

Isolasi fragmen gen *LIPASE* dari kapang *Absidia corymbifera*, *Rhizopus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus*

*Isolation of LIPASE gene fragment from Absidia corymbifera, Rhizopus oryzae
and Rhizopus oligosporus fungi*

Riza A. PUTRANTO & Asmini BUDIANI

Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

Summary

Diversification of oil palm products, such as healthy oil, needs lipase sustainability as a biocatalist. Many attempts have been developed to produce lipase, including intensive exploration and screening of several species of molds. Genetic engineering for over expression of LIPASE gene in the selected mold is considered to be the potential approach for efficient production of this enzyme. This research was aimed to isolate the LIPASE gene fragment of Indonesian indigenous fungi, namely Absidia corymbifera, Rhizopus oryzae and R. oligosporus by means of RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) technique using heterologous primers. The result showed that a cDNA fragment of 462 bp has been amplified and isolated from the three fungi with different concentration. The highest quantity was found from A. corymbifera. The RT-PCR products isolated from A. corymbifera was cloned, sequenced and analyzed for its homology to the sequence of LIPASE gene from other species. BLAST analysis showed that the DNA sequence of the cloned RT-PCR product derived from A. corymbifera was highly homologous with LIPASE gene from Rhizopus niveus.

[Keywords: *Rhizopus niveus*, lipase, genetic engineering, RT-PCR, indigenous fungi].

Ringkasan

Diversifikasi produk kelapa sawit, seperti minyak sehat (*healthy oil*) memerlukan ketersediaan lipase sebagai biokatalis. Berbagai upaya untuk produksi lipase telah dikembangkan, termasuk eksplorasi dan skrining terhadap beberapa spesies kapang secara intensif. Rekayasa genetika untuk mengover-ekspresikan gen *LIPASE* pada kapang hasil skrining tersebut dipandang merupakan satu pendekatan potensial untuk produksi enzim ini secara efisien. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi fragmen gen *LIPASE* dari tiga kapang indigenous Indonesia, yaitu *A. corymbifera*, *R. oryzae* dan *R. oligosporus*, menggunakan teknik RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa fragmen cDNA sepanjang 462 bp dari ketiga kapang telah diisolasi, masing-masing dengan kuantitas yang berbeda. Hasil tertinggi diperoleh dari kapang *A. corymbifera*. Produk RT-PCR dari *A. corymbifera* diklon, disekuon kemudian dianalisis homologinya dengan sekuen gen *LIPASE* dari spesies lain. Analisis BLAST menunjukkan bahwa sekuen DNA dari produk RT-PCR terklon yang berasal dari *A. corymbifera* memiliki homologi tinggi dengan gen *LIPASE* dari *Rhizopus niveus*.

Pendahuluan

Lipase merupakan biokatalis yang secara umum diperlukan untuk hidrolisis lemak, mono- dan di-gliserida yang akan menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol (Suzuki *et al.*, 1988; Kosugi *et al.*, 1990) dan sebaliknya pada kondisi tertentu lipase juga mengkatalisis reaksi sintesis gliserida dari gliserol dan asam lemak (Suzuki *et al.*, 1988; Hoq *et al.*, 1985). Aplikasinya dapat dijumpai antara lain pada industri makanan dan minuman, deterjen, farmasi, agrokimia, dan oleokimia (Saxena *et al.*, 1999; Yang & Xu, 2001). Biokatalis ini memiliki arti yang semakin penting dalam kaitannya dengan diversifikasi produk sawit, mengingat Indonesia merupakan negara penghasil dan pengeksport CPO (*crude palm oil*) terbesar di dunia, dengan produksi CPO sebesar 17 juta ton pada tahun 2007 dan pada tahun mendatang diperkirakan produksi CPO akan terus meningkat (Pradana, 2007).

Penggunaan lipase dalam industri makanan memiliki keunggulan karena hidrolisis yang dikatalisis bersifat spesifik. Modifikasi oleh enzim lipase yang memiliki spesifisitas reaksi 1,3-gliserida menghasilkan gliserida dengan produk utama diasilgliserol (DAG) dan produk samping monoasilgliserol (MAG) serta asam lemak bebas dan gliserol. Yasunaga *et al.* (2001) melaporkan bahwa minyak kaya DAG dapat berfungsi sebagai minyak sehat karena antara lain dapat mengurangi trigliserida (TG) dalam serum darah, mencegah akumulasi lemak dalam tubuh dan memperbaiki rasio kolesterol serum darah.

Minyak sehat nabati dipasarkan pertama kali di pertokoan pusat kota Atlanta dan Chicago pada awal tahun

2003. Minyak goreng dengan merk dagang Enova Oil mengandung DAG 50% dijual di swalayan dengan harga US\$ 4,79 per 20 ons atau US\$ 8,45 per kg. Harga minyak ini kira-kira empat kali lebih tinggi dari pada minyak goreng biasa (Dunford, 2002). Indonesia belum memiliki minyak goreng jenis ini di pasaran. Kendala pengembangan proses biokonversi enzimatik dalam skala industri adalah ketersediaan dan harga lipase impor yang mahal, mencapai 25 juta rupiah per kg karena hanya ada beberapa produsen lipase saja di seluruh dunia (Suzuki *et al.*, 1988; Elisabeth, 2003). Bahkan pada tahun 2007, harga lipase di pasaran internasional telah meningkat menjadi 30 juta rupiah per kg (AOCS Press, 2007).

