

**Isolasi dan Pengklonan Fragmen cDNA Gen Penyandi H<sup>+</sup>-ATPase Membran Plasma dari *Melastoma malabathricum* L.**

***Isolation and Cloning of cDNA Fragment of the Gene Encoding for Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase from Melastoma malabathricum L.***

Muzuni<sup>1</sup>, Didy Sopandie<sup>2</sup>, Utut Widyastuti Suharsono<sup>1,3</sup>, dan Suharsono<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University), Jl. Kamper Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia.

<sup>2</sup>Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University), Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia.

<sup>3</sup>Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University), Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

Diterima 24 November 2009 /Disetujui 23 Februari 2010

**ABSTRACT**

*Melastoma malabathricum* L. grows well in acid soil with high level of soluble aluminum. One of the important proteins in the detoxifying acid and aluminum stress is a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase protein encoded by *PMA* gene. The objective of this research was to isolate and clone the cDNA fragment of *MmPMA* encoding plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from *M. malabathricum* L. By reverse transcription, total cDNA had been synthesized from the total RNA as template. The fragment of *MmPMA* cDNA had been successfully isolated by PCR by using total cDNA as template and *PMA* primer designed from conserved region for corresponding gene. This fragment had been successfully inserted into *pGEM-T Easy* and the recombinant plasmid was successfully introduced into *E. coli* DH5a. Nucleotide sequence analysis showed that the length of *MmPMA* fragment is 806 bp encoding 268 amino acids. Local alignment analysis based on nucleotide of mRNA showed that *MmPMA* fragment was 81% identical to part of *PMA* of *Sesbania rostrata*, *Juglans regia*, and *Prunus persica*. Based on deduced amino acid sequence, *MmPMA* was 94% identical to part of *PMA* of *Juglans regia*; 93% to *PMA* of *S. rostrata*, and *Arabidopsis thaliana*. *MmPMA* fragment has phosphorylation intermediate domain (DKTGT) and ATP binding domain (KGAP, DPPR, MITGD, and GDGVN).

Keywords: isolation, *Melastoma malabathricum* L., *MmPMA* fragment, sequencing

**PENDAHULUAN**

Lahan asam dengan kandungan aluminium (Al) tinggi tersebar luas di Indonesia. Lahan ini mempunyai potensi yang sangat besar untuk meningkatkan produksi pertanian. Akan tetapi, kebanyakan tanaman tidak dapat tumbuh optimal pada kondisi lahan asam dengan kelarutan Al yang tinggi karena proses pembelahan dan pemanjangan sel terganggu sehingga akar tanaman menjadi pendek dan menebal khususnya pada akar utama (Prihadi *et al.*, 1995). Akibatnya, pertumbuhan dan perkembangan akar terhambat, dan dalam jangka panjang akan mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan bagian tajuk tanaman. Namun demikian, ada beberapa tumbuhan dapat tumbuh dengan baik pada tanah asam sehingga menjadi indikator tanah asam, dan dapat mengakumulasi aluminium dalam jumlah tinggi pada daun dan akar sehingga disebut sebagai akumulator Al (Watanabe *et al.*, 2001; Watanabe and Osaki, 2002). Pertumbuhan akar *Melastoma malabathricum* L pada

pH 4.0 tidak terganggu, kecuali pada pH 3.0 yang hanya ada di laboratorium (Muhaemin, 2008). Menurut Watanabe *et al.* (2003), *M. malabathricum* L. mampu mengakumulasi lebih dari 10 000 mg Al (kg daun tua)<sup>-1</sup> dan lebih dari 7 000 mg Al (kg daun muda)<sup>-1</sup> tanpa mengalami keracunan. Analisis akumulasi Al pada *M. affine* D. Don. (sinonim dengan *M. malabathricum* L.) yang mendapat cekaman 3.2 mM Al pada pH 4 dalam media cair menunjukkan bahwa *M. affine* D. Don. mampu mengakumulasi 8.81 mg Al (g daun tua)<sup>-1</sup> setelah 2 bulan perlakuan (Mutiasari, 2008).

Tumbuhan *M. malabathricum* L. diduga mempunyai sistem detoksifikasi Al sehingga *Melastoma* dapat digunakan sebagai sumber gen untuk toleransi tanaman terhadap tanah asam dan Al tinggi. Salah satu gen yang terlibat dalam toleransi tanaman terhadap tanah asam dan Al tinggi adalah gen penyandi H<sup>+</sup>-ATPase membran plasma (Anwar, 1999; Ahn *et al.*, 2004). H<sup>+</sup>-ATPase membran plasma merupakan protein yang paling melimpah pada membran plasma dan terlibat dalam banyak respons cekaman. Protein ini mengaktifasi serangkaian transporter sekunder dengan menghasilkan *proton motive force* yang dapat menggerakkan banyak solut, asimilat, atau metabolit

\* Penulis untuk korespondensi. e-mail : sony.suharsono@yahoo.com

melintasi membran plasma (Sussman, 1994). Protein ini terlibat pula dalam homeostasis pH sitoplasma tanaman (Young *et al.*, 1998).

