepatan 11.000 g selama satu menit pada suhu 4°C. Semua supernatan dipindahkan ke tabung mikro yang baru, endapan disentrifus kembali dengan kondisi sama seperti di atas dan supernatannya digabungkan dengan yang pertama. Selanjutnya oligo(dT)₂₀ disiapkan dengan cara mencampurkan 2 μ L oligo (dT)₂₀ yang telah terlabel biotin (*mRNA Capture Kit*) dengan 38 μ L H₂O (*mRNA Capture Kit*). Proses hibridisasi mRNA dengan oligo dT tersebut dilakukan sesuai prosedur yang direkomendasikan dalam *mRNA Capture Kit*.

Sintesis cDNA

Ke dalam tabung dimasukkan 50 μL campuran yang mengandung 10 μL bufer ligasi lima kali, 0,5 μL RNase inhibitor, 5 μL DTT 100 mM, 10 μL dNTP 10 kali (2,5 mM), 1 μL *Reverse Transcriptase Expand* dan 23,5 μL H_2O . Campuran diinkubasi pada suhu 42°C selama dua jam. Sebanyak 40 μL campuran tersebut ditambahkan dengan 120 μL larutan yang mengandung 16 μL bufer ligasi, 12 μL dNTP 10 kali (2,5 mM), 6 μL DTT 100 mM, 1,5 μL enzim ligase, 4,3 μL DNA Polimerase I (*E. coli*), 1,6 μL RNase H dan 78,6 μL H_2O . Campuran diinkubasi pada suhu 15°C selama 45 menit, kemudian pada suhu 22°C selama 50 menit. Selanjutnya larutan dibuang dan tabung yang mengandung cDNA dicuci tiga kali masing-masing menggunakan 200 μL bufer pencuci.

Pemotongan cDNA dengan enzim restriksi *Taq* I dan *Vsp* I

Untuk memotong cDNA dengan enzim restriksi *Taq* I, ke dalam tabung yang telah dicuci ditambahkan 50 μL campuran yang mengandung 5 μL 1,4 *All Buffer* 10 kali, 2 μL enzim restriksi *Taq* I dan 43 μL H_2O , kemudian ditambahkan dua tetes minyak mineral dan diinkubasi pada suhu 65°C selama dua jam. Setelah larutan dibuang, tabung dicuci tiga kali, masing-masing menggunakan 100 μL bufer pencuci. Untuk memotong DNA dengan enzim restriksi *Vsp* I, ke dalam tabung yang telah dicuci ditambahkan 50 μL campuran yang mengandung 5 μL 1,4 *All Buffer* 10 kali, 1 μL enzim restriksi *Vsp* I dan 44 μL H_2O , kemudian campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama dua jam. Larutan kemudian dipindahkan ke tabung mikro 1,5 mL.

Ligasi fragmen cDNA dengan sekuen adapter

Sekuen adapter atas atas *Vsp* I adalah 5'- CTC GTA GAC TGC GTA CC- 3', atas bawah *Vsp* I adalah 5'- TAG GTA CGC AGT C - 3', atas atas *Taq* I adalah 5'- GAC GAT GAG TCCT GAC - 3' dan atas bawah *Taq* I adalah 5'- CGG TCA GGA CTC AT - 3'. Adapter *Vsp* I disiapkan dengan cara mencampurkan sebanyak 2,6 μL adapter atas atas *Vsp* I (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 2 μL adapter atas bawah *Vsp* I (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), dan 95,4 μL H_2O (MilliQ) sehingga konsentrasi akhir adalah 5 μM . Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit kemudian didinginkan sampai mencapai suhu ruang. Untuk menyiapkan adapter *Taq* I, dicampurkan sebanyak 25 μL adapter atas atas *Taq* I (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 22 μL adapter atas bawah *Taq* I (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), dan 53 μL H_2O (MilliQ) sehingga konsentrasi akhir adalah 50 μM . Cara inkubasi sama seperti di atas. Ligasi fragmen cDNA dengan sekuen adapter dilakukan dengan cara menambahkan ke dalam 50 μL produk restriksi sebanyak 5,5 μL campuran yang mengandung 1 μL adapter *Vsp* I (5 μM), 1 μL adapter *Taq* I

(50 μM), 0,5 μL ATP (10 mM), 0,5 μL 1,4 *All Buffer* (10X), dan 2,5 μL T4 DNA Ligase. Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 22 °C selama dua jam.

Preamplifikasi

Preamplifikasi menggunakan primer standar *Vsp* I dan *Taq* I. Sekuen primer standar untuk *Vsp* I adalah 5'- CTC GTA GAC TGC GTA CCT AAT - 3' dan sekuen primer standar untuk *Taq* I adalah 5'- GAC GAT GAG TCC TGA CCG A - 3'. Setiap campuran preamplifikasi terdiri atas 5 μL produk ligasi, 1 μL *Vsp* I primer (100 ng/ μL), 1 μL *Taq* I primer (100 ng/ μL), 5 μL PCR bufer (10 kali), 5 μL dNTPs (10 kali, 2,5 mM), 2 μL *Taq* DNA Polimerase, 5 μL MgCl_2 10 kali, dan ditambahkan H_2O hingga volume 50 μL . Ke dalam setiap tabung ditambahkan dua tetes minyak mineral. Reaksi amplifikasi dimulai pada suhu 94°C selama tiga menit kemudian diikuti 25 siklus, masing-masing siklus dilaksanakan pada suhu 94°C (45 detik), 55°C (45 detik), dan 72°C (60 detik). Untuk mengetahui hasil preamplifikasi, sebanyak 2 μL produk PCR dielektroforesis pada gel agarose 1% dengan tegangan 70 V selama 30 menit. Gel diwarnai dengan etidium bromida (0,5 mg/L) dan produk amplifikasi diamati dengan UV transiluminator.