Rekayasa genetika untuk memproduksi senyawa bernilai ekonomi tinggi telah banyak dikembangkan, terutama dalam industri makanan dan farmasi (Murooka & Imanaka, 1993; van Dijk, 1999). Pendekatan produksi lipase yang umum dilakukan dan telah berkembang ke tingkat komersialisasi adalah eksplorasi dan skrining strain kapang secara intensif yang diikuti dengan rekayasa genetika. Salah satu contoh adalah Lipolase. Lipase rekombinan yang diproduksi oleh Novo Nordisk ini, menggunakan gen *LIPASE* yang berasal dari *Humicola* yang kemudian diekspresikan di dalam sel inang baru yaitu *Aspergillus oryzae* (Hoq *et al.*, 1985)

Eksplorasi dan skrining kapang yang berpotensi tinggi sebagai penghasil lipase merupakan tahapan penting dalam rekayasa genetika produksi lipase. Beberapa kapang diketahui mampu menghasilkan lipase yaitu *Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, *Monilia sitophila*, *Rhizopus delemar* dan *R. javanicus*

(Onions *et al.*, 1981; Yamane, 1987). Pada penelitian sebelumnya, deteksi gen *LIPASE* secara molekuler pada kapang *A. corymbifera* dan *R. oryzae* telah dilakukan menggunakan PCR spesifik. (Putranto *et al.*, 2006). Di samping itu, enzim-enzim hidrolitik lemak juga ditemukan pada genus *Rhizopus* (Tri-Panji, 1997; Tri-Panji *et al.*, 2007). Dengan demikian *A. corymbifera* dan *R. oryzae* diharapkan menjadi sumber gen *LIPASE* untuk produksi lipase menggunakan teknik rekayasa genetika. Sebagai langkah awal dalam usaha rekayasa genetika untuk memproduksi lipase, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi fragmen gen *LIPASE* dari tiga kapang indigenus Indonesia, yaitu *A. corymbifera*, *R. oryzae*, dan *R. oligosporus*

Bahan dan Metode

Kultur dan penyiapan miselium kapang

Kapang yang digunakan adalah *A. corymbifera* AC001, *R. oryzae* R.211, dan *R. oligosporus* R213 koleksi Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia yang dipelihara dalam *yeast malt agar* (YMA) miring. Satu *ose* dari kultur aksenik dicelupkan pada permukaan medium. Miselium kapang ditumbuhkan selama 72 jam pada suhu kamar dalam medium *yeast malt broth* (YMB) ditambah 2% minyak sawit (CPO).

Isolasi RNA kapang

RNA total diisolasi dari miselium kapang menggunakan gabungan metode Chang *et al.* (1993) dan Liu *et al.* (1998). Miselium kapang dipanen menggunakan *ose* steril dan dicuci dengan akuades steril,

kemudian digerus dalam mortar dengan menambahkan nitrogen cair hingga berbentuk serbuk beku. Ke dalam 2,5 g serbuk miselium beku ditambahkan 10 mL bufer ekstraksi (Trizma Base 0,2 M, LiCl 0,3 M, EDTA 0,01 M, PVP MW 36,000 1%, tiourea 5 mM, aurintrikarboksilat 1 mM, dan 2-Merkaptoetanol 2%). Campuran dikocok kuat, ditambahkan 1 volume campuran fenol:kloroform: isoamilalkohol (25:24:1), divortex 3x30 detik, kemudian disentrifus pada kecepatan 15.000 rpm, suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan diekstraksi sekali lagi menggunakan kloroform : isoamilalkohol (24:1) sebanyak 1 volume dilanjutkan dengan sentrifus kembali pada kecepatan, suhu dan waktu yang sama. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung sentrifus baru, kemudian ditambahkan 1/30 volume Na asetat 3,3 M pH 5,2 dan 1/10 volume etanol absolut. Setelah campuran diinkubasi dalam es selama 30 menit, RNA diendapkan melalui sentrifugasi (15.000 rpm, 4°C, 25 menit). Endapan RNA dicuci menggunakan etanol 70% dingin dilanjutkan dengan sentrifugasi (8000 rpm, 4°C, 25 menit). Endapan RNA dilarutkan dengan DEPC-dH₂O. RNA dipisahkan dari DNA dengan menambahkan LiCl 8 M ke dalam larutan RNA hingga konsentrasi akhir 2 M. Campuran didiamkan selama 4-16 jam pada suhu 4°C, kemudian disentrifus (13.000 rpm, 4°C, 20 menit). Endapan RNA dibilas menggunakan etanol dingin 70%, dilanjutkan dengan sentrifugasi (5000 rpm, 4°C, 5 menit). Endapan RNA dilarutkan menggunakan 50-100µL DEPC-dH₂O. RNA yang diperoleh diuji kualitas dan kuantitasnya menggunakan elektroforesis pada gel agarosa 0,8% dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 260 dan 280 nm.

