

**BIOSINTESIS ETILEN DAN AKUMULASI PROLIN PADA SEMANGGI PUTIH
(*Trifolium repens* L.) cv. KOPU DALAM KONDISI CEKAMAN AIR**

***ETHYLENE BIOSYNTHESIS AND PROLINE ACCUMULATION IN CV. KOPU OF WHITE CLOVER
(Trifolium repens L.) EXPOSED TO WATER DEFICIT CONDITION***

Aluh Nikmatullah
Program Study Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Mataram

ABSTRAK

Semanggi putih merupakan salah satu jenis tanaman legum yang umumnya digunakan sebagai tanaman penutup tanah, pupuk hijau dan makanan ternak di daerah lahan kering. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perubahan biosintesis etilen dan akumulasi prolin pada semanggi putih cv. Kopu. Percobaan dilakukan di laboratrium dengan lingkungan terkendali (*climate-controlled Laboratory*). Parameter yang diamati meliputi pertumbuhan, akumulasi prolin, ekspresi gen dan akumulasi protein TR-ACO. Hasil penelitian menunjukkan laju pertumbuhan petiol pada daun pertama Kopu menurun saat kadar air tanah turun di bawah 17%, sedangkan konsentrasi prolin meningkat drastis saat laju pertumbuhan petiol mendekati nol. Menariknya, perubahan ekspresi gen dan akumulasi protein TR-ACO juga terjadi pada saat pertumbuhan petiol terhenti. Hasil tersebut menunjukkan kepekaan tanaman semanggi putih cv. Kopu terhadap cekaman air.

Kata kunci : cekaman air, prolin, ACC oxidase, biosintesis etilen

ABSTRACT

White clover is a legume crop commonly used as a cover crop, green manure and pasture crop on dry lands. Research aimed to investigate changes in ethylene biosynthesis and proline accumulation was conducted in a Climate-controlled Laboratory. The research analysed growth responses, proline accumulation, TR-ACO gene expression and protein accumulation. Petiole elongation rate in the first-fully expanded leaves of Kopu declined when SWC decreased to below 17% while proline concentration increased suddenly when petiole elongation rate ceased. Interestingly, changes in TR-ACO gene expression and protein accumulation also occurred when petiole elongation rate ceased. These results further indicated sensitivity of white clover cv. Kopu to a water deficit.

Key words: water deficit, proline, ACC oxidase, ethylene biosynthesis

PENDAHULUAN

Pertumbuhan dan produktivitas tanaman dipengaruhi oleh berbagai macam cekaman lingkungan, baik yang bersifat abiotik maupun biotik (Gallie *et al.*, 2009). Masalah ketersediaan air bagi tanaman menjadi perhatian besar karena sektor pertanian adalah salah satu pengguna utama sumberdaya air (Chaves *et al.*, 2003), dan ketersediaan air menjadi penentu utama bagi pertumbuhan dan produktivitas tanaman (Chaves *et al.*, 2009).

Respon tanaman terhadap kondisi cekaman air dikendalikan melalui mekanisme yang kompleks, diawali dengan cara tanaman menanggapi dan mensignal cekaman air yang kemudian menyebabkan perubahan biosintesis dan

signaling berbagai macam hormon pertumbuhan, termasuk etilen (Chaves *et al.*, 2003). Perubahan tersebut kemudian diduga menentukan cara adaptasi sel tanaman (perubahan biokimia) serta perubahan morfologinya pada kondisi cekaman air (Quist *et al.*, 2009).

Tanaman mengakumulasi senyawa-senyawa esensial sebagai responnya terhadap cekaman lingkungan. Kondisi cekaman air menurunkan produksi karbohidrat (dari fotosintesis) dan absorpsi ion-ion mineral dari dalam tanah (Achard *et al.*, 2006), yang selanjutnya menghambat pertumbuhan batang dan daun (Neumann, 1995; Achard *et al.*, 2006). Penghambatan pertumbuhan daun tersebut dapat menyebabkan pengalihan penggunaan senyawa-senyawa esensial (*essential solutes*) tersebut untuk pengendalian stres, dari yang

METODE PENELITIAN

semula digunakan untuk mendukung pertumbuhan, misalnya digunakan untuk memproduksi senyawa yang dapat mengatur tekanan osmosis sel (*osmotic adjustment*) sehingga retensi air dan sel turgor meningkat (Neumann, 1995; Achard *et al.*, 2006). Salah satu *essential solutes* tersebut adalah prolin bebas dimana pada kondisi cekaman air prolin terakumulasi pada berbagai spesies tanaman, termasuk semanggi putih (McManus *et al.*, 2000, Nikmatullah, 2009a, Nikmatullah 2009b), serta akumulasinya dapat digunakan sebagai indikator tingkat stres yang dihadapi tanaman.

Seperti halnya prolin bebas, berbagai cekaman lingkungan dilaporkan mempengaruhi biosintesa etilen, sehingga etilen disebut sebagai *stress hormone* (Bleecker and Kende, 2000; Chang *et al.*, 2008). Pada tumbuhan tingkat tinggi, etilen disintesis melalui dua tahapan yaitu tahapan perubahan *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) menjadi 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) oleh enzim ACC synthase (ACS), serta oksidasi ACC menjadi ethylene oleh enzim ACC oxidase (ACO) (Yang and Hoffmann, 1984; Kim *et al.*, 2004). Pentingnya perubahan ACS pada kondisi cekaman lingkungan telah banyak dikaji (Liu and Zhang, 2004; Joo *et al.*, 2008), karena ACS diduga merupakan enzim penentu (*rate-limiting enzyme*) jalur biosintesis etilen (Yang and Hoffmann, 1984), akan tetapi sedikit sekali publikasi yang memfokuskan kajiannya pada ACO, padahal enzim ini mengkatalisasi tahapan terakhir biosintesa etilen pada tanaman (Bleecker and Kende, 2000). Oleh karena itu, penulis menggunakan semanggi putih sebagai model untuk mengkaji perubahan biosintesis etilen dalam kondisi cekaman air.