Beberapa kajian tentang ekofisiologi adaptasi *Melastoma* pada tanah asam dengan kelarutan Al yang tinggi telah dilakukan (Osaki *et al.*, 1998; Watanabe dan Osaki, 2002), sedangkan kajian secara molekuler telah dilakukan dengan mengisolasi dan mengkarakterisasi gen-gen yang terlibat dalam toleransi Al dan asam, antara lain *multidrug resistance associated protein* (MRP) (Suharsono *et al.*, 2008), dan *metallothionein type 2* (*Mt2*) (Suharsono *et al.*, 2009). Namun sampai saat ini belum ada informasi tentang gen penyandi H<sup>+</sup>-ATPase membran plasma dari *Melastoma* yang diduga juga terlibat dalam toleransi terhadap cekaman asam dan Al. Gen ini merupakan gen yang berukuran besar, yaitu sekitar 3 500 pb (pasang basa) termasuk 3' dan 5' *untranslated region* (UTR) sehingga sangat sulit untuk diisolasi. Oleh karena itu, isolasi fragmen *MmPMA* perlu dilakukan yang nantinya akan digunakan selain untuk mendesain primer spesifik dalam mengisolasi gen utuh (*full length gene*), juga untuk menguji tingkat ekspresinya pada tanaman. Dalam penelitian ini, fragmen gen penyandi H<sup>+</sup>-ATPase membran plasma (*partial length*) telah diisolasi dari *M. malabathricum* L. melalui transkripsi balik yang diikuti PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan menggunakan primer spesifik.

Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi dan mengklon fragmen cDNA *MmPMA* yang menyandi protein H<sup>+</sup>-ATPase membran plasma dari *Melastoma malabathricum* L.

## BAHAN DAN METODE

Bahan tanaman yang digunakan adalah daun tumbuhan *M. malabathricum* L. yang tumbuh di lahan asam Jasinga, Bogor, Jawa Barat. Primer spesifik untuk mengisolasi fragmen gen penyandi H<sup>+</sup>-ATPase membran plasma *forward* (AF2) 5'GATGTCCTTTGCAGTGAYAARAC3' dan *reverse* (AR2) 5'TCATTGACACCATCWCWGT CAT3' didesain dari masing-masing sekuen asam amino DVLCSDKT dan MTGDGVND yang terkonservasi pada semua kation-ATPase dari membran plasma (Serrano, 1989). Kedua sekuen asam amino ini masing-masing merupakan bagian dari domain fosforilasi dan pengikatan ATP. Primer aktin *ActF* (5'-ATGGCAGATGCCGAGGATAT-3') dan *ActR* (5'-CAGTTGTGCGACCACTTGCA-3') digunakan sebagai alat evaluasi cDNA total. Plasmid pGEM-T Easy (3 015 pb) (Promega) digunakan sebagai vektor pengklonan. *E. coli* DH5 $\alpha$  digunakan sebagai inang dari plasmid rekombinan.

### Isolasi RNA Total

Isolasi RNA mengikuti metode LiCl yang dimodifikasi (Suharsono *et al.*, 2008).

### Isolasi Fragmen cDNA *MmPMA* dengan RT-PCR

Sintesis cDNA spesifik dilakukan melalui dua tahap, yaitu transkripsi balik (*reverse transcription*,

RT) menggunakan *SuperScript II RT* (Invitrogen) untuk mensintesis cDNA dan PCR untuk amplifikasi fragmen cDNA *MmPMA*. RT dilakukan dengan mengikuti prosedur dari Invitrogen Life Technologies. Kemurnian cDNA diketahui melalui PCR dengan menggunakan primer spesifik untuk cDNA exon1-exon2 dari  $\beta$ -aktin dengan komposisi 1  $\mu$ l cDNA, 1x taq buffer, 0.2 mM dNTP mix, 0.5  $\mu$ M primer *ActF*, 0.5  $\mu$ M primer *ActR*, 4% DMSO, 1.25 U taq DNA polymerase (RBC Bioscience) dan H<sub>2</sub>O hingga mencapai volume akhir 20  $\mu$ l. Campuran direaksikan dengan kondisi pra-PCR 94 °C, 5 menit; denaturasi 94 °C, 30 detik; penempelan primer 55 °C, 30 detik; pemanjangan 72 °C, 1.5 menit dan pasca-PCR 72 °C, 5 menit. PCR dilakukan sebanyak 35 siklus.

Fragmen cDNA *MmPMA* diperoleh dengan melakukan PCR terhadap cDNA menggunakan primer spesifik AF2 dan AR2. Campuran reaksi PCR yang digunakan adalah 1  $\mu$ l cDNA, 1 x buffer taq, 0.2 mM dNTP mix, 0.5  $\mu$ M primer AF2, 0.5  $\mu$ M primer AR2, 4% DMSO, 1.25 U taq DNA polymerase (RBC Bioscience) dan H<sub>2</sub>O hingga volume akhir 20  $\mu$ l. PCR dilakukan sebanyak 35 siklus dengan kondisi pra-PCR 94 °C, 5 menit; denaturasi 94 °C, 30 detik; penempelan primer 56 °C, 30 detik; pemanjangan 72 °C, 1.5 menit, dan pasca-PCR 72 °C, 5 menit.

### Pengklonan cDNA ke dalam Vektor

Potongan cDNA yang dihasilkan dari PCR selanjutnya disisipkan ke dalam vektor pGEM-T Easy (Promega) mengikuti prosedur dari Promega.

### Transformasi Vektor Rekombinan ke Dalam *E. coli* DH5 $\alpha$

pGEM-T Easy rekombinan diintroduksi ke dalam *E. coli* DH5 $\alpha$  mengikuti prosedur Suharsono (2002). Bakteri transforman dapat hidup pada media yang mengandung antibiotik ampicilin. Adanya X-gal dan IPTG dalam media LB padat akan menghasilkan koloni bakteri yang berwarna biru dan putih. Hanya koloni berwarna putih yang diisolasi karena di dalamnya mengandung plasmid rekombinan. Sebelum plasmid diisolasi, terlebih dahulu PCR dilakukan dengan menggunakan koloni putih sebagai cetakan. Koloni putih dicungkil dengan tusuk gigi steril kemudian disuspensikan ke dalam ddH<sub>2</sub>O dan dipanaskan 95 °C selama 10 menit lalu didinginkan di atas es selama 5 menit. Suspensi ini dicampur dengan 1 x buffer taq, 0.2 mM dNTP, 0.5  $\mu$ M primer AF2, 0.5  $\mu$ M primer AR2, 4% DMSO, 1.25 U taq DNA polymerase (RBC Bioscience) dan H<sub>2</sub>O hingga volume akhir 10  $\mu$ l. PCR dilakukan sebanyak 35 siklus dengan kondisi PCR yang sama dengan PCR isolasi fragmen cDNA *MmPMA*. Koloni putih yang positif, selanjutnya diisolasi plasmidnya untuk dianalisis lebih lanjut.