Amplifikasi selektif

Produk preamplifikasi diencerkan 10 kali dan primer *Vsp* I dilabel dengan $\gamma^{33}\text{P}$ -dATP. Proses pelabelan dilakukan dengan mencampurkan 5 μL primer *Vsp* I (100 ng/ μL), 10 μL bufer kinase (bufer A) lima kali, 10 μL $\gamma^{33}\text{P}$ -dATP, 2 μL T4 kinase dan ditambahkan H_2O hingga volume 50 μL . Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam, kemudian dipanaskan pada suhu 70°C selama 10 menit untuk menginaktifkan enzim. Primer yang telah dilabel disimpan pada suhu 4°C. Untuk amplifikasi selektif digunakan 29 pasang primer (Tabel 1). Preparasi sampel dilakukan dengan men-campurkan 5 μL produk preamplifikasi yang telah diencerkan, 0,2 μL *Vsp* I primer (100 ng/ μL) yang telah dilabel, 0,6 μL *Taq* I primer (100 ng/ μL), 3,2 μL dNTPs (10 kali, 2,5 mM), 2 μL PCR bufer, 2 μL MgCl_2 10 kali, 1 μL *Taq* DNA Polimerase dan H_2O hingga volume 20 μL , kemudian ditambahkan satu tetes minyak mineral. Reaksi amplifikasi dilakukan sebanyak 13 siklus dengan kondisi 94°C (30 detik), 65°C [- 0,7°C/siklus] (30 detik), 72°C (60 detik) dan 23 siklus dengan kondisi 94°C (30 detik), 56°C (30 detik), 72°C (60 detik).

Visualisasi produk PCR pada poliakrilamid gel

Produk PCR dicampur dengan pewarna formamid dengan volume yang sama, didenaturasi pada suhu 94°C selama tiga menit, dan dielektroforesis pada 5 % gel poliakrilamid. Gel kemudian ditransfer ke *Gel*

Tabel 1. Sekuen primer *VspI* dan *TaqI* yang digunakan dalam amplifikasi selektif cDNA dari daun karet menggunakan metode cDNA-AFLP.

Table 1. Sequences of *VspI* and *TaqI* primer used in selective amplification of cDNA from rubber leaf by using cDNA-AFLP method.

No.	Kombinasi primer Primer combination	Sekuen pasangan primer (<i>Sequence of primer pair (5'→3')</i>)
1.	<i>Vsp16/Taq16</i>	GACTGCGTACCTAAT-CC/GATGAGTCCTGACCGA-CC
2.	<i>Vsp16/ Taq17</i>	GACTGCGTACCTAAT-CC/GATGAGTCCTGACCGA-CG
3.	<i>Vsp16/ Taq19</i>	GACTGCGTACCTAAT-CC/ GATGAGTCCTGACCGA-GA
4.	<i>Vsp16/ Taq20</i>	GACTGCGTACCTAAT-CC/ GATGAGTCCTGACCGA-GC
5.	<i>Vsp16/ Taq21</i>	GACTGCGTACCTAAT-CC/ GATGAGTCCTGACCGA-GG
6.	<i>Vsp16/ Taq22</i>	GACTGCGTACCTAAT-CC/ GATGAGTCCTGACCGA-GT
7.	<i>Vsp16/ Taq24</i>	GACTGCGTACCTAAT-CC/ GATGAGTCCTGACCGA-TC
8.	<i>Vsp16/ Taq25</i>	GACTGCGTACCTAAT-CC/ GATGAGTCCTGACCGA-TG
9.	<i>Vsp17/ Taq16</i>	GACTGCGTACCTAAT-CG/ GATGAGTCCTGACCGA-CC
10.	<i>Vsp17/ Taq17</i>	GACTGCGTACCTAAT-CG/ GATGAGTCCTGACCGA-CG
11.	<i>Vsp17/ Taq19</i>	GACTGCGTACCTAAT-CG/ GATGAGTCCTGACCGA-GA
12.	<i>Vsp17/ Taq20</i>	GACTGCGTACCTAAT-CG/ GATGAGTCCTGACCGA-GC
13.	<i>Vsp17/ Taq21</i>	GACTGCGTACCTAAT-CG/ GATGAGTCCTGACCGA-GG
14.	<i>Vsp17/ Taq22</i>	GACTGCGTACCTAAT-CG/ GATGAGTCCTGACCGA-GT
15.	<i>Vsp17/ Taq24</i>	GACTGCGTACCTAAT-CG/ GATGAGTCCTGACCGA-TC
16.	<i>Vsp17/ Taq25</i>	GACTGCGTACCTAAT-CG/ GATGAGTCCTGACCGA-TG
17.	<i>Vsp20/ Taq16</i>	GACTGCGTACCTAAT-GC/ GATGAGTCCTGACCGA-CC
18.	<i>Vsp20/ Taq17</i>	GACTGCGTACCTAAT-GC/ GATGAGTCCTGACCGA-CG
19.	<i>Vsp20/ Taq19</i>	GACTGCGTACCTAAT-GC/ GATGAGTCCTGACCGA-GA
20.	<i>Vsp20/ Taq20</i>	GACTGCGTACCTAAT-GC/ GATGAGTCCTGACCGA-GC
21.	<i>Vsp20/ Taq21</i>	GACTGCGTACCTAAT-GC/ GATGAGTCCTGACCGA-GG
22.	<i>Vsp20/ Taq22</i>	GACTGCGTACCTAAT-GC/ GATGAGTCCTGACCGA-GT
23.	<i>Vsp20/ Taq24</i>	GACTGCGTACCTAAT-GC/ GATGAGTCCTGACCGA-TC
24.	<i>Vsp20/ Taq25</i>	GACTGCGTACCTAAT-GC/ GATGAGTCCTGACCGA-TG
25.	<i>Vsp25/ Taq16</i>	GACTGCGTACCTAAT-TG/ GATGAGTCCTGACCGA-CC
26.	<i>Vsp25/ Taq17</i>	GACTGCGTACCTAAT-TG/ GATGAGTCCTGACCGA-CG
27.	<i>Vsp25/ Taq19</i>	GACTGCGTACCTAAT-TG/ GATGAGTCCTGACCGA-GA
28.	<i>Vsp25/ Taq20</i>	GACTGCGTACCTAAT-TG/ GATGAGTCCTGACCGA-GC
29.	<i>Vsp25/ Taq21</i>	GACTGCGTACCTAAT-TG/ GATGAGTCCTGACCGA-GG

Blotting Paper, dikeringkan dengan Gel Dryer dan diekspos dengan film sinar X (Life Ray™ XDA Plus UTLG) selama tujuh hari.

Isolasi dan pemurnian fragmen cDNA

Fragmen target ditandai pada film kemudian bagian film sebesar ukuran fragmen dipotong sehingga terbentuk lubang. Film ditempelkan di atas gel pada posisi yang sesuai, kemudian gel dipotong melalui lubang yang telah dibuat pada film. Setiap potongan gel dimasukkan ke masing-masing tabung PCR 500 µL dan ditambahkan 100 µL Tris (10 mM) pH 7,5. Inkubasi dilakukan selama empat jam pada suhu 37°C, larutan dikocok kuat, diinkubasi selama lima menit pada suhu 95°C dan dikocok kuat kembali. Larutan disentrifus sesaat, bagian larutan dipindah ke tabung baru, ke dalam masing-masing tabung ditambahkan 10 µL glikogen, 1/10 volume sodium asetat (3M, pH 5,2), dan 2 volume etanol absolut. Campuran diinkubasi semalam pada suhu - 20°C. Selanjutnya, campuran disentrifus pada kecepatan 12.000g pada suhu 4°C selama 20 menit. Supernatan dibuang, endapan dicuci dengan 1 mL etanol 70 %, disentrifus

12.000 g pada suhu 4°C selama 10 menit. Larutan dibuang dan endapan dikeringkan, kemudian endapan dilarutkan dalam 10 µL Tris 10 mM (pH 8,0).

Amplifikasi fragmen cDNA dilakukan pada volume 20 µL menggunakan primer yang sesuai. Konsentrasi masing-masing komponen sama seperti pada preamplifikasi. Kondisi PCR adalah: 94°C selama tiga menit; kemudian 35 siklus, masing-masing siklus terdiri atas 94°C (45 detik), 56°C (45 detik), 72°C (60 detik) dan 72°C (7 menit). Untuk konfirmasi hasil amplifikasi, produk PCR dipisahkan pada 2 % agarose gel melalui elektroforesis pada voltase 70 V selama sekitar 50 menit. Pemurnian fragmen cDNA dilakukan dengan cara memisahkan produk PCR pada 2 % *low melting* agarose (Qbiogene), kemudian fragmen dimurnikan dengan *QIAquick Gel Extraction Kit* sesuai prosedur yang direkomendasikan di dalam petunjuk teknisnya.

Kloning fragmen cDNA pada vektor

Kloning fragmen cDNA dilakukan pada vektor pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega). Proses kloning dimulai dengan meligasikan fragmen cDNA ke vektor tersebut menggunakan enzim ligase, sesuai

rekomendasi. Hasil ligasi diintroduksi ke sel bakteri *E. coli* DH5 α kompeten (Sambrook *et al.*, 1989). Sebanyak lima koloni dari setiap cawan dibuat replikanya dan digunakan dalam PCR koloni untuk konfirmasi fragmen cDNA yang diperoleh, maupun untuk digunakan dalam proses sekuensing.

Sekuensing fragmen cDNA

Sekuensing fragmen cDNA dilakukan oleh perusahaan komersil GATC Biotech, Constance, Germany. Program *Contig Express (Vector NTI Suite 6)* digunakan untuk membersihkan sekuen vektor dan adapter dan kemudian mengelompokkan sekuen *contigs*. Sekuen yang telah diedit tersebut kemudian dibandingkan dengan yang terdapat di pangkalan data (*data base*) GenBank menggunakan algoritma BLASTX (Altschul *et al.*, 1997).

Hasil dan Pembahasan

Pemurnian mRNA dan sintesis cDNA

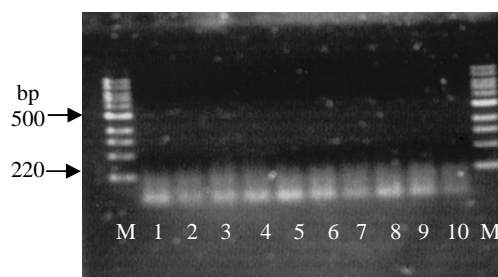
Hasil visualisasi cDNA yang diperoleh setelah preamplifikasi terdapat pada Gambar 1. Kesepuluh cDNA sampel, baik yang berasal dari klon AVROS 2037 maupun PPN 2444, terlihat relatif seragam pada gel agarose. Prinsip utama dari *mRNA Capture Kit* yang digunakan dalam penelitian ini untuk memurnikan mRNA serta mensintesis cDNA adalah adanya lapisan streptavidin pada tabung. mRNA yang telah dilisis dari sel dan memiliki ujung 3'- poli(A) dihibridisasikan dengan oligo (dT)₂₀ yang dilabel biotin sehingga sewaktu dimasukkan ke dalam tabung berlapis streptavidin, hanya mRNA yang akan terikat pada tabung sedangkan ribosomal RNA atau transfer RNA dapat dipisahkan langsung dalam proses pencucian. Teknik serupa telah digunakan oleh Feron *et al.* (2004) untuk mempelajari gen-gen yang diekspresikan secara temporal pada bagian bunga setelah dilakukan persilangan.

Analisis cDNA-AFLP

Amplifikasi cDNA dengan teknik cDNA-AFLP menggunakan 29 kombinasi primer (Tabel 1) menghasilkan produk amplifikasi berupa fragmen cDNA atau *transcript-derived fragment* (TDF) dengan berat molekul antara 50 sampai 600 pb. Rata-rata per kombinasi pasangan primer diperoleh 50 fragmen. Dari sejumlah fragmen tersebut diperoleh 35 fragmen dengan pola ekspresi menarik, baik karena pola ekspresi yang berbeda antara klon AVROS 2037 dengan PPN 2444 (Gambar 2), maupun karena ekspresi yang sangat kuat (Gambar 3). Amplifikasi dengan primer V16/T16 (Gambar 2) menghasilkan fragmen

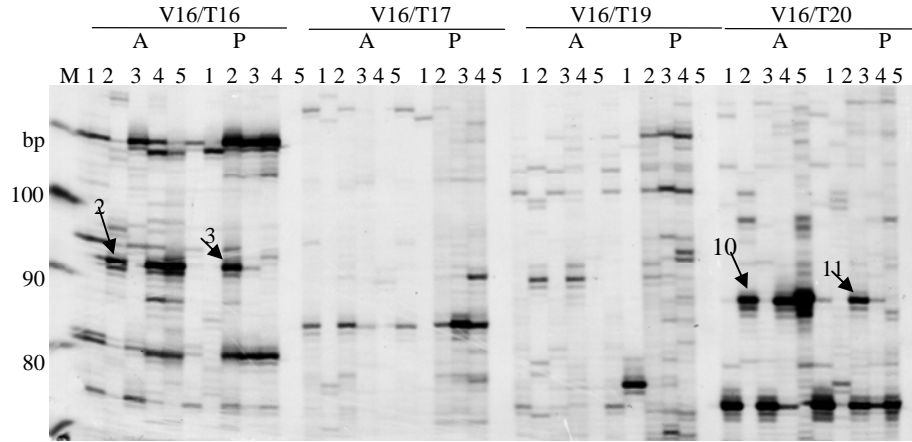
cDNA dengan ukuran \pm 90 pb (fragmen 2 dan 3) yang terekspresi kuat pada klon resisten AVROS 2037 pada waktu 24, 48 dan 72 jam setelah inokulasi patogen, namun pada klon rentan PPN 2444 ekspresi kuat fragmen yang sama hanya terjadi pada waktu 36 jam setelah inokulasi. Fragmen cDNA tersebut diduga merupakan salah satu kandidat transkrip yang berhubungan dengan mekanisme resistensi tanaman karet terhadap *C. cassiicola*. Tidak adanya fragmen yang sama pada klon AVROS 2037 pada waktu 36 jam setelah inokulasi diduga berhubungan dengan pola ekspresi dari fragmen tersebut. Pola ekspresi yang sama juga terdapat pada fragmen 10 dan 11 (Gambar 2). Fragmen cDNA dengan pola ekspresi yang kuat pada kontrol dan kemudian ekspresinya menurun setelah diinokulasi dengan patogen ditemukan pada fragmen 20 dan 24 (AVROS 2037) (Gambar 3). Fragmen 25 dan 26 hanya terekspresi pada klon AVROS 2037 pada periode waktu 48 jam setelah inokulasi, sedangkan fragmen 27 dan 28 terekspresi kuat dan memiliki pola ekspresi yang sama setelah 24 jam dilakukan inokulasi, baik pada klon AVROS 2037 maupun PPN 2444 (Gambar 3).

Fragmen cDNA yang tidak terlihat pada lajur 3 (Gambar 3), baik pada klon AVROS 2037 maupun PPN 2444 dapat disebabkan oleh beberapa kemungkinan, antara lain kesalahan teknis preparasi sampel untuk proses amplifikasi atau kurang sempurnaan teknis selama proses visualisasi.



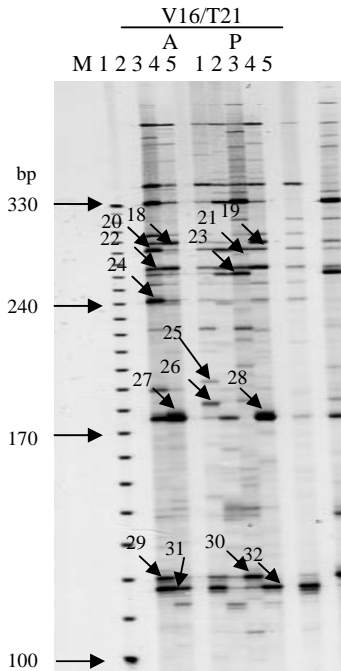
Gambar 1. cDNA tanaman karet hasil preamplifikasi menggunakan primer standar *VspI* dan *TaqI*. Lajur 1 – 5 adalah cDNA dari daun klon AVROS 2037, dan lajur 6-10 adalah cDNA dari daun klon PPN 2444, masing-masing pada 0, 24, 36, 48, 72 jam setelah inokulasi dengan *C. cassiicola*. M adalah 1 kb DNA ladder (Invitrogen).

Figure 1. cDNA of rubber plant resulted from pre-amplification using standard primer *VspI* and *TaqI*. Lanes 1-5 are cDNA from AVROS 2037 clone, and lanes 6-10 are cDNA from PPN 2444 clone, at 0, 24, 36, 48 and 72 hours after inoculation with *C. cassiicola*. M is 1 kb ladder DNA marker (Invitrogen).



Gambar 2. Pola fragmen cDNA dari klon AVROS 2037 (A, resisten terhadap *C. cassiicola*) dan klon PPN 2444 (P, rentan terhadap *C. cassiicola*) berdasarkan analisis cDNA-AFLP dengan empat kombinasi primer (V16/T16, V16/T17, V16/T19, V16/T20). Setiap lajur adalah templat cDNA dari (1) daun sehat, (2) daun diinokulasi, 24 jam setelah inokulasi (jsi), (3) 36 jsi, (4) 48 jsi, dan (5) 72 jsi. Tanda panah adalah contoh fragmen yang menunjukkan ekspresi berbeda antara perlakuan. M adalah marker 1 kb DNA ladder.

Figure 2. Fragment pattern of cDNA from AVROS 2037 clone (A, resistant to *C. cassiicola*) and PPN 2444 (P, susceptible to *C. cassiicola*) based on cDNA-AFLP analysis by using four combinations of primer (V16/T16, V16/T17, V16/T19, V16/T20). Every line is cDNA template from (1) healthy leaf, (2) inoculated leaf, 24 hour after inoculation (hai), 36 hai, 48 hai, and 72 hai. Arrow is example of fragment showing different expression among treatment. M is 1 kb ladder DNA marker.



Gambar 3. Fragmen cDNA dari klon AVROS 2037 (A, resisten terhadap *C. cassiicola*) dan klon PPN 2444 (P, rentan terhadap *C. cassiicola*) berdasarkan analisis cDNA-AFLP dengan primer V16/T21. Setiap lajur adalah templat cDNA dari (1) daun sehat, (2) daun diinokulasi, 24 jam setelah inokulasi (jsi), (3) 36 jsi, (4) 48 jsi, dan (5) 72 jsi. M adalah marker 1 kb DNA ladder. Tanda panah menunjukkan fragmen yang diisolasi dari gel dan angka adalah nomor urut fragmen yang diisolasi.

Figure 3. cDNA fragments from AVROS 2037 clone (A, resistant to *C. cassiicola*) and PPN 2444 (P, susceptible to *C. cassiicola*) based on cDNA-AFLP analysis using V16/T21 primer. Every line is cDNA template from (1) healthy leaf, (2) inoculated leaf, 24 hour after inoculation (hai), 36 hai, 48 hai, and 72 hai. M is 1 kb ladder DNA marker. Arrows show the isolated fragments from gel and numbers show the numbering of fragments.

Isolasi, kloning dan sekuensing fragmen cDNA

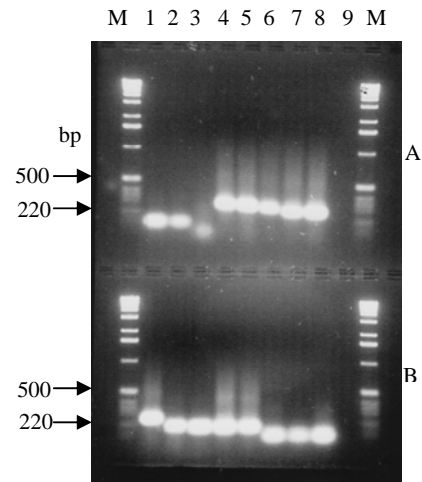
Isolasi fragmen cDNA dilakukan terhadap 35 fragmen yang sudah ditandai pada film. Dari ke-35 fragmen tersebut, 22 fragmen berasal dari klon resisten AVROS 2037 dan 13 fragmen dari klon rentan PPN 2444. Selanjutnya reamplifikasi dilakukan terhadap fragmen-fragmen tersebut menggunakan primer yang sesuai dengan tujuan untuk memperbanyak fragmen dan konfirmasi ukuran fragmen. Hasil reamplifikasi beberapa fragmen terdapat pada Gambar 4. Seluruh fragmen hasil reamplifikasi (35 fragmen) selanjutnya diklon pada vektor pGEM[®]-T Easy Vector Systems. Dari hasil kloning setiap fragmen diambil lima klon sehingga total klon adalah 175, dan ukurannya dikonfirmasi melalui elektroforesis pada gel agarose. Hasil PCR koloni sebagian sampel terdapat pada Gambar 5.

Sebagian fragmen yang berasal dari setiap lima klon sesuai dengan perkiraan, yakni memiliki ukuran sama dan konsisten dengan ukuran pada gel akrilamid, namun sebagian lagi ternyata memiliki ukuran berbeda meskipun berasal dari klon yang sama. Berdasarkan hasil tersebut maka sekuensing dilakukan terhadap seluruh klon sehingga jumlah total fragmen cDNA yang disekuencing adalah 175 fragmen. Dari jumlah tersebut hanya 128 klon yang memiliki sekuencing sisipan, sedangkan 47 klon lain membawa vektor kosong atau vektor dengan beberapa tambahan sekuencing basa saja. Ke-128 sekuencing dibersihkan dari kontaminan yang berasal dari sekuencing vektor serta dikelompokkan berdasarkan kemiripan sekuencing menggunakan program *Contig Express (Vector NTI Suite 6)*. Dari proses tersebut diperoleh sebanyak 20 *contigs* serta sembilan sekuencing yang tidak mengelompok ke salah satu *contig*. Dari 20 *contigs* tersebut terdapat satu *contig* yang hanya mengandung sekuencing vektor sehingga tidak diikuti dalam analisis selanjutnya. Identifikasi homologi fragmen cDNA daun karet dengan produk gen yang telah diketahui fungsinya dilakukan berdasarkan informasi yang terdapat di database GenBank menggunakan BLAST-X (Altschul *et al.*, 1997). Dari analisis tersebut 10 *contigs* dan lima sekuencing memiliki homologi dengan sekuencing gen di database seperti *putative Ran binding protein*, protein transporter, regulator transkripsi, arginase, GTP-binding protein, *heat shock protein (HSP)*, sugar transferase dan aconitase (Tabel 2).

Fragmen dengan sekuencing mirip gen penyandi arginase, aconitase dan *heat shock protein (HSP)* cukup menarik perhatian. Regulasi enzim arginase telah banyak dipelajari pada sel mamalia. Induksi ekspresi arginase pada sel mamalia sebagai respons terhadap trauma pelukaan serta infeksi patogen berperan penting dalam mengatur metabolisme L-arginin. Metabolisme arginin terjadi melalui dua jalur utama, yaitu dikatalis oleh enzim arginase dan lainnya oleh *nitric-oxide synthase (NOS)*. Aktivitas arginase akan mengubah arginin menjadi urea dan ornithin,

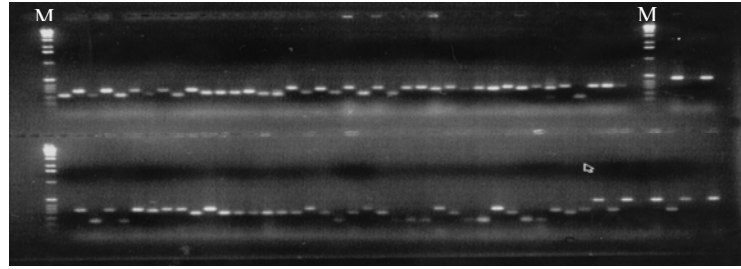
sedangkan aktivitas NOS akan mengubah arginin menjadi *nitric-oxide (NO)*. NO berperan dalam pembentukan cGMP (*cyclic guanylate cyclase*) yang diperlukan dalam sinyal transduksi dan pengaturan *ion channel* (Durner *et al.*, 1998). Adanya dua jalur pembentukan arginin dapat menimbulkan kompetisi dalam penggunaan arginin. Apabila ekspresi arginase meningkat di dalam sel, maka arginin akan lebih banyak digunakan untuk menghasilkan urea dan ornithin sehingga produksi NO berkurang. Pada berbagai mekanisme pertahanan hewan dan tanaman telah banyak dilaporkan bahwa NO merupakan molekul sinyal untuk mengaktifkan mekanisme pertahanan sehingga penurunan level NO dapat mengakibatkan penurunan resistensi inang yang diperantarai NO.

Dari penelitian yang dilakukan oleh Chen *et al.* (2004) dilaporkan bahwa pada daun tomat ekspresi gen *LeARG2* penyandi arginase meningkat tajam oleh adanya pengaruh pelukaan dan toksin coronatine yang disekresikan oleh bakteri patogen *Pseudomonas syringae*. Pelukaan maupun toksin tersebut mengaktifkan sinyal cekaman sehingga terjadi akumulasi asam jasmonat (*jasmonic acid = JA*), yang selanjutnya mengaktifkan ekspresi sejumlah gen yang responsif terhadap pelukaan tersebut (Creelman & Mullet, 1997). JA seperti halnya asam salisilat (*salicylic acid = SA*) dan etilen merupakan regulator utama dalam respons pertahanan tanaman (Dong, 1998).



Gambar 4. Hasil reamplifikasi fragmen cDNA tanaman karet menggunakan primer yang sesuai untuk masing-masing fragmen. M adalah 1 kb DNA ladder. (A) Lajur 1 – 9, berturut-turut adalah fragmen no. 12, 13, 14, 18, 19, 21, 22, 23, kontrol negatif. (B) Lajur 1 – 9, berturut-turut adalah fragmen no. 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, kontrol negatif.

Figure 4. cDNA fragment of rubber plant resulted from reamplification by using suitable primer for each fragment. M is 1 kb ladder DNA marker. (A) Lanes 1-9 are fragment no. 12, 13, 14, 18, 19, 21, 22, 23, negative control. (B) Lanes 1-9 are fragment no. 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, negative control.



Gambar 5. Hasil PCR koloni sebagian fragmen cDNA dengan primer SP6/T7, lima sampel untuk setiap fragmen. M adalah marker DNA (1 kb DNA ladder). (A) Gel atas, berturut-turut setelah M adalah fragmen no. 0,1; 2,3; 0,2; 2,4; 0,3; 2,5; 0,4; 3,1; 0,5; 3,2; 1,1; 3,3; 1,2; 3,4; 1,3; 3,5; 1,4; 4,1; 1,5; 4,2; 2,1; 4,3; 2,2; 4,4; 4,5; 7,2; 5,1; 7,3; 5,2; 7,4; 5,3; 7,5; 5,4; 8,1; 5,5; 8,2; 6,1; 8,3; 6,2; 8,4; M, 17,1; 17,2; 17,3. Gel bawah, berturut-turut setelah M adalah fragmen no. 6,3; 8,5; 6,4; 9,1; 6,5; 9,2; 7,1; 9,3; 9,4; 11,2; 9,5; 11,3; 10,1; 11,4; 10,2; 11,5; 10,3; 12,1; 10,4; 12,2; 10,5; 12,3; 11,1; 12,4; 13,1; 12,5; 13,2; 14,1; 13,3; 14,2; 13,4; 14,3; 13,5; 14,4; 15,1; 14,5; 15,2; 16,1; 15,3; 16,2; 15,4; 16,3; 15,5; 16,4; 16,5.

Figure 5. Results of colony PCR of some cDNA fragments with primer SP6/T7, five samples for each fragment. M is 1 kb ladder DNA marker. (A) Upper gel after M is fragment no 0.1; 2.3; 0.2; 2.4; 0.3; 2.5; 0.4; 3.1; 0.5; 3.2; 1.1; 3.3; 1.2; 3.4; 1.3; 3.5; 1.4; 4.1; 1.5; 4.2; 2.1; 4.3; 2.2; 4.4; 4.5; 7.2; 5.1; 7.3; 5.2; 7.4; 5.3; 7.5; 5.4; 8.1; 5.5; 8.2; 6.1; 8.3; 6.2; 8.4; M, 17.1; 17.2; 17.3; Lower gel after M is fragment no 6.3; 8.5; 6.4; 9.1; 6.5; 9.2; 7.1; 9.3; 9.4; 11.2; 9.5; 11.3; 10.1; 11.4; 10.2; 11.5; 10.3; 12.1; 10.4; 12.2; 10.5; 12.3; 11.1; 12.4; 13.1; 12.5; 13.2; 14.1; 13.3; 14.2; 13.4; 14.3; 13.5; 14.4; 15.1; 14.5; 15.2; 16.1; 15.3; 16.2; 15.4; 16.3; 15.5; 16.4; 16.5.