Pada publikasi sebelumnya, penulis melaporkan perbedaan ketahanan tiga varietas semanggi putih: berdaun lebar, Kopu, serta tanaman berdaun sempit (Tienshan dan Sarikamis). Akumulasi protein ACC synthase-1 dari *Trifolium repens* (TR-ACS1) berbeda pada ketiga varietas tersebut, dimana Kopu, varietas yang peka terhadap kekeringan, mengakumulasi lebih banyak TR-ACS1 (Nikmatullah, 2009b). Meskipun demikian, belum diketahui apakah peningkatan akumulasi ACS tersebut akan mendorong peningkatan akumulasi ACO dan produksi etilen, karena paling sedikit ada tiga isoform TR-ACO ditemukan pada semanggi putih (Hunter *et al.*, 1999). Lebih lanjut, penulis ingin mengetahui hubungan antara kepekaan semanggi putih pada cekaman air, akumulasi prolin dan biosintesis etilen. Perubahan tersebut diduga berpengaruh terhadap respon semanggi putih terhadap cekaman air serta dapat digunakan sebagai penanda kepekaan semanggi putih pada kondisi cekaman air.

Semanggi putih yang digunakan pada penelitian ini adalah varietas *Grasslands Challenge* Kopu II (selanjutnya disebut Kopu). Varietas ini dipilih berdasarkan kepekaannya pada kondisi cekaman air (Nikmatullah, 2009a, Nikmatullah, 2009b). Stek pucuk apikal, telah diakarkan selama dua minggu, ditanam pada media tanam yang diletakkan dalam pot berkapasitas 5 L (satu tanaman per pot), dipelihara selama 4 minggu pada rumah kaca dengan suhu terkendali (18 – 21 °C), selanjutnya dipindahkan ke *Climate Room* [(New Zealand *Climate Environment Laboratory* (NZCEL), *Plant and Food*, Palmerston North, Selandia Baru] dan digunakan dalam percobaan ini. Kondisi *Climate Room* diatur konstan pada suhu 21°C (siang) dan 14°C (malam), kelembaban relatif (RH) 75%, dan konsentrasi CO₂ 350 µL L⁻¹. Ruangan dilengkapi dengan 4 x lampu *Metal Halide* (1.0 kW) dan 4 x lampu Halogen Tungsten (1.0 kW) yang memberikan intensitas cahaya 650 µmm⁻²s⁻¹ PFD dengan fotoperiode selama 14 jam. Seluruh dinding ruangan dilengkapi dengan kaca, diletakkan pada ketinggian 1,5 m dari permukaan tanah, sehingga seluruh ruangan memperoleh intensitas cahaya yang kurang lebih sama. Sebelum perlakuan, tanaman dikondisikan pada *Climate Room* selama dua minggu. Kondisi cekaman air dilakukan dengan cara menghentikan penyiraman dan perlakuan dilakukan sampai petiol pada daun pertama yang mekar penuh (selanjutnya disebut daun pertama) berhenti tumbuh (laju pemanjangan petiol/LPP mendekati nol).

Pengambilan sampel dilakukan secara destruktif (empat ulangan). Kadar air tanah (KAT), potensial air daun (PAD), dan laju pemanjangan petiole (LPP) diukur tiap hari. Pucuk, daun pertama dan kedua mekar penuh dipanen tiap hari, dan segera direndam dalam nitrogen cair dan disimpan pada suhu -80 °C sampai diperlukan. KAT diukur menggunakan TDR (*Time Domain Refractometer*) (Trase Soil Moisture Measuring System, Soilmoisture Equipment Corp, Santa Barbara CA, USA). PAD diukur pada daun pertama dengan *Scholander pressure chamber* (*Soilmoisture Equipment Corp*, Santa Barbara CA, USA), sedangkan LPP diukur pada daun pertama dengan mengukur pertambahan panjang petiol menggunakan mistar.

Kandungan prolin bebas diukur menggunakan metode seperti yang dilaporkan oleh Magna dan Larher (1984), dengan beberapa modifikasi. Daun (50 – 80 mg) digiling halus dengan nitrogen cair, dimasukkan dalam tabung Effendorf, dilarutkan dengan 1,2 mL larutan

sulphosalicylic acid 3 % (w/v), tabung diforteks selama 30 detik, dan disentrifugasi pada kecepatan 20 800 x g selama 7 menit pada suhu 4 °C. Supernatant dipindahkan ke tabung Falcon, diencerkan dua kali lalu diekstrak dengan buffer ekstraksi (1:2, v/v) [ninhydrin 1% (w/v) dalam GAA 60% (v/v)]. Tabung diinkubasikan pada suhu 98 °C selama 1 jam, lalu segera didinginkan (diletakkan pada serutan es), dan prolin diekstrak dengan menambahkan toluene (1:1, v/v) lalu dicampur dengan cara diforteks, dibiarkan selama 5 menit dan selanjutnya fase atas (toluena dan prolin) diambil dan dibaca absorbannya pada panjang gelombang 518 nm, setelah dinormalisasi dengan toluena murni. Konsentrasi prolin dihitung dari persamaan yang telah dibuat menggunakan persamaan regresi linier dari prolin standar.

Eksresi gen *TR-ACO1*, *TR-ACO2* dan *TR-ACO3* diamati menggunakan metode semi-quantitative RT-PCR. RNA total diisolasi menggunakan metode Hot Borate (Hunter and Reid, 2001; Moser *et al.*, 200) dengan beberapa modifikasi. RNA total (4 µg) digunakan untuk reaksi transkripsi balik (reverse transcription) menggunakan primer oligo (dT) (ThermoScript™ RT-PCR system, Invitrogen), mengikuti petunjuk produsen. PCR dilakukan terhadap cDNA dalam reaksi yang mengandung primer yang spesifik untuk *TR-ACO1*, *TR-ACO2*, *TR-ACO3* atau kontrol internal menggunakan degenerate β -actin (konsentrasi total 0,2 µM), cDNA (1 µL), PCR Mastermix (Promega, 20 µL) dengan volume total 40 µL. PCR umumnya dilakukan dengan kondisi : Tahap 1 (satu kali) pada suhu 92 °C selama 2 min, tahap 2 (18 – 26 kali) yaitu denaturasi pada suhu 92 °C selama 40 menit diikuti annealing pada suhu 50 sampai 52°C selama 40 menit dan perpanjangan primer pada suhu 72 °C selama 1 min, serta tahapan 3 adalah inkubasi pada suhu 72 °C selama 5 menit. Primer didisain untuk mengamplifikasi sekitar 100 bp (*coding region*) dan 200 bp (3'UTR region) dari gen target (Lampiran 1). Fragmen DNA