Amplifikasi fragmen gen LIPASE

Amplifikasi fragmen daerah konservatif gen *LIPASE* dilakukan menggunakan teknik RT-PCR (*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*). Utas pertama cDNA disintesis menggunakan kit *SuperScript™ II First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) dengan templat RNA dari miselium kapang, masing-masing 2 µg, menggunakan primer oligo(dT) yang tersedia di dalam kit. Utas tunggal cDNA selanjutnya dijadikan templat dalam sintesis utas ganda cDNA menggunakan primer heterologous. Primer tersebut dirancang dengan terlebih dahulu menjajarkan sekuen gen *LIPASE* dari berbagai spesies menggunakan program ClustalW dari *BioEdit 5.0*. Dari penjajaran tersebut diketahui daerah konservatif sebagai target amplifikasi. Selanjutnya perancangan primer dilakukan dengan program *Primer3*.

Analisis PCR dilakukan dengan total reaksi 25 µL, yang mengandung MgCl₂ 1,5 mM, 2,5 µL bufer ekstraksi 10X, 0,5 µL dNTPs 10 µM, 0,5 µL *Taq DNA Polymerase* 5u/µL, 17 µL ddH₂O, 1 µL templat *first strand cDNA* hasil sintesis, dan 2 µL primer LIP4F (5'-GCCAAAGTTCATGCTGGT) dan LIP4R (5'-CTCAAGTGGTCAAGGATAGAGG). Program PCR terdiri dari satu siklus pra denaturasi (95°C, 5 menit), dan 35 siklus reaksi yang terdiri dari denaturasi (95 °C, 30 detik), penempelan (50 °C, 30 detik) dan ekstensi (72 °C, 90 detik). Pada tahap akhir proses PCR dilakukan ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama lima menit. Sebanyak 5 µL hasil PCR di cek dengan elektroforesis pada gel agarosa 0,8 %. Intensitas hasil

PCR dikuantifikasi menggunakan program *UN-SCAN-IT Gel 6.1* pada alat *Gel Doc*.

Analisis sekuen DNA produk RT-PCR

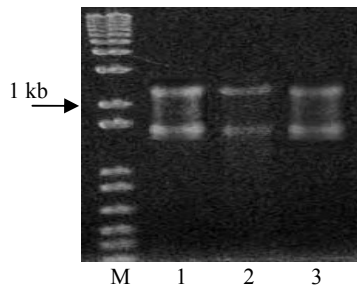
Fragmen hasil RT-PCR diisolasi dan dimurnikan dari gel agarosa menggunakan kit *QIAquick Gel Extraction* dari QIAGEN, kemudian diklon ke dalam *E. coli* XL1 Blue menggunakan vektor pGEM-T (Promega). Proses ligasi dan transformasi dilakukan sesuai prosedur yang direkomendasikan dalam buku petunjuk. Seleksi sel transforman dilakukan pada medium padat LB yang mengandung kanamisin 50 mg/L dan X-Gal 40 mg/L. Analisis adanya fragmen terklon pada koloni putih dilakukan dengan PCR menggunakan primer spesifik LIP4F dan LIP4R. Hasil PCR koloni dicek dengan elektroforesis pada gel agarosa 0,8 %. Plasmid rekombinan diisolasi dari sel *E. coli* rekombinan menggunakan *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche) dan dicek ukurannya dengan elektroforesis pada gel agarosa 0,8%.

Keberadaan fragmen gen dalam plasmid dipastikan dengan cara digesti plasmid menggunakan enzim restriksi *EcoRI*. Untuk mengkonfirmasi bahwa fragmen DNA hasil RT-PCR adalah fragmen gen *LIPASE*, dilakukan sekuensing dengan templat plasmid rekombinan menggunakan primer M13. Sekuensing dilakukan di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta. Sekuen DNA hasil sekuensing dianalisis homologinya dengan gen yang sama dari berbagai spesies menggunakan BLAST yang diakses pada situs [http:// www. ncbi. nlm. nih. gov/ BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Hasil dan Pembahasan

Isolasi RNA kapang

Gambar 1 dan Tabel 1 menunjukkan kualitas dan kuantitas RNA hasil diisolasi dari ketiga jenis kapang penghasil lipase yang potensial yaitu *R. oligosporus*, *A. corymbifera* dan *R. oryzae*. Selain konsentrasinya yang cukup tinggi, nampak bahwa RNA yang dihasilkan dari ketiga kapang juga memiliki tingkat kemurnian tinggi yang ditunjukkan dengan rasio A260/280 dan A260/230 ≥ 1.800 (Tabel 1) dan secara visual ditunjukkan oleh dua pita ribosomal RNA yaitu 28S dan 18S yang jelas (Sambrook *et al.*, 1989). Kunci keberhasilan untuk mendapatkan RNA kapang dengan kuