

704

LAPORAN HASIL PENELITIAN TAHUN II  
PENELITIAN FUNDAMENTAL 2007



ISOLASI PROMOTER GEN CARBONIC ANHYDRASE (CA) PADA  
*Amaranthus viridis* (TIPE PHOTOSINTHESIS C<sub>4</sub>)

Oleh

Dr. Ir. Kacung Haryono, MS  
Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS  
Prof. Dr. Bambang Sugiharto, MSc

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi,  
Departemen Pendidikan Nasional, Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah  
Penelitian Tahun Anggaran 2007  
Nomor : 040/SP2H/PP/DP2M/III/2007 tertanggal 29 Maret 2007

ok 2008  
i LP. 2007  
M  
704

FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2007



TIDAK DIPINJAMKAN KE LUAR

LAPORAN HASIL PENELITIAN TAHUN II  
PENELITIAN FUNDAMENTAL 2007



ISOLASI PROMOTER GEN CARBONIC ANHYDRASE (CA) PADA  
*Amaranthus viridis* (TIPE PHOTOSYNTHESIS C<sub>4</sub>)

Oleh  
Dr. Ir. Kacung Haryono, MS  
Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS  
Prof. Dr. Bambang Sugiharto, MSc

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi,  
Departemen Pendidikan Nasional, Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah  
Penelitian Tahun Anggaran 2007  
Nomor : 040/SP2H/PP/DP2M/III/2007 tertanggal 29 Maret 2007

ABAL	HADIAH / PEMBELIAN	K L A S
TERIMA		
NO INDOK		

FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2007

PENELITIAN FUNDAMENTAL 2007

1. Judul Penelitian : ISOLASI PROMOTER GEN CARBONIC ANHYDRASE (CA) PADA *Amaranthus viridis* (TIPE PHOTOSINTHESIS C<sub>4</sub>)
2. Ketua Peneliti
- a. Nama Lengkap : Dr. Ir. Kacung Haryono, MS
  - b. Jenis Kelamin : Laki-laki
  - c. NIP : 132 135 201
  - d. Pangkat/Golongan : Lektor / III-C
  - e. Jabatan Fungsional : -
  - f. Fakultas : Pertanian
  - g. Perguruan Tinggi : Universitas Jember
  - h. Pusat Penelitian : Biologi Molekuler
3. Jumlah Tim Peneliti : 3 (tiga) orang
4. Lokasi Penelitian : Puslit Biologi Molekuler Unej
5. Kerjasama dengan Institusi Lain : -
6. Masa Penelitian : 10 bulan
7. Biaya yang diperlukan : Rp. 40.000.000

Mengetahui  
As. Dekan Fakultas Pertanian  
Pembantu Dekan I



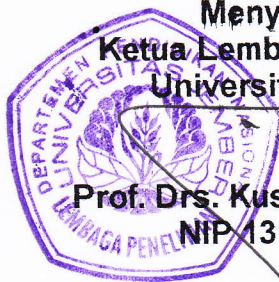
Drs. Dani Januar, MT  
NIP 131 798 139

Jember, 10 November 2007  
Ketua Tim Peneliti

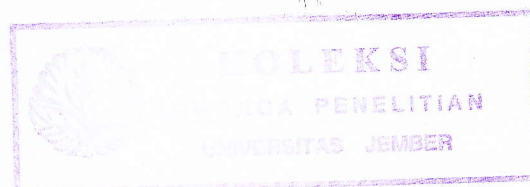
A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Kacung Haryono'.

Dr. Ir. Kacung Haryono, MS  
NIP 132 135 201

Menyetujui,  
Ketua Lembaga Penelitian  
Universitas Jember



Prof. Drs. Kusno, DEA, Ph.D  
NIP 131 592 357





# ISOLASI PROMOTER GEN CARBONIC ANHYDRASE (CA) PADA *Amaranthus viridis* (TIPE PHOTOSYNTHESIS C<sub>4</sub>)

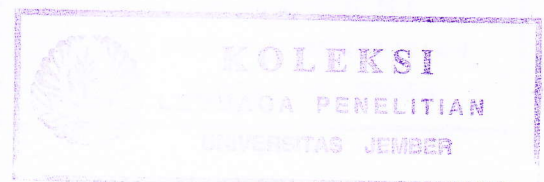
## RINGKASAN

Carbonic Anhydrase (CA) (EC 4.2.1.1) adalah enzim yang mengandung Zn yang mengkatalis secara bolak balik reaksi antara  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ . CA tersebar pada eukaryot seperti vertebrate dan tanaman, untuk prokaryotik seperti archebacteria dan eubacteria. Enzim ini dapat diklasifikasikan tiga gen famili yaitu CA alfa, beta dan gama (Hewet-Emmett dan Tashian, 1996)

Pada tanaman C<sub>4</sub>, CA mengkarversi CO<sub>2</sub> menjadi HCO<sub>3</sub> dalam mesofil. Bikarbonat dan phosphoenol pyruvate (PEP) bersamaan dengan PEP carboxilase (PEPC) untuk membentuk asam C<sub>4</sub> (oksaloacetat) yang kemudian dikonversi menjadi aspartat dan malat dalam bundle sheath cell dan mengalami dekarboksilasi dengan mengeluarkan CO<sub>2</sub> untuk bergabung dengan riboluse bisphosphate (RUBP) dalam siklus C<sub>3</sub>. CA merupakan enzim pertama dalam siklus tanaman C<sub>4</sub>.