### Analisis Urutan Nukleotida *MmPMA* dan Protein *MmPMA*

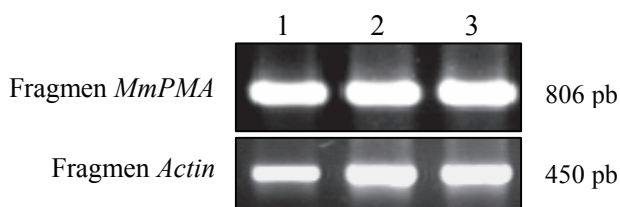
Pengurutan DNA dilakukan dengan menggunakan mesin pengurut DNA otomatis (Automated DNA Sequencer ABI Prism 310, Perkin-Elmer). Identifikasi urutan nukleotida dilakukan dengan beberapa analisis. Analisis

kesejajaran lokal (*local alignment*) *MmPMA* berdasarkan nukleotida dan asam amino dengan data yang ada di *GeneBank* dilakukan dengan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) yang disediakan NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) melalui <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Analisis restriksi dilakukan dengan menggunakan program NEBCutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>). Domain potensial dianalisis dengan program motif scan <http://au.expasy.org/prosite/>. Analisis hidrofobisitas menggunakan fragmen *srha5* (*Sesbania rostrata* H<sup>+</sup>-ATPase) sebagai pembandingan dan dilakukan dengan menggunakan program BioEdit versi 7.0.9.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Sintesis cDNA

cDNA disintesis melalui transkripsi balik dengan menggunakan cetakan (*template*) RNA total dan primer oligo-dT sehingga cDNA yang terbentuk hanya berasal dari mRNA karena hanya mRNA yang mengandung poly(A) pada ujung 3', sedangkan rRNA dan tRNA tidak. PCR dengan menggunakan primer untuk ekson1-ekson2 dari gen aktin menghasilkan DNA yang berukuran sekitar 450 pb (Gambar 1) yang menunjukkan bahwa daerah yang teramplifikasi adalah cDNA ekson1-ekson2 bukan DNA ekson1-ekson2 dari gen aktin. DNA antara ekson1 dan ekson2 berukuran sekitar 640 pb, lebih besar daripada cDNAnya karena mengandung intron yang dibuang pada saat pembentukan mRNA. Teramplifikasinya cDNA dengan primer *ActF* dan *ActR* dengan ukuran 450 pb menunjukkan bahwa sintesis cDNA total melalui proses transkripsi balik telah berlangsung dengan baik. Hal ini juga menunjukkan bahwa RNA total yang telah diisolasi mempunyai kualitas yang sangat bagus yang terbebas dari kontaminasi DNA sehingga dapat digunakan untuk mensintesis cDNA. Oleh sebab itu, cDNA total ini dapat digunakan sebagai bahan untuk mengisolasi fragmen cDNA *MmPMA* dengan PCR. Fragmen ini diperoleh dengan PCR menggunakan cDNA total sebagai cetakan dan pasangan AF2-AR2 sebagai primer spesifik yang menghasilkan fragmen cDNA berukuran sekitar 800 pb, yang selanjutnya disebut sebagai fragmen *MmPMA* (*Melastoma malabathricum Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase*) (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil PCR menggunakan cDNA total sebagai cetakan dan pasangan primer ActF – ActR untuk mendapatkan fragmen aktin yang berukuran 450 pb dan –AF2 – AR2 untuk mendapatkan fragmen *MmPMA*

### Analisis Fragmen *MmPMA*

Umumnya, jumlah basa dan asam amino pada *coding sequence* (cds) gen penyandi H<sup>+</sup>-ATPase membran plasma tanaman adalah berturut-turut 2871 pb dan 956 asam amino. Berdasarkan pengurutan DNA terhadap fragmen *MmPMA*, fragmen tersebut mempunyai 806 pb (Gambar 2) dan menyandi 268 asam amino (Gambar 3). Fragmen ini berada pada bagian tengah dari cds gen penyandi H<sup>+</sup>-ATPase membran plasma tanaman, yaitu pada basa 982-1787 atau pada asam amino 328-595. Analisis kesejajaran lokal berdasarkan urutan nukleotida yang ada dalam bank data gen (*GenBank*) dengan menggunakan program BLASTn menunjukkan bahwa fragmen cDNA *MmPMA* mempunyai kesamaan 81% dengan bagian cds H<sup>+</sup>-ATPase membran plasma *Sesbania rostrata* (AB086374), *Juglans regia* (AY347715), dan *Prunus persica* (AJ271439); 80% dengan bagian cds H<sup>+</sup>-ATPase membran plasma *Arabidopsis thaliana* (AK118088) dan *Daucus carota* (AB177652).