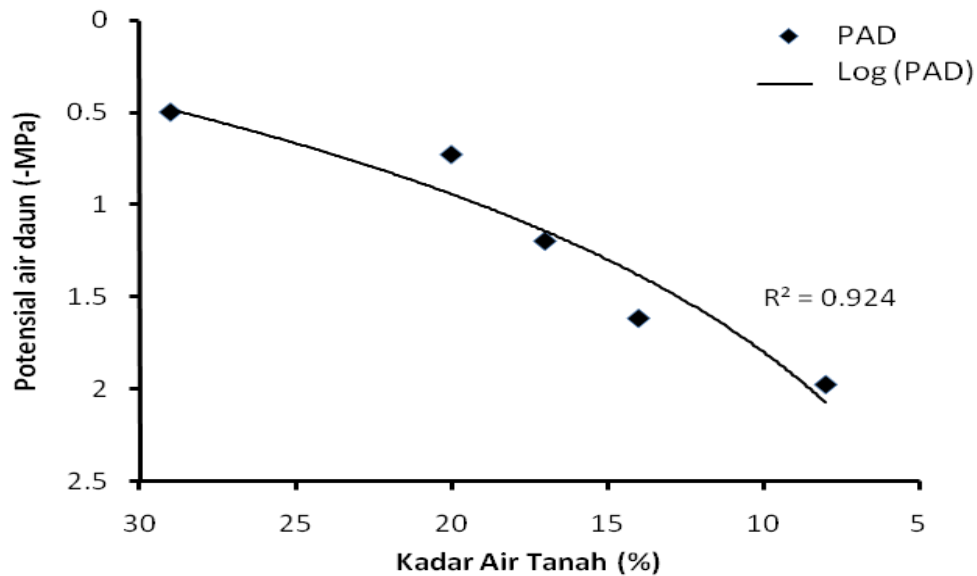
yang dihasilkan oleh PCR dipisahkan dengan elektroforesis pada gel agarosa 1% (w/v) lalu diinkubasikan dalam ethidium bromide (EtBr), dicuci dan didokumentasikan menggunakan alat Gel-Doc.

Akumulasi TR-ACO1 dan TR-ACO2 protein diamati dengan western blot analysis. Protein (20 µg untuk pucuk, 7 µg untuk daun) dipisahkan dengan teknik sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) menurut metode Laemmli (1970), ditransfer ke membran Polyscreen polyvinyl fluoride (PVDF, PerkinElmer™ Life Sciences, Inc., Boston, USA) menggunakan Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) dan diinkubasikan dengan blocking buffer (semalam pada suhu 4°C) lalu dicuci bersih. Blot diinkubasikan dengan antibodi yang sesuai (anti-TR-ACO1 atau TR-ACO2, dengan pengenceran 1:5000 dalam PBST) pada suhu 37°C. Protein divisualisasi dengan metode chemiluminescent setelah diinkubasikan selama 1 jam dengan antibodi sekunder (anti-rabbit IgG HRP-conjugated secondary antibody) dengan pengenceran sebanyak 1:25 000 (TR-ACO1) atau 1:15 000 (TR-ACO2) dalam PBST.

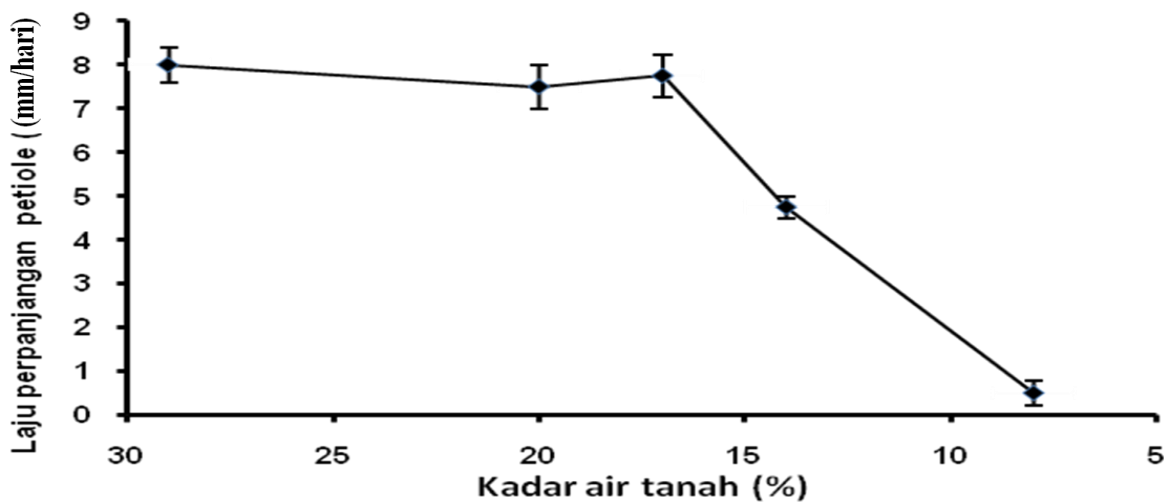
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hubungan antara PAD dan LPP

KAT menurun setelah pengairan dihentikan, dari 29 % (pada kondisi turgid) menjadi 8 % pada saat percobaan dihentikan, yaitu saat LPP mendekati nol. Serupa dengan KAT, LPP juga menurun dengan perlakuan cekaman air, dari – 0,5 MPa (pada kondisi turgid) menjadi -1,9 MPa pada saat percobaan dihentikan. Data KAT dan LPP diplotkan untuk mengetahui hubungan antara KAT dan LPP (Gambar 1). Gambar 1 memperlihatkan hubungan yang hampir logarithmic antara KAT dan LPP, dimana LPP menurun seiring dengan menurunnya KAT.



Gambar 1. Hubungan antara kadar air tanah dengan potensial air daun. Data adalah rerata empat ulangan



Gambar 2. Laju pemanjangan petiole (LPP) pada daun pertama Kopu yang diukur pada kadar air tanah yang berbeda. Data adalah rerata empat ulangan \pm standard error

Kecepatan Pertumbuhan

Kecepatan pertumbuhan diukur pada daun pertama dalam bentuk LPP. LPP tidak segera menurun seiring dengan menurunnya KAT dimana LPP daun pertama pada kondisi turgid hampir sama dengan LPP tanaman sampai KAT sekitar 17%. LPP kemudian menurun drastis pada kondisi KAT di bawah 17% sampai akhirnya LPP terhenti setelah KAT mencapai 8% (Gambar 2)

Tekanan turgor sel merupakan faktor penting yang mengendalikan pertumbuhan tanaman.