Tabel 2. Pengelompokan fragmen cDNA yang diperoleh melalui analisis cDNA-AFLP dari daun karet klon AVROS 2037 dan PPN 2444.

Table 2. Grouping of cDNA fragment resulted from cDNA-AFLP analysis from rubber leaf of AVROS 2037 and PPN 2444 clones.

No	Kelompok fragmen Fragment group	Ukuran Size (bp)	Kemiripan sekuen (Sequence homology)	Nilai (Value) E
1	Contig 1	108	putative Ran binding protein 11-like [<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>] protein transporter [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	8e-05 1e-04
2	Contig 2	270	hypothetical protein [<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>]	0.69
3	Contig 5	259	COG3391: Uncharacterized conserved protein [<i>E. coli F11</i>]	2e-10
4	Contig 8	153	Transcriptional Regulator, MarR family [<i>Pseudomonas fluorescens PfO-1</i>]	8e-18
5	Contig 12	251	arginase 2 [<i>Lycopersicon esculentum</i>] arginase [<i>Brassica napus</i>] putative arginase [<i>Arabidopsis thaliana</i>] agmatinase/ catalytic [<i>Arabidopsis thaliana</i>] arginase [<i>Glycine max</i>]	1e-06 2e-06 5e-06 5e-06 2e-05
6	Contig 13	115	GTP-binding-like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>] putative GTP-binding protein DRG [<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>]	5e-14 6e-13
7	Contig 14	145	hypothetical protein PP2606 [<i>Pseudomonas putida KT2440</i>] selenium-binding protein-like [<i>Arabidopsis thaliana</i>] ornithine carbamoyltransferase [<i>Canavalia lineata</i>]	2e-13 4.4 9.7
8	Contig 15	86	putative pyocin S2 (partial) [<i>Yersinia pseudotuberculosis IP 32953</i>]	4e-05
9	Contig 18	231	heat shock protein-like protein [<i>Cucumis melo</i>]	1e-10
10	Contig 19	251	heat shock protein-like protein [<i>Cucumis melo</i>]	3e-08
11	aflp-14.5	55	nicotinate-nucleotide adenyltransferase [<i>Leifsonia xyli subsp. xyli</i>]	0.044
12	aflp-20.5	235	conserved hypothetical protein [<i>Pseudomonas fluorescens PfO-1</i>] transcriptional regulator, putative [<i>Pseudomonas fluorescens Pf-5</i>] Unknown protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	3e-16 7e-14 0.70
13	aflp-22.3	236	Sugar transferases involved in lipopolysaccharide synthesis [<i>Pseudomonas aeruginosa C3719</i>]	6e-32
14	aflp-26.3	163	conserved hypothetical protein [<i>Pseudomonas fluorescens Pf-5</i>]	1e-23
15	aflp-26.4	161	Aconitate hydratase-like [<i>Pseudomonas fluorescens PfO-1</i>] putative aconitase [<i>Prunus avium</i>] aconitase [<i>Lycopersicon pennellii</i>] cytosolic aconitase [<i>Nicotiana tabacum</i>] putative Aconitate hydratase [<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>]	1e-24 2e-12 4e-12 4e-12 4e-12

Di samping arginase, TDF yang lain memiliki homologi tinggi dengan enzim aconitase. Aconitase diketahui merupakan salah satu enzim yang ekspresinya diregulasi oleh NO, aktivitasnya menyebabkan peningkatan level ion bebas di dalam sel. Pada tanaman tembakau, peningkatan iron bebas berhubungan dengan fungsi pertahanan setelah terjadi serangan patogen (Klessig *et al.*, 2000). Dilaporkan juga bahwa peningkatan level iron bebas melalui pengrusakan kluster iron-sulfur aconitase oleh NO, berimplikasi terhadap kerusakan DNA (Keyer & Imley, 1996). Kuat dugaan bahwa NO berkontribusi dalam respons hipersensitif (HR) melalui peningkatan iron bebas dan melalui destabilisasi kluster iron-sulfur (Navarre *et al.*, 2000).

Dalam penelitian ini dengan teridentifikasinya beberapa enzim yang berhubungan secara langsung ataupun tidak langsung dengan ketersediaan NO di dalam sel, menimbulkan dugaan bahwa kemungkinan mekanisme resistensi pada tanaman karet diperantarai oleh NO. Sejauh ini telah diketahui bahwa NO merupakan molekul sinyal pada respons pertahanan dan diperlukan untuk mengaktifkan sepenuhnya resistensi tanaman terhadap penyakit serta program kematian sel pada tanaman kedelai, Arabidopsis dan tembakau (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998). Beberapa TDF juga memiliki homologi tinggi dengan HSP. Meskipun HSP merupakan kelompok protein yang terakumulasi dalam jumlah tinggi apabila sel terpapar suhu tinggi, namun ekspresi HSP juga dapat dipicu oleh adanya infeksi ataupun toksin. HSP umumnya merupakan protein sitoplasma dan berperan penting dalam interaksi protein-protein seperti dalam pelipatan untuk menjaga konformasi serta mencegah agregasi dengan protein yang tidak diinginkan. HSP termasuk dalam kategori protein yang berperan dalam mekanisme pertahanan, dibuktikan melalui identifikasi keberadaannya dalam interaksi antara Cassava dengan *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Santaella *et al.*, 2004) dan *A. thaliana* dengan *Peronospora parasitica* (Van der Biezen *et al.*, 2000).