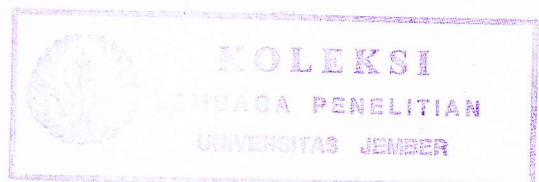
Penelitian Tahun II bertujuan mendapatkan fragmen cDNA CA dari tanaman bayam raja (*Amaranthus viridis*) yang telah disequensing dan diketahui kebenarannya. Urutan nukleotida tersebut digunakan untuk mendesain primer ke arah kiri (reverse) dan digunakan mengamplifikasi ujung limanya (5' end).

Total RNA digunakan dalam pembuatan *single strand* cDNA (sscDNA) sebagai templet untuk PCR. Primer didesign dari bagian homologi atau bagian konservatif pada tingkat asam amino dengan menggunakan sequence CA dari *F. bidentis*, *F. pringlei* dan *Lycopersicum esculentum*, kemudian diturunkan menjadi primer yaitu Forward (5' GCA TGC TCT GAT TCT CGA GT ' 3) dan Reverse (5' CCC AAG AGA TAC ATT CAC AGC ' 3). Konsentrasi total RNA sebesar 15,76 ug/ul dengan kemurnian 1,90. Hasil PCR berupa fragmen cDNA CA sekitar 375 bp. Setelah disequensing didapati



tingkat homologi dengan *F. Bidentis* sebesar 85%, dengan *F pringlei* sebesar 82, dengan *L. Esculentum* sebesar 88% dan dengan *Spinach* sebesar 91%.

Stretegi lain melakukan analisis PCR dengan menggunakan primer yang didesain dari fragmen yang sudah diketahui sequennya kearah reverse (LR) dan dipasang dengan P1 yang didesain dari bagian promoter CA MAVACS dari *F. bidentis*. Hasil PCR didapati fragmen DNA sekitar 3000 bp diharapkan merupakan promotor CA dari *A. Viridis*.





# THE ISOLATION OF GENE CARBONIC ANHYDRASE (CA) PROMOTER AT *Amaranthus viridis* (C<sub>4</sub> PHOTOSYNTHETIC TYPE)

## SUMMARY

Carbonic Anhydrase (CA-EC 4.2.1.1) is a zinc-containing enzyme that catalyzes the reversible reaction  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ . CA is widely distributed throughout nature, from eukaryotes such as vertebrates, invertebrates and plants, to prokaryotes such as archaebacteria and eubacteria. The enzyme is classified into three independent CA gene families designated alpha, beta and gamma CA (Hewett-Emmett and Thasian, 1996).

In C<sub>4</sub> plants, CA converts CO<sub>2</sub> to HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> in the mesophyll cytosol. Bicarbonate and phosphoenol-pyruvate (PEP) are combined by PEP carboxylase (PEPC) to form a C<sub>4</sub> acid (oxaloacetate acid) which is then converted to either aspartate or malate, which enters the bundle sheath cell and is decarboxylated. The released CO<sub>2</sub> then is combined with RUBP as in C<sub>3</sub> plants.

The first years of the research was isolated of the cDNA fragment of CA from *A. viridis*. It was as a probe for screening promoter in 5' end.

Total RNA was used to make *single strand* cDNA (sscDNA) as a template for PCR. Primers have been designed from conservative region at the amino acid level of *F. bidentis*, *F. pringlei* and *Lycopersicon esculentum*, then it were constructed based on nucleotide sequences of forward primer (5' GCA TGC TCT GAT TCT CGA GT ' 3 and reverse primer (5' CCC AAG AGA TAC ATT CAC AGC ' 3). The concentration of total RNA was 15.76 ug/ul with quality 1.90. cDNA fragment has been isolated around 375 bp. The fragment have been sequenced and analyzed for homology level. The cDNA fragment around 375 bp have homology around 85%, 82% , 88% and 91% with *F. bidentis* CA, *F. pringlei* CA, *L. esculentum* CA and *Spinach* CA, respectively.

The alternative strategy using the PCR analysis with primers pair from right fragment (LR) and P1 from part of the CA MVFACS promoter from *F.*

*bidentis*. Around 3000 bp single band was found, hopefully the fragment as CA promoter from *A. viridis*