Cekaman air menurunkan tekanan turgor dan pertumbuhan tanaman (Bissuel-Belaygue *et al.*, 2002).

Pada penelitian ini, penurunan KAT sampai 17% dan PAD hingga -1,2 MPa tidak menurunkan laju pemanjangan petiole. LPP baru menurun pada kondisi KAT di bawah 17% dan LWP dibawah -1,2 MPa. Penurunan LPP tersebut diduga akibat menurunnya pemanjangan sel yang dikendalikan oleh penurunan tekanan turgor sel (Schroeder *et al.*, 2001). Hal tersebut diduga mempengaruhi biosintesa osmotikum dan hormon pertumbuhan,

dan salah satunya adalah prolin dan ethylene (Potters *et al.*, 2009). Oleh karena itu, dalam penelitian ini penurunan LPP digunakan sebagai indikator terjadinya perubahan biosintesa prolin dan ethylene sehingga percobaan hanya dilakukan sampai LPP terhenti.

Konsentrasi Prolin

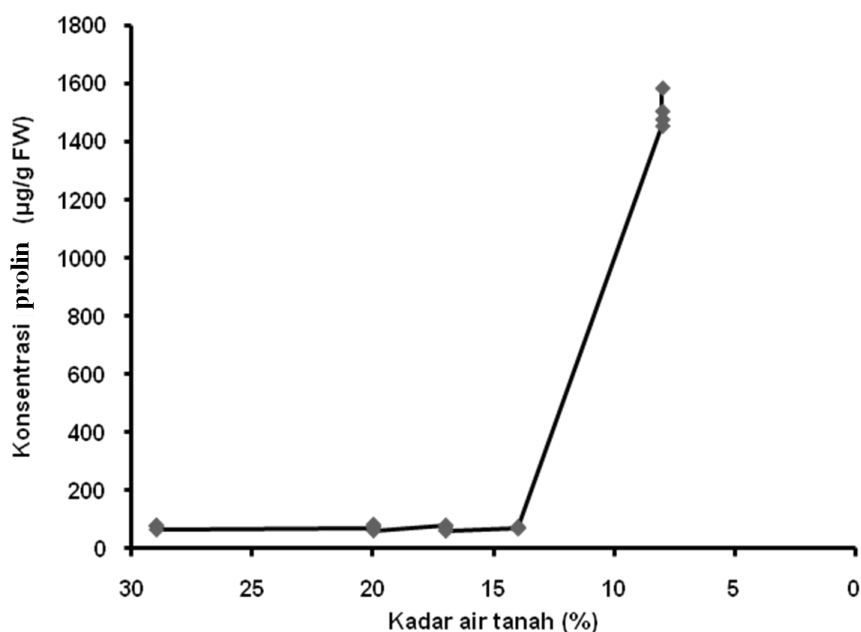
Berbeda dengan pertumbuhan, konsentrasi prolin pada daun tanaman Kopu tidak mengalami perubahan yang significant selama panjang petiolenya masih bertambah, yaitu sampai KAT di atas 8 %. Konsentrasi prolin baru meningkat secara drastis pada saat pertumbuhan terhenti, yaitu setelah kadar air tanah mencapai 8% (Gambar 3).

Penurunan tekanan turgor sel menyebabkan berbagai perubahan biokimia sel dan morfologinya. Perubahan tersebut diduga berhubungan dengan pengendalian kehilangan air jaringan tanaman dan penjagaan fungsi sel dalam kondisi cekman air, diantaranya adalah penutupan stomata dan akumulasi dari berbagai solute yang kompatibel dengan fungsi sel, seperti prolin (Tanaka *et al.*, 2005; Gabrielle and Bendh, 2006). Akumulasi prolin dalam kondisi cekman air telah banyak dilaporkan pada berbagai spesies tanaman (Iannucci

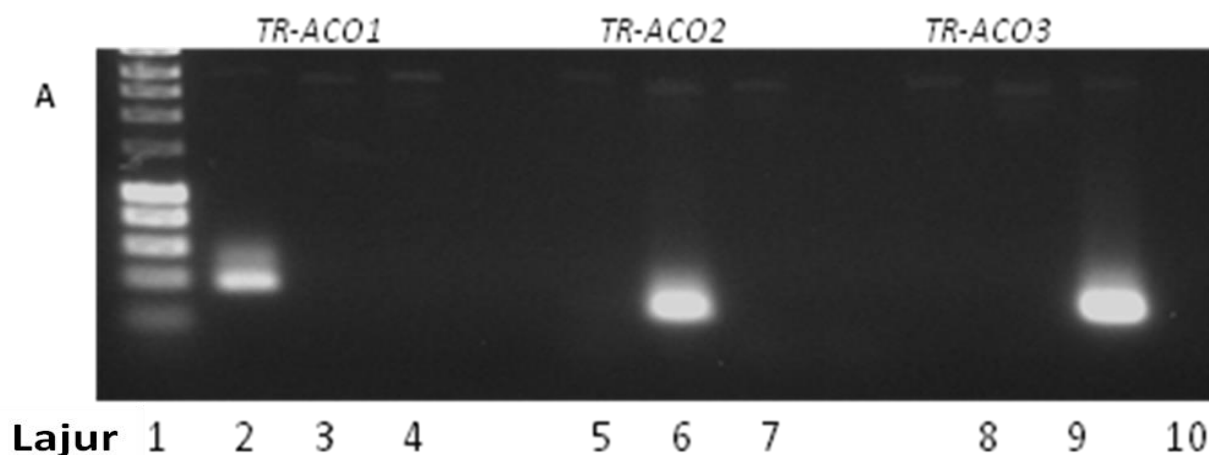
et al., 2002). Tingkat akumulasi prolin dilaporkan bervariasi tergantung spesies tanaman dan tingkat cekaman air yang dialaminya. Sebagaimana besar hasil penelitian menunjukkan bahwa akumulasi prolin yang berhubungan dengan *osmotic adjustment* terjadi secara bertahap seiring dengan penurunan KAT (Chaitanya *et al.*, 2009). Dalam penelitian ini, konsentrasi prolin tidak meningkat secara bertahap tapi meningkat secara drastis (600%) dan hanya terjadi pada saat pertumbuhan petiole terhenti (Gambar 3). Hasil serupa telah dilaporkan sebelumnya, dan akumulasi prolin yang tiba-tiba ini merupakan indikasi dari kerusakan membran sel (stress-injury) (Iannucci *et al.*, 2002).