Kesimpulan dan Saran

Melalui kegiatan penelitian ini diketahui bahwa metode cDNA-AFLP telah berhasil digunakan untuk mengidentifikasi dan mengisolasi transkrip yang diekspresikan secara diferensial pada daun klon karet resiten AVROS 2037 dan klon rentan PPN 2444 yang diinfeksi dengan cendawan patogen *C. cassiicola*. Sebanyak 35 fragmen asal transkrip (TDF) telah diisolasi, diklon, dan diseku. Pengelompokan berdasarkan homologi sekuennya menghasilkan 19 *contigs* dan sembilan macam sekuen yang tidak mengelompok. Sebanyak 10 *contigs* dan lima sekuen memiliki homologi dengan produk gen yang telah dikenal yang terdapat di data base *gene bank*, seperti gen penyandi arginase, *heat shock protein* (HSP) dan aconitase yang berasal dari beberapa spesies tanaman.

Keterlibatan berbagai TDF tersebut dalam mekanisme resistensi tanaman karet masih memerlukan pembuktian lebih lanjut melalui serangkaian penelitian untuk mengamati pola ekspresinya pada berbagai klon karet resisten dan rentan yang ada. Namun paling tidak informasi di atas diharapkan dapat mengawali penelitian molekuler berikutnya untuk membantu mengungkap transkrip atau bagian gen yang berperan dalam mekanisme resistensi tanaman karet terhadap *C. cassiicola*.

Ucapan Terimakasih

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Dr. Valerie Pujade-Renaud (CIRAD, Montpellier, Perancis) atas pendampingan dan pemberian saran-saran selama proses penelitian ini berlangsung.

Daftar Pustaka

- Altschul SF, TL Madden, AA Schaffer, J Zhang, Z Zhang, W Miller & DJ Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res* 25, 3389–3402.
- Avrova AO, E Venter, PRJ Birch & SC Whisson (2003). Profiling and quantifying differential gene transcription in *Phytophthora infestans* prior to and during the early stages of potato infection. *Fungal Gen Biol* 40, 4-14.
- Bachem CWB, RS van der Hoeven, SM de Bruijn D Vreugdenhil, M Zabeau & RGF Visser (1996). Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP : Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J* 9, 745-753.
- Chen H, BC McCaig, M Melotto, SY He & GA Howe (2004). Regulation of plant arginase by wounding, jasmonate and the phytotoxin coronatine. *J Biol Chem* 279(44), 45998-46007.
- Creelman RA & JE Mullet (1997). Oligosaccharins, brassinolides and jasmonates: Nontraditional regulators of plant growth, development and gene expression. *Plant Cell* 9, 1211-1223.
- Delledonne M, Y Xia, RADixon & C Lamb (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394, 585–588.
- Dong X (1998). SA, JA, ethylene and disease resistance. *Curr Opin Plant Biol* 1, 316–323.
- Durner J, D Wendehenne & DF Klessig (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 10328-10333.
- Durrant WE, O Rowland, P Piedras, KE Hammond-Kosack & JDG Jones (2000). cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *The Plant Cell* 12, 963-977.
- Feron R, C Mariani & WH Vriezen (2004). Application of the mRNA capture kit in cDNA-AFLP. *Biochemica* (3), 23-24.

- Hadi H (2003). Analisis genetik sifat ketahanan tanaman karet terhadap penyakit gugur daun *Corynespora*. Ringkasan Disertasi. Institut Pertanian Bogor. 25 hal.
- Pawirosoemardjo S, B Setyawan, H Suryaningtyas, A Situmorang & M Supriadi (2009). *Strategy in Controlling Corynespora Leaf Fall Disease in Rubber Plantation*. Tanjung Morawa, IRR-CFC. 24p
- Keyer K & JA Imlay (1996). Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *In: Proc Natl Acad Sci* 93, 13635–13640
- Klessig DF, J Durner, R Noad, DA Navarre, D Wendehenne, D Kumar, JIM Zhou, J Shah, S Zhang, P Kachroo, Y Trifa, D Pontier, E Lam & Silva H (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *In: Proc Natl Acad Sci USA* 97, 8849-8855.
- Navarre DA, D Wendehenne, J Durner, R Noad & DF Klessig (2000). Nitric oxide modulate the activity of tobacco acenitase. *Plant Physiol* 122, 573-582.
- Petters J, C Gobel, D Scheel & S Rosahl (2002). A pathogen-responsive cDNA from potato encodes a protein with homology to a phosphate starvation-induced phosphatase. *Plant Cell Physiol* 43(9), 1049-1053.
- Sambrook J, EF Fritsch & T Maniatis (1989). *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santaella M, E Suarez, C Lopez, C Gonzalez, G Mosquera, S Restrepo, J Tohme, A Badillo & V Verdier (2004). Identification of genes in cassava that are differentially expressed during infection with *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Mol Plant Pathol* 5(6), 549-558.
- Sinulingga W, Suwanto & H Soepena (1996). Current status of *Corynespora* leaf fall in Indonesia. *In: Proc. Workshop on Corynespora leaf fall disease of Hevea rubber*. Medan, 16 – 17 Desember. p: 29 – 36.
- Situmorang A (2002). Sebaran penyakit gugur daun, virulensi dan genetika *Corynespora cassiicola* asal sentra perkebunan karet Indonesia. *Disertasi*. Bogor, Program Pascasarjana IPB, 115 hal.
- Sugui JA & HB Deising (2002). Isolation of infection-specific sequence tags expressed during early stages of maize anthracnose disease development. *Mol Plant Pathol* 3, 197-203.
- Suwanto, S Pawirosoemardjo & W Sinulingga (1996). Responses of recommended *Hevea* rubber clones to *Corynespora* leaf fall disease in Indonesia. *In: Proc. Workshop on Corynespora leaf fall disease of Hevea rubber*. Medan, 16 – 17 Desember. p: 149-162.
- Van der Biezen EA, J Hedyani, JE Parker & JDG Jones (2000). cDNA-AFLP display for the isolation of *Peronospora parasitica* genes expressed during infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interac* 13, 895-898.
- Zhang L, H Meakin & M Dickinson (2003). Isolation of genes expressed during compatible interactions between leaf rust (*Puccinia triticina*) and wheat using cDNA-AFLP. *Mol Plant Pathol* 4, 469-477.