Analisis situs restriksi terhadap fragmen *MmPMA* menunjukkan bahwa kecuali *SacI*, fragmen tersebut tidak mengandung situs restriksi yang terdapat pada situs multi pengklonan (Gambar 4). Fragmen *MmPMA* disisipkan di antara situs *ApaI*, *AatII*, *SphI*, *NcoI*, *BstZI*, *NotI*, *SacII*, *EcoRI* di satu sisi dan *SpeI*, *EcoRI*, *NotI*, *BstZI*, *PstI*, *Sall*, *NdeI*, *SacI*, *BstXI*, *NsiI* di sisi lain sehingga kecuali *SacI*, situs-situs tersebut dapat digunakan untuk mengeluarkan sisipan *MmPMA* dari plasmid rekombinan. Peta situs restriksi sangat penting dalam rekayasa genetika.

Analisis kesejajaran lokal berdasarkan urutan asam amino dengan BLASTp menunjukkan bahwa fragmen *MmPMA* mempunyai kesamaan 94% dengan Cation-transporting ATPase *Juglans regia* (Q6V914); 93% dengan Cation-transporting ATPase *Sesbania rostrata* (Q7Y066) dan *A. thaliana* (Q9SU58); 92% dengan Cation-transporting ATPase *Solanum tuberosum* (Q43182), *L. esculentum* (Q9SPD5), *N. plumbaginifolia* (Q08435) dan *D. carota* (Q75N96). Tingginya persentase kesamaan urutan asam amino antara fragmen *MmPMA* dengan ketujuh PMA tersebut (di atas 90%) menunjukkan bahwa *MmPMA* diduga mempunyai peranan yang sama dengan ketujuh PMA tersebut.

Protein PMA (*Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase*) dapat mengaktivasi serangkaian transporter sekunder dengan menghasilkan *proton motive force* yang dapat menggerakkan banyak solut, asimilat, atau metabolit melintasi membran plasma (Serrano, 1989; Sussman, 1994). Studi terbaru menunjukkan bahwa H<sup>+</sup>-ATPase membran plasma terlibat dalam regulasi respons terhadap berbagai rangsangan lingkungan, antara lain cekaman Al (Anwar, 1999; Ahn, 2004), cekaman NaCl (Niu *et al.*, 1996), defisiensi fosfat (Yan *et al.*, 2002), cekaman ammonium (Jernejc dan Legisa, 2001), terlibat dalam pemanjangan sel yang difasilitasi oleh auksin selama perkembangan embrio gandum (Rober-Kleber *et al.*, 2003), dan terlibat pula dalam homeostasis pH sitoplasma tanaman (Young *et al.*, 1998).

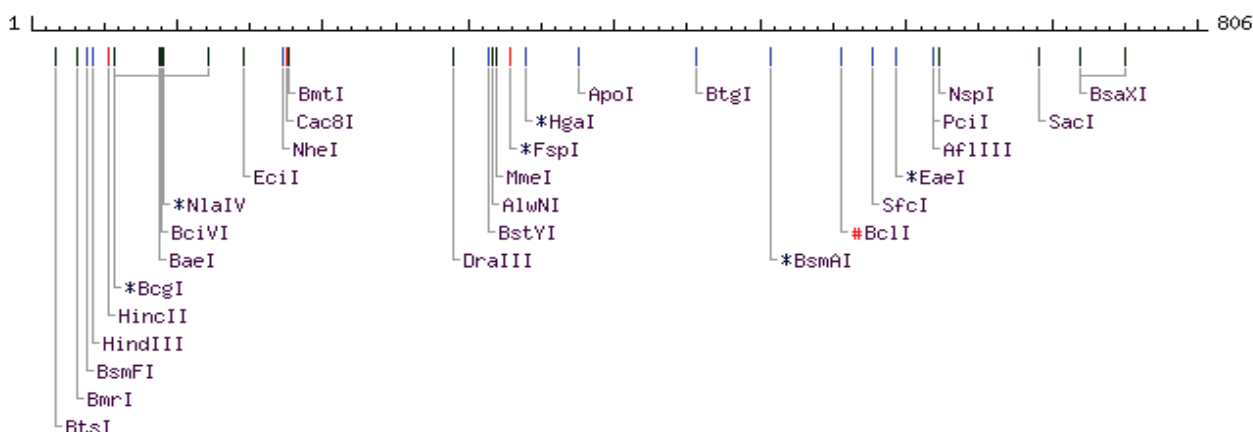
Tanaman *A. thaliana* yang ditransformasi dengan gen H<sup>+</sup>-ATPase membran plasma (*AHA3*) dapat memperbaiki

GATGTCCTTTGCAGTGATAAGACTGGGACTCTGACTTTGAACAAGCTTACTGTTGACAAAAATCTCATCGAGGTCT  
 TTGCGAAAGGAGTGGACCCGGATACTGTTGTCTGATGGCTGCTAGAGCATCGAGGACCGAAAACCAAGATGCCAT  
 AGATTCCGCCATAGTTGGGATGCTAGCTGATCCAAAAGAGGCTCGATCTGGGATTCAGGAAGTACACTTCTTCCC  
 TTTAACCCTACTGACAAGAGGACCGCTTTGACCTACATCGATTCCGAGGGCAGGATGCACAGAGTGAGCAAAGGTG  
 CTCCAGAGCAGATCCTGAACCCTGCGCACAATAAGTCGGAGATTGAGCGTCGAGTCCATGCCGTGATTGATAAATT  
 TGCCGAGCGTGGTCTGCGATCACTTGCAGTAGCGTATCAGGAAGTCCAGAAGGAAGAAAGGAGAGTCTGGAGGG  
 CCGTGGCAGTTCATCGGTCTGATGCCTCTGTTTATCCCGGAGGATGACAGTGCCGAGACAATTAGGAGGGCTC  
 TTAATCTTGGGGTTAATGTCAAAAATGATCACGGGGGATCAATTTGCTATAGGCAAAGAACTGGCCGTGCGTTGGG  
 AATGGGCATAAACATGTACCCTTCTTCTGCTTTATTAGGTCAGAATAAGGATGAATCGATTGCTGCGCTGCCAGTT  
 GATGAGCTCATGAAAAGGCAGATGGCTTTGCTGGTGTTCCTCCCGGAGCATAAGTATGAGATTGTGAAGCGATTAC  
 AAGCAAGGAAGCATATATGTGGCATGACAGGAGATGGTGTCAATGA