Spesifisitas Primer dan Probe yang Digunakan

Analisa ekspresi gen *TR-ACO1*, *TR-ACO2* dan *TR-ACO3* dilakukan secara semi quantitative RT-PCR, yaitu RT-PCR diikuti visualisasi setelah diinkubasikan pada ethidium bromide (EtBr). Sebelum digunakan dalam analisa ekspresi gen tersebut, terlebih dahulu spesifisitas tiap pasang primer dan probe diuji dan hasil pengujian menunjukkan bahwa setiap pasangan primer yang digunakan secara spesifik hanya mengamplifikasi sekuen targetnya (Gambar 4).



Gambar 3. Konsentrasi prolin pada daun pertama Kopu pada berbagai kadar air tanah



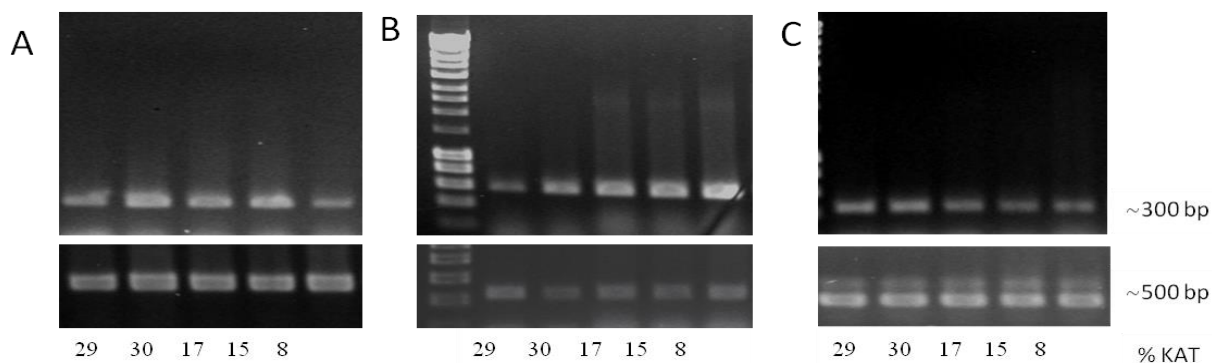
Gambar 4. Spesifisitas primer *TR-ACO1*, *TR-ACO2* dan *TR-ACO3* untuk mengamplifikasi target sekuen-nya. Masing-masing baris menunjukkan hasil PCR dari plasmid yang mengandung reading frame dan 3'UTR dari gen *TR-ACO1*, *TR-ACO2*, dan *TR-ACO3* yang digunakan sebagai template dalam PCR. Tiap baris mengandung produk PCR sebanyak 100 ng yang diamplifikasi dari reading frame dan 3'UTR dari *TR-ACO1* (lajur 2, 5,8), *TR-ACO2* (lajur 3,6,9), dan *TR-ACO3* (lajur 4,7,10)

Sekuen masing-masing primer tersebut digenerasikan berdasarkan sekuen *TR-ACO1*, *TR-ACO2* dan *TR-ACO3* yang diisolasi dari semanggi putih varietas Grassland Challenge (Hunter *et al.*, 1999). Ketiga gen *TR-ACO* tersebut memiliki tingkat kesamaan yang tinggi pada "coding frame regions" nya, akan tetapi memiliki sekuen 3'UTR yang lebih bervariasi (homology kurang dari 40%) (Lampiran 1). Oleh karena itu, tiap primer didisain untuk mengamplifikasi sekitar 100 bp (pada coding region) dan sekitar 200 bp (3'UTR region) dari tiap transcript. Tiap pasangan primer tersebut berhasil digunakan untuk mengamplifikasi gene *TR-ACO1*, *TR-ACO2* and *TR-ACO3*. Hal yang sama juga terjadi pada probe yang digunakan dimana tiap probe secara spesifik menghibridasi sekuen target yang diinginkan. Hal ini menunjukkan tingginya homology diantara keluarga gen *TR-ACO* pada semanggi putih.

Ekspresi *TR-ACO1*, *TR-ACO2* dan *TR-ACO3*

Perubahan ekspresi gen *TR-ACO1*, *TR-ACO2* dan *TR-ACO3* diamati pada dua jaringan yang berbeda. Ekspresi *TR-ACO1* dianalisa pada jaringan pucuk apikal sedangkan ekspresi *TR-ACO2*

dan *TR-ACO3* diamati pada jaringan daun pertama. Hal ini dilakukan berdasarkan hasil penelitian terdahulu yang menunjukkan bahwa dalam kondisi pertumbuhan optimal, *TR-ACO1* secara spesifik terekspresi di pucuk sedangkan *TR-ACO2* terekspresi di daun (Hunter *et al.*, 1999; Chen and McManus, 2006). Pada penelitian ini, analisa ekspresi gen *TR-ACO1* dengan teknik semi-quantitative RT-PCR menunjukkan bahwa ekspresi gen *TR-ACO1* dipengaruhi oleh kondisi cekaman air, dimana cekaman air pada KAT 8% menurunkan ekspresinya (Gambar 5A- atas). Berbeda dengan *TR-ACO1*, ekspresi *TR-ACO2* pada daun pertama justru meningkat mengikuti penurunan KAT (Gambar 5B- atas), sedangkan ekspresi gen *TR-ACO3* hampir tidak dipengaruhi oleh kondisi cekaman air (Gambar 5C-atas). Untuk meyakinkan bahwa ekspresi tersebut tidak disebabkan oleh perbedaan jumlah cDNA yang digunakan dalam tiap reaksi PCR, maka ekspresi gen β -actin juga diamati dan digunakan sebagai internal kontrol pada tiap reaksi. Hasil analisis menunjukkan bahwa ekspresi gen β -actin serupa pada tiap-tiap analisis (Gambar 5A,B dan C – bawah), dengan demikian perbedaan ekspresi gen *TR-ACO1*, *TR-ACO2* dan *TR-ACO3* bukanlah disebabkan karena perbedaan jumlah cDNA yang digunakan dalam tiap reaksi.

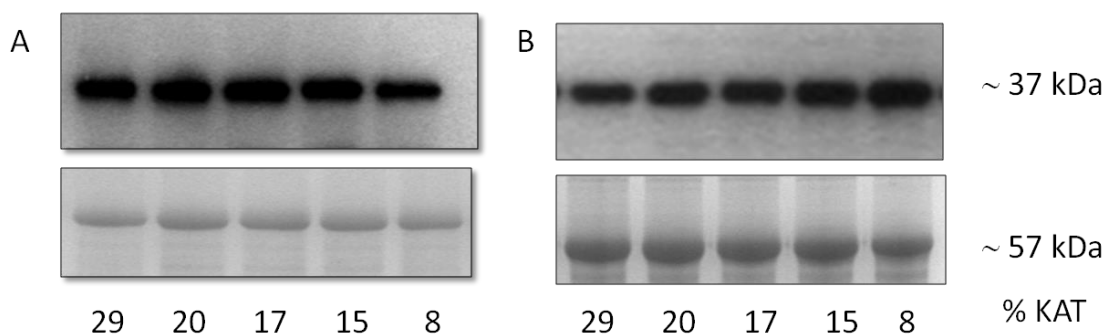


Gambar 5. Ekspresi gen *TR-ACO1* (A), *TR-ACO2* (B) dan *TR-ACO3* (C) pada kadar air tanah yang berbeda (atas) selama perlakuan. Gambar bawah menunjukkan ekspresi β -actin dari sampel yang sama yang menunjukkan perbedaan ekspresi gen tersebut tidak disebabkan karena perbedaan jumlah cDNA yang digunakan dalam reaksi

Akumulasi Protein TR-ACO1 dan TR-ACO2

Analisis akumulasi TR-ACO1 dan TR-ACO2 dilakukan menggunakan metode SDS-PAGE yang diikuti dengan western blot. Seperti halnya ekspresi gen, akumulasi TR-ACO1 diamati pada jaringan pucuk apikal sedangkan akumulasi TR-ACO2 diamati pada daun pertama. Akumulasi TR-ACO3 tidak diamati, karena hanya dua antibody yang tersedia untuk digunakan, yaitu anti-TR-ACO1 dan anti-TR-ACO2. Antibodi yang digunakan dalam penelitian ini adalah antibody yang diproduksi dari protein rekombinasi TR-ACO1 dan TR-ACO2 yang dihasilkan dari semanggi putih genotype 10-F, cultivar Grassland Challenge (Hunter *et al.*, 1999). Anti-TR-ACO1 dan anti-TR-ACO2 yang digunakan mendeteksi keberadaan protein TR-ACO1 dan TR-ACO2 pada cv. Kopu dengan ukuran protein sekitar 37 kDa (Gambar 6), yaitu serupa dengan yang dilaporkan oleh Hunter *et al.*, (1999). Hasil tersebut menunjukkan tingginya homology diantara protein TR-ACO1 dan TR-ACO2 diantara varieties semanggi putih.

Analisa akumulasi protein TR-ACO1 dan TR-ACO2 dengan western blot lebih lanjut menunjukkan bahwa akumulasi protein TR-ACO1 dan TR-ACO2 dipengaruhi oleh kondisi cekaman air, dimana akumulasi protein TR-ACO1 tidak banyak berubah pada KAT di atas 15%. Apabila kondisi cekaman air berlanjut, akumulasi protein TR-ACO1 menurun dan penurunan tersebut terlihat lebih signifikan pada KAT 8 % yaitu pada saat LPP terhenti (Gambar 6A, atas). Berbeda dengan TR-ACO1, akumulasi protein TR-ACO2 justru berbanding terbalik dengan KAT dan peningkatan akumulasi protein ini juga terlihat lebih signifikan pada saat LPP terhenti, yaitu pada kondisi KAT 8% (Gambar 6B, atas). Pada analisa ini, selain western blot, diamati juga total protein pada gel yang diwarnai dengan Comassie Brilliant Blue (CBB) untuk menunjukkan bahwa jumlah total protein yang digunakan pada tiap reaksi tidak berbeda secara signifikan (Gambar 6A dan 6B, bawah). Dengan perbandingan tersebut dapat ditunjukkan bahwa perubahan akumulasi TR-ACO1 dan TR-ACO2 tersebut disebabkan oleh perlakuan cekaman air, dan bukan disebabkan karena perbedaan jumlah protein yang digunakan pada tiap sampel.



Gambar 6. Analisa wester blot yang menunjukkan akumulasi protein TR-ACO1 pada jaringan pucuk apical (A, atas) dan TR-ACO2 pada daun pertama (B, atas). Sebagai internal kontrol diamati juga pewarnaan total protein dengan CBB (A dan B, bawah) dari protein sampel yang sama.

Secara keseluruhan, laju pertumbuhan petiole, akumulasi prolin, analisa ekspresi gen *TR-ACO1*, *TR-ACO2* dan *TR-ACO3* serta akumulasi protein TR-ACO1 dan TR-ACO2 menunjukkan pola serupa yaitu perubahan pada parameter-parameter tersebut terjadi pada saat pertumbuhan petiole pada daun pertama terhenti. *TR-ACO1* dilaporkan sebagai gen yang secara khusus terekspresi pada sel-sel meristematis dan ekspresinya hampir tidak terdeteksi pada jaringan dewasa (Hunter *et al.*, 1999; Chen and McManus, 2006). Menurunnya ekspresi gen *TR-ACO1* dan protein TR-ACO1 pada jaringan apikal dalam kondisi cekaman air (KAT 8%) mengindikasikan berkurangnya aktifitas jaringan meristematis pada pucuk apikal semanggi putih cv. Kopu. Lebih lanjut, hal ini mengindikasikan kepekaan cv Kopu pada cekaman air karena tanaman yang tahan umumnya beradaptasi dengan cara melindungi jaringan-jaringan muda agar tetap aktif (Rossie *et al.*, 2009), hal ini memungkinkan tanaman tetap hidup sampai air kembali tersedia. Dalam hal ekspresi gen *TR-ACO2* dan protein TR-ACO2 dapat terlihat ekspresi dan akumulasi yang justru meningkat pada saat petiole telah berhenti tumbuh. Hal ini juga mengindikasikan kondisi jaringan daun yang berada dalam kondisi stress (*stress injury*), dan hasil ini juga didukung oleh analisa konsentrasi prolin seperti yang telah dibahas sebelumnya. Dengan demikian, semua parameter yang diamati mendukung hasil terdahulu yang menunjukkan kepekaan tanaman semanggi putih cv. Kopu terhadap cekaman air. Analisa lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui apakah perubahan ekspresi gen dan akumulasi protein TR-ACO1 yang dilaporkan disini dan TR-ACS1 seperti dilaporkan sebelumnya (Nikmatullah, 2009b) juga diikuti oleh perubahan aktifitas enzim - enzim tersebut dalam

memproduksi ethylene. Lebih lanjut, perbandingannya dengan tanaman yang tahan serta analisa permeabilitas membran akan sangat berguna untuk memahami lebih dalam hubungan biosintesa ethylene dengan respon tanaman terhadap cekaman air.