Gambar 2. Urutan nukleotida fragmen cDNA *MmPMA*

DVLCSD**DKTGTLT**LNKLTVDKNLIEVFAKGVDPDTVVLMAARASRTENQDAIDSAIVGMLADPKERSGIQEVH  
 FLPFNPTDKRTALTYIDSEGRMHRVSK**KGAP**EQILNPAHNKSEIERRVHAVIDKFAERGLRSLAVAYQEVPEGR  
 KESPGGPWQFIGLMPLFD**DPPR**HDSAETIRRALNLGVNVK**MITGD**QFAIGKETGRRLGMGINMYPSSALLGQNK  
 DESIAALPVDELIEKADGFAGVFP**EHKYEIVKRLQARKHICGMTGDGVN**

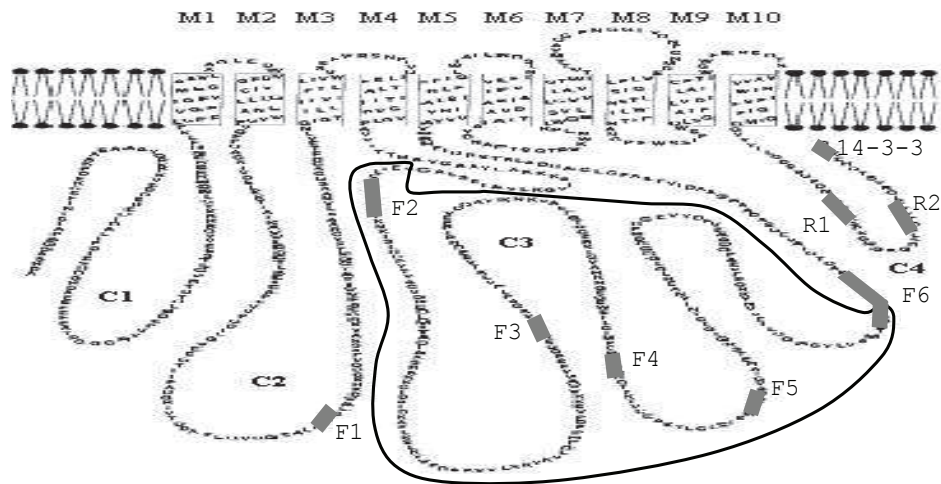
Gambar 3. Deduksi asam amino fragmen *MmPMA*. Urutan asam amino yang digarisbawahi adalah domain fungsional



Gambar 4. Situs pemotongan enzim restriksi endonuklease fragmen *MmPMA*

pertumbuhan pada pH rendah selama perkembangan kecambah (Young *et al.*, 1998). *AHA3* merupakan gen yang tereksresi pada sel-sel kompanion floem, yaitu daerah yang bertanggung jawab dalam pengangkutan jarak jauh dari gula, hara dan hormon. Floem mempunyai pH 8.0 atau lebih sehingga lebih sensitif terhadap pH rendah, akibatnya daerah ini merupakan target utama pH rendah. Ekspresi gen *AHA3* menghasilkan enzim yang dapat memompa H<sup>+</sup> keluar sel sehingga pH sitoplasma dapat dipertahankan. Pengamatan tersebut menunjukkan peranan H<sup>+</sup>-ATPase membran plasma dalam homeostasis pH sitoplasma pada tanaman. Adanya mekanisme seperti ini menunjukkan bahwa H<sup>+</sup>-ATPase membran plasma dapat mengurangi toksisitas Al karena protein ini dapat mempertahankan pH sitoplasma dalam suasana netral sedangkan toksisitas Al hanya dapat terjadi dalam suasana asam atau pH rendah (Vitarello *et al.*, 2005).

Protein PMA membentuk 10 domain transmembran (M1-M10), 4 *loops* dalam sitoplasma (C1-C4), 6 domain fungsional (F1-F6), dan 3 domain autoregulator (R1, R2, dan 14-3-3) seperti ditunjukkan pada Gambar 5. C2 mempunyai sekuen terkonservasi TGES (domain aktivitas fosfatase, F1), pada C3 mempunyai DKTGT(LI)T (domain fosforilasi intermediet dan transduksi, F2), KGAP (domain pengikatan ATP dan/atau aktivitas kinase, F3), DPPR (domain pengikatan ATP, F4), M(LIV)TGD (domain pengikatan ATP, F5) dan GDG(VIT)ND(AS)P(AS)LK (domain pengikatan ATP, F6) (Scarborough, 1996), sedangkan pada C4 mempunyai Region 1 (R1), R2, dan 14-3-3 (domain autoregulator) (Fuglsang *et al.*, 1999). Hasil penyejajaran dengan PMA dari *A. thaliana* menunjukkan bahwa fragmen *MmPMA* merupakan bagian dari loop besar sitoplasma (C3) dan mengandung domain F2 (DKTGTLT), F3 (KGAP), F4 (DPPR), F5 (MITGD), dan sebagian F6 (GDGVN) (Gambar 5, lingkaran). Jadi,



Gambar 5. Model topografi transmembran dan loop sitoplasma dari H<sup>+</sup>-ATPase membran plasma. M1-M10 adalah domain transmembran, C1-C4 adalah loop sitoplasma, F1-F6 adalah domain fungsional (Scarborough, 1996), dan Region 1 (R1), R2, dan 14-3-3 adalah domain autoregulator (Fuglsang *et al.*, 1999). 14-3-3 adalah situs pengikatan protein 14-3-3. Lingkaran hitam adalah fragmen MmPMA

Tabel 1. Hasil penyejajaran sekuen asam amino beberapa domain dari berbagai tipe ATPase

No. akses GenBank	Organisme	Kation transfer	Domain fosforilasi (F2)	Domain pengikatan ATP			
				F3	F4	F5	F6
MmPMA a	<i>M. malabathricum</i>	H <sup>+</sup>	4 CSDKTGTLT	100 KGAPE	164 DPPR	186 MITGD	264 GDGVN
BAC77532	<i>S. rostrata</i>	H <sup>+</sup>	331 CSDKTGTLT	427 KGAPE	491 DPPR	513 MITGD	591 GDGVNDAPALK
AAQ55291	<i>J. regia</i>	H <sup>+</sup>	331 CSDKTGTLT	427 KGAPE	491 DPPR	513 MITGD	591 GDGVNDAPALK
CAB69824	<i>P. persica</i>	H <sup>+</sup>	331 CSDKTGTLT	427 KGAPE	491 DPPR	513 MITGD	591 GDGVNDAPALK
AAA41672	<i>Rattus norvegicus</i>	Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup>	363 CSDKTGTLT	497 KGAPE	582 DPPR	604 MVTGD	705 GDGVNDSPALK
AAA48982	Chicken,α3 subunit	Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup>	361 CSDKTGTLT	495 KGAPE	580 DPPR	602 MVTGD	703 GDGVNDSPALK
CAA34716	Horse	Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup>	372 CSDKTGTLT	506 KGAPE	591 DPPR	613 MVTGD	714 GDGVNDSPALK
AAA48981	Chicken,α2 subunit	Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup>	369 CSDKTGTLT	502 KGAPE	587 DPPR	609 MVTGD	710 GDGVNDSPALK
AAA29207	<i>H. vulgare</i>	Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup>	380 CSDKTGTLT	512 KGAPE	598 DPPR	620 MVTGD	724 GDGVNDSPALK
AAA40779	Rat	H <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup>	386 CSDKTGTLT	520 KGAPE	605 DPPR	627 MVTGD	728 GDGVNDSPALK
CAA33645	Rat	Ca <sup>2+</sup>	349 CSDKTGTLT	514 KGAPE	600 DPPR	622 MITGD	701 GDGVNDAPALK
AAA36456	Human	Ca <sup>2+</sup>	452 CSDKTGTLT	580 KGASE	662 DPVR	684 MVTGD	774 GDGTNDGPALK
CAB96189	<i>A. thaliana</i>	Ca <sup>2+</sup>	480 CSDKTGTLT	598 KGASE	682 DPCR	704 MVTGD	784 GDGTNDAPALH
AAA35580	Human	Cu <sup>2+</sup>	1941 VFDKTGTIT			1252 LMTGD	1300 GDGINDSPALA
AAR10767	<i>A. thaliana</i>	Zn <sup>2+</sup> /Cd <sup>2+</sup>	389 AFDKTGTIT			541 MLTGD	591 GDGLNDAPALA
			*****	*** *	** *	***	*** ** *
			:	:	:	:	:

Keterangan: <sup>a</sup> Belum terdaftar dalam GenBank, \* Terkonservasi pada semua P-Type ATPase, dan : Residu yang terlibat dalam reaksi

fragmen ini mengandung domain fosforilasi intermediet (F2) dan domain pengikatan ATP (F3, F4, F5, dan sebagian F6). Protein PMA mempunyai afinitas yang tinggi terhadap ATP pada saat aktivitasnya rendah. Adanya aktivitas kinase pada domain KGAP (F3) serta reaksi fosforilasi intermediet dan transduksi signal pada domain DKTGTLT (F2) menyebabkan domain autoregulator akan mengalami

fosforilasi dan berinteraksi dengan protein 14-3-3 sehingga H<sup>+</sup>-ATPase membran plasma menjadi aktif. Aktivitas enzim ini akan menurun apabila terjadi defosforilasi melalui aktivitas fosfatase pada domain TGES (F1) (Sze *et al.*, 1999). Pada domain fosforilasi intermediet (DKTGTLT), terjadi pelipatan β yang menempatkan residu aspartat (D) berada pada permukaan protein. Posisi ini sangat menguntungkan

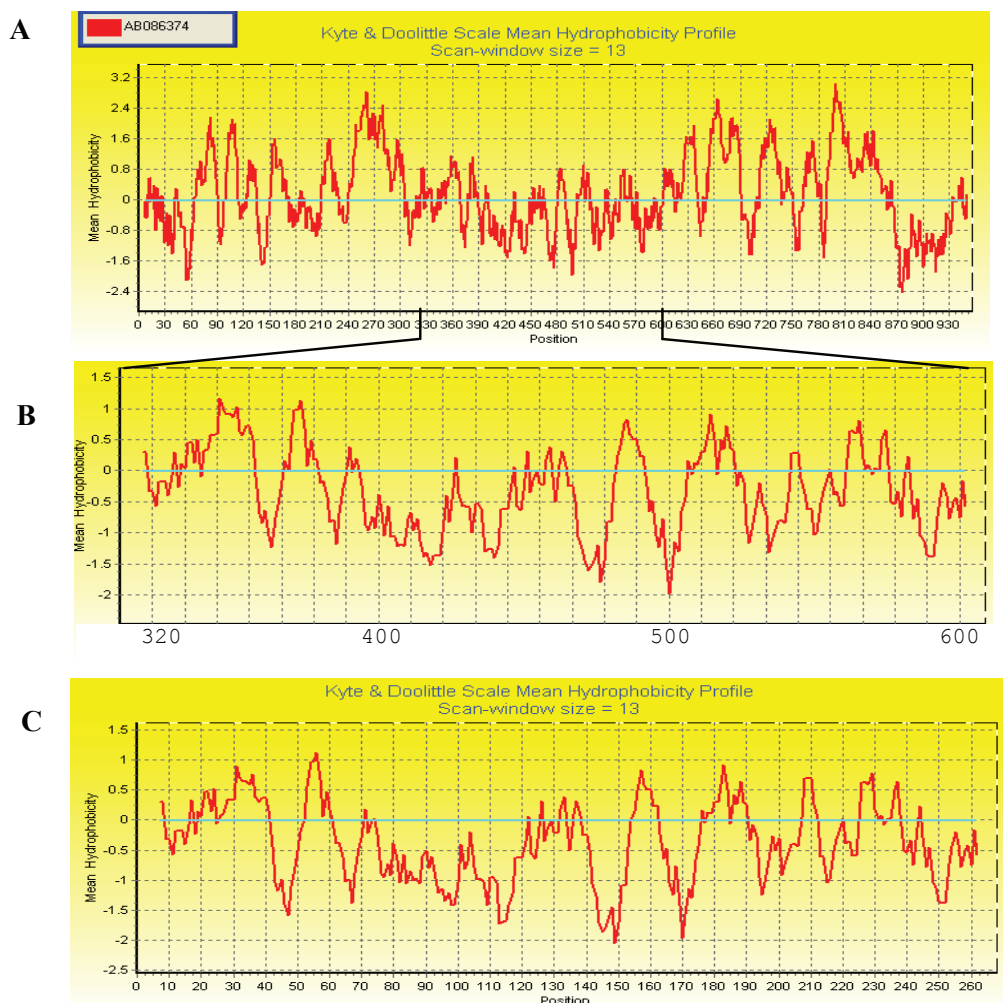
bagi enzim untuk menerima gugus  $\gamma$ -phosphoryl dari ATP dan untuk membentuk  $\beta$ -acyl phosphate intermediate dari siklus reaksi. Bila terjadi mutasi pada residu ini dengan glutamat (E), asparagin (N), atau serin (S) menyebabkan pencegahan terhadap biogenesis ATPase (Rao dan Slayman, 1993). Semua domain di atas berperan dalam pemompaan proton dari sitoplasma ke luar sel sehingga dapat mempertahankan pH sitoplasma, yaitu sekitar 7.5 (Buchanan *et al.*, 2000), sehingga A1 yang hanya terlarut pada pH asam dapat dicegah (Young *et al.*, 1998).

Berdasarkan hasil penyejajaran asam amino pada domain fosforilasi intermediet (F2) dan pengikatan ATP (F3, F4, F5, dan F6) antara MmPMA dengan P-type ATPase lain menunjukkan bahwa semua domain tersebut terkonservasi pada semua P-type ATPase, kecuali pada pompa logam berat tidak mempunyai sekuen terkonservasi KGA(P/S)E (F3) dan DP(P/V/C)R (F4) (Tabel 1). Residu yang terlibat dalam reaksi fosforilasi intermediet untuk semua P-type ATPase adalah Aspartat (D), sedangkan residu yang terlibat dalam pengikatan ATP adalah Lisin (K) pada F3, Aspartat (D) pada F4 dan F5, serta 2 residu Aspartat dan 1 residu Lisin (K) atau Histidin (H) pada F6. Pada F6 pompa logam berat, residu yang terlibat adalah 2 residu aspartat dan 1

residu Alanin (A), suatu asam amino yang tidak bermuatan (Serrano, 1989). Hasil ini menunjukkan bahwa MmPMA kemungkinan mempunyai mekanisme yang sama dengan P-type ATPase lain dalam memompa kation, yaitu antara lain melibatkan reaksi fosforilasi intermediet dan hidrolisis ATP menjadi ADP dan Pi sebagai sumber energi.

Fragmen MmPMA mempunyai kemiripan yang tinggi dengan PMA *Sesbania rostrata*, oleh karena itu, PMA ini dijadikan acuan untuk analisis hidrofobisitas MmPMA. Berdasarkan hasil analisis menunjukkan fragmen MmPMA berada pada daerah hidrofilik. Hal ini ditunjukkan oleh adanya sebagian besar dari kurva profil hidrofobisitas *Kyte and Doolittle* untuk fragmen MmPMA berada pada daerah di bawah 0 (Gambar 6). Hal ini sesuai dengan hasil penyejajaran asam amino MmPMA dengan PMA lain seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5 (lingkaran) di atas, dimana MmPMA berada pada daerah C3 yaitu daerah loop terbesar sitoplasma.

Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar untuk mendesain primer spesifik dalam mengisolasi gen ini secara utuh dan dapat pula digunakan untuk menguji ekspresinya di dalam tanaman.