KESIMPULAN

Cekaman air menurunkan kadar air tanah dan potensial air daun tanaman semanggi putih cv. Kopu. Hal tersebut menurunkan laju pertumbuhan petiole, yang mulai terjadi pada kondisi kadar air tanah di bawah 17 % atau potensial air daun di bawah -1,2 MPa. Pada kadar air tanah dan potensial air daun tersebut, ekspresi gen dan akumulasi protein TR-ACO1 di pucuk mulai menurun sedangkan ekspresi gen dan akumulasi protein di daun pertama mulai meningkat. Hal ini terjadi sampai pertumbuhan petiolenya terhenti. Lebih lanjut hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi prolin tidak banyak berubah sebelum pertumbuhan terhenti, akan tetapi konsentrasi prolin meningkat drastis (6 kali lipat) pada saat pertumbuhan terhenti, yaitu pada kadar air tanah 8% dan potensial air daun mencapai -1,9 MPa.

DAFTAR PUSTAKA

- Achard, P, H. Cheng, L.D.Gwauwe, J. Decat, H. Schouteten, T.Moritz T, D.V.D. Straeten, J. Peng and N.P. Harberd, 2006. Integration of plant responses to environmentally activated signals. *Science*, 311: 91 – 94.
- Bleecker, A.B. and H. Kende H, 2000. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16: 1-18.

- Chaitanya, K. V., G.K. Rasineni, and A.R. Reddy, 2009. Biochemical responses to drought stress in mulberry (*Morus alba* L.): evaluation of proline, glycine betaine and abscisic acid accumulation in five cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31: 437-443
- Chang, S.H., L.S. Lu, N.N. Wang and Y.Y. Chang, 2008. Negative feedback regulation of system-1 ethylene production by the tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 6 gene promoter. *Plant Science*, 175: 149-160
- Chaves, M.M., J. Flexas and C. Pinheiro, 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103: 551-560
- Chaves, M.M., J.P. Marocco and J.S. Pereira, 2003. Understanding plant response to drought – from genes to whole plant. *Functional Plant Biology*, 30: 239-264.
- Chen, B.C.M. and M.T. McManus MT, 2006. Expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase genes during the development of vegetative tissues in white clover (*Trifolium repens* L.) is regulated by ontological cues. *Plant Molecular Biology*, 60: 451-467.
- Gabriele, K. and H. Bernd, 2006. Effect of water stress on proline accumulation of genetically modified potatoes (*Solanum tuberosum* L.) generating fructans. *Journal of Plant Physiology*, 163: 392-397.
- Gallie, D.R., J. Geisler-Lee, J.F. Chen and B. Jolley, 2009. Tissue-specific expression of the ethylene biosynthetic machinery regulates root growth in maize. *Plant Molecular Biology*, 69:195-211.
- Hunter, D.A. and M.S. Reid, 2001. A simple and rapid method for isolating high quality RNA from flower petals. *Acta Horticulturae*, 543: 147-152.
- Hunter, D.A., S.D. Yoo, S.M. Bucher and M.T. McManus, 1999. Expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase during leaf ontogeny in white clover. *Plant Physiology*, 120: 131-142.
- Iannucci, A., M. Russo, L. Arena, N. Di Fonzo, P. Martiniello, 2002. Water deficit effects on osmotic adjustment and solute accumulation in leaves of annual clovers. *European Journal of Agronomy*, 16: 111–122
- Joo, S., Y. Liu, A. Lueth and S. Zhang, 2008. MAPK Phosphorylation-induced stabilization of ACS6 protein is mediated by non-catalytic-C-terminal domain, which also contains the *cis*-determinant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway. *The Plant Journal*, 54: 129-140.
- Kim, T.H., B.R. Lee, W.J. Jung, K.Y. Kim, J.C. Avice and A. Ourry, 2004. *De novo* protein synthesis in relation to ammonia and proline in a water-stressed white clover. *Functional Plant Biology*, 31: 847-855.
- Kramer, P.J., 1983. Problems in water relations of plants and cells. *International Review of Cytology – A Survey of Cell Biology*, 85: 253 – 286.
- Liu, Y. and S. Zhang, 2004. Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen activated protein kinase, induced ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16: 3386-3399.
- Magna, C. and F. Larher, 1984. High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Analytical Biochemistry*, 200: 115-118.
- McManus, M.T., R.L. Bielecki, J.R. Caradus and D.J. Barker, 2000. Pinitol accumulation in mature leaves of white clover in response to a water deficit. *Environmental and Experimental Botany*, 43: 11-18.
- Neumann, P.M., 1995. The role of cell-wall adjustment in plant-resistance to water deficits. *Crop Science*, 35: 1258-1266.
- Nikmatullah, A., 2009a. Regulation of ethylene biosynthesis in vegetative tissues of white clover during water deficit. *Ph.D. Thesis*. Institute of Molecular BioSciences, Massey University, New Zealand. 212 p.
- Nikmatullah, A., 2009b. Response of three white clover (*Trifolium repens* L.) varieties to water deficit. Agroteksos, Agustus.
- Potters, G., T.P. Pasternak, Y. Guisez and M.A.K. Jansen, 2009. Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant Cell and Environment*, 32: 158-169.

- Quist, T.M., I. Sokolchik, H.Z. Shi, R.J. Joly, R.A. Bressan, A. Maggio, M. Narsimhan and X. Li, 2009. HOS3, an ELO-like gene, inhibits effects of ABA and implicates a S-1-P/Ceramide control system for abiotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, 2: 138-151.
- Rossi, S., S. Simard, C.B.K Rathgeber, A. Deslauriers and C. D. Zan, 2009. Effect of a 20-day-long dry period on cambial and apical meristem growth in *Abies balsamea* seedlings. *Tree- Structural and Function*, 23 (1): 85-93.
- Schroeder, J.I., J.M. Kwak and G.J. Allen, 2001. Guard cell abscisic acid signaling and engineering drought hardiness in plant. *Nature*, 410: 327-330.
- Tanaka, Y., T. Sano , M. Jamacki, N. Nakajima, N. Kondo and S. Hasezawa, 2005. Ethylene inhibits abscisic-acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 138: 2337-2343.
- Yang, S.F. and N.E. Hoffmann, 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 35: 155-189

LAMPIRAN

Sekuen *TR-ACO1*, *TR-ACO2* dan *TR-ACO3* yang digunakan sebagai dasar penentuan pasangan primer dalam penelitian ini

```

TR-ACO2  ATGGAGAACTTCCAATCATCAACTTAGAAAACCTCAATGGTGAGGAGAGAAAAGCTACC 60
TR-ACO3  ATGATGAACTCCCAATTATCAGCTTGGAGAGACTCAATGGTGTGGAGAGAAAAGATAACC 60
TR-ACO1  ATGGAAAACCTTCCAATTGTTGACATGGGGAAGCTTAACACAGAAGAGAGAAAATCAACC 60
***      ***      ***      *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

TR-ACO2  ATGGAAAAAATCAAGGATGCATGCGAGAATTGGGGCTTCTTTGAGCTGGTGAATCATGGC 120
TR-ACO3  ATGGAGAAAATAAGGATGCATGCCAGAATTGGGGATTCTTTGAGCTGGTGAATCATGGC 120
TR-ACO1  ATGGAGAAGATCAAAGATGCTTGCAGAGAATTGGGGCTTCTTTGAGTTGGTGAACCATGGA 120
*****  **  *  *  *  *  ****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

                (Sebagian sekuen Dieliminasi)

TR-ACO2  GATGGAACAAGAATGTCCATAGCTTCATTCTACAATCCTGGTAGTGATGCTGTTATCTAT 780
TR-ACO3  AATGGAACAAGAATGTCTATAGCATCATTCTACAACCTGGAAGTGATGCTGTAATCTTAC 780
TR-ACO1  GATGGTGCTAGAATGTCTTTAGCTTCATTCTATAATCCAAGTGATGATGCTATCATTCA 780
*****  *  *****  ***  *****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

TR-ACO2  CCAGCAACAACATTGATTGAA-----GAGAATAATGAAGTTTACCCAAAATTT 828
TR-ACO3  CCTGCTCCAGAATTGTTGGAAAAAAGAAACAGAGGAAAAAACCAATGTGTATCCTAAAATTT 840
TR-ACO1  CCAGCACCAACTTTATTGAAGGAAAAAT---GAAACAACAAGTGAAATTTATCCAAAATTT 837
**  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

TR-ACO2  GTTTTGAAGATTACATGAATCTTTATGCTGGATTAAGTTTCAAGCTAAAGAACCAAGA 888
TR-ACO3  GTGTTTGAAGAGTACATGAAGATCTATGCTGCTTTGAAATTTCAAGCTAAGGAACCAAGA 900
TR-ACO1  GTGTTTGAATGATTACATGAACTCTATATGGGATTAAGTTTCAAGCTAAGGAGCCCTAGA 897
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

TR-ACO2  TTTGAAGC---ATTTAAGGAATCATCAAATGTTAAACTTGGTCCAATTGCAACAGTTT-943
TR-ACO3  TTTGAAGC---ACTGAAAG---CATGAAATGTGAATTTGGGTTCAATTGCAATTGTTTTG 954
TR-ACO1  TTTGAAGCTATGATGAAAGCAATGTCAAGTGTGATGTGGGACCAGTAGTAAGCATATGA 957
*****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

TR-ACO2  AATT---ATGTGTACTATAAATAAATAAATAAATAAATAT-----AAAT--ATATGTTA 991
TR-ACO3  AATTTAAACAAGTAACATAAAATAGGCAAAAGATGCATGTGCTCCTCAAATGAAAATAATA 1014
TR-ACO1  AA---AAAGCATATTATTAGATTGATTATGTGTGGTTTGTTAATAAGCTGAGTTTATT 1013
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

TR-ACO2  ACATGTTTGGTTAAGTG-GAAGCAA-GCAAAGTAAAAAAA--AGCTAAAGTCAAGTGC 1046
TR-ACO3  AAAAAATAGATTTAAATATGATGCGA-GTCATGCAAATATATTATGTGTTAGTTTTGTAA 1073
TR-ACO1  AAGCGATTATTAGTGTGGTTGGTGTATTATTATAATTGGTATGACTTATGA 1073
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

TR-ACO2  ATAAGTTTCT--CAAATTAGTATGTAGTTGTTTACTTACTATATAGTGAGTGATGTGATG 1104
TR-ACO3  GTTTATTTTTTAAATAGATAAACGAAATGTGTGTTAATAACAAATTCACAGTAAATTGAAG 1133
TR-ACO1  G-AGGTAAAGATCATGCAGTCTAAAGGTGTTGTTATTAAAGTTTATAATAAAGTATGAT- 1131
**      *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

```

TR-ACO2   TGATT----TTCTTGATTATTTGTGGAA--AAAGTAATATC-----AA----- 1142
TR-ACO3   GGATTAGAGTTCGAACATCGGTTATGGTGTGTCAGACTCATTGGCTTTGTAA----- 1185
TR-ACO1   TAATGGTTGATTTAGATTGGGTGTGATGACTGATTAGTGTGTTGTTGTTGGAAGATTAAC 1191
          **      *      **      * **      * * * *      *
TR-ACO2   TGTTC AATAATAA--TAAATATA---TTATTCAAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-- 1192
TR-ACO3   TTTTCTTTTTTTTTTGCTTGAGTTCAAC-TCGTATAAATTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-- 1242
TR-ACO1   TGGTAAATTAAGTTATTGAAATGTGATGTAATACTGTTTATAAAACCAAAAAAAAAAAAA 1251
          * * * *      * *      * *      * * * * * * * * * *
TR-ACO2   ----
TR-ACO3   ----
TR-ACO1   AAAA 1255

```

(*) sekuen yang sama, dan (-) menunjukkan tidak ada sekuen, Stop Codon diketik tebal- cetak miring- dan-garis dibawah. Sekuen yang spesifik untuk tiap gen dicetak tebal dan digaris bawah.

No akses pada GeneBank (NCBI) untuk *TR-ACO1* adalah AF115261.2

No akses pada GeneBank (NCBI) untuk *TR-ACO2* adalah AF115262.2

No akses pada GeneBank (NCBI) untuk *TR-ACO3* adalah AF115263.2