Gambar 6. Profil hidrofobisitas PMA *Sesbania rostrata*, srha5 (A), fragmen PMA *Sesbania rostrata* (B) dan fragmen MmPMA (C)

## KESIMPULAN

Fragmen cDNA *PMA* dari *M. malabathricum* L. (*MmPMA*) yang berhasil diisolasi berukuran 806 pb dan memiliki kesamaan yang tinggi dengan *PMA* dari *Sesbania rostrata* (*SrPMA*). Berdasarkan deduksi asam amino, *MmPMA* mempunyai kesamaan dengan daerah *loops* sitoplasma ke-3 (C3) yang mengandung domain fosforilasi intermediet (F2) dan domain pengikatan ATP (F3, F4, F5, dan sebagian F6). Domain ini sangat penting dalam aktivitas enzim PMA karena adanya aktivitas kinase serta reaksi fosforilasi intermediet dan transduksi signal sehingga domain autoregulator terfosforilasi dan menyebabkan enzim menjadi aktif.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Hibah Kompetensi dengan judul: Isolasi dan ekspresi gen dalam rangka perakitan tanaman yang toleran terhadap cekaman asam dan aluminium a/n. Dr. Suharsono. Muzuni didukung oleh Program Beasiswa BPPS, Departemen Pendidikan Nasional, Indonesia.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahn, S.J., Z. Rengel, H. Matsumoto. 2004. Aluminum-induced plasma membrane surface potential and H<sup>+</sup>-ATPase activity in near-isogenic wheat lines differing in tolerance to aluminum. *New Phytol.* 162:71-79.
- Anwar, S. 1999. Pengklonan gen-gen yang diinduksi oleh aluminium pada kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill). Disertasi. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Buchanan, B.B., W. Gruissem, R.L. Jones. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 4<sup>th</sup> Edition. John Wiley and Sons, Inc., Publ. Monona Drive, Rockville USA.
- Fuglsang, A.T., S. Visconti, K. Drumm, T. Jahn, A. Stensballe, B. Mattei, O.N. Jensen, P. Aducci, M.G. Palmgren. 1999. Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr<sup>946</sup>-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr<sup>947</sup>. *J. Biol. Chem.* 274:36774-36780.
- Jernejc, K., M. Legisa. 2001. Activation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by ammonium ions in *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:368-373.
- Muhaemin. 2008. Analisis pertumbuhan *Melastoma* (*Melastoma malabathricum* auct. Non L. dan *M. affine* D. Don.) yang mendapat cekaman pH rendah dan aluminium. Tesis. Bogor. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Mutiasari, A. 2008. Akumulasi aluminium pada *Melastoma affine* dan *Melastoma malabathricum*. Tesis. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Niu, X., B. Damsz, A.K. Kononowicz, R.A. Bressan, P.M. Hasegawa. 1996. NaCl-induced alterations in both cell structure and tissue-specific plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene expression. *Plant Physiol.* 111:679-686.
- Osaki, M., T. Watanabe, T. Ishizawa, C. Nilnond, T. Nuyim, C. Sittibush, T. Tadano. 1998. Nutritional characteristics in leaves of native plants grown in acid sulfate, peat, sandy podzolic, and saline soils distributed in Peninsular Thailand. *Plant Soil* 201:175-182.
- Prihadi, D.P., E.R. Shipe, S.U. Wallace. 1995. Screening selected soybean genotype for aluminium tolerance. *Indon. J. Trop. Agric.* 6:11-12.
- Rao, R., C.W. Slayman. 1993. Mutagenesis of conserved residues in the phosphorylation domain of the yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. Effects on structure and function. *J. Biol. Chem.* 268:6708-6713.
- Rober-Kleber, N., T.P. Albrechtova, S. Fleig, C. Fischer-Iglesias. 2003. Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase is involved in auxin-mediated cell elongation during wheat embryo development. *Plant Physiol.* 131:1302-1312.
- Scarborough, G.A. 1996. The neurospora plasma membrane proton pump. p. 75-92. *In* W.N. Konings, H.R. Kaback, J.S. Lolkema (Eds.) *Handbook of Biological Physics*. 2<sup>nd</sup> ed. Chapel Hill, Elsevier Sci.
- Serrano, R. 1989. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:61-94
- Suharsono. 2002. Konstruksi pustaka genom kedelai kultivar Slamet. *Hayati* 9:67-70.
- Suharsono, S. Firdaus, U.W. Suharsono. 2008. Isolasi dan pengklonan fragmen cDNA dari gen penyandi multidrug resistance associated protein dari *Melastoma affine*. *Makara Sains.* 12:102-107.
- Suharsono, N. Trisnaningrum, L.D. Sulistyansih, U.W. Suharsono. 2009. Isolation and cloning of cDNA of gene encoding for metallothionein type 2 from *Melastoma affine*. *Biotropia.* 16:28-37.
- Sussman, M.R. 1994. Molecular analysis of proteins in the plant plasma membrane. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:211-234.
- Sze, H., X. Li, M.G. Palmgren. 1999. Energization of plant

- cell membranes by H<sup>+</sup>-pumping ATPases: Regulation and biosynthesis. *Plant Cell* 11:677-689.
- Vitorello, V.A., F.R. Capaldi, V.A. Stefanuto. 2005. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17:129-143.
- Watanabe, T., M. Osaki. 2002. Role of organic acids in aluminum accumulation and plant growth in *Melastoma malabathricum*. *Tree Physiol.* 22:785-792.
- Watanabe, T., M. Osaki, T. Tadano. 2001. Al uptake kinetics in roots of *Melastoma malabathricum* L. – an Al accumulator plant. *Plant Soil* 231:283-291.
- Watanabe, T., S. Jansen, M. Osaki. 2003. A physiological study of *Melastoma malabathricum*, an aluminum accumulating woody plant. <http://www.keele.ac.uk/depts/ch/groups/aluminium/watanabe.Po.pdf>. [15 Februari 2004].
- Yan, F., Y. Zhu, C. Muller, C. Zorb, S. Schubert. 2002. Adaptation of H<sup>+</sup>-pumping and PM H<sup>+</sup>-ATPase activity in proteoid root of white lupin under phosphate deficiency. *Plant Physiol.* 129:50-63.
- Young, J.C., N.D. DeWitt, M.R. Sussman. 1998. A transgene encoding a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase that confers acid resistance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Genetics* 149:501–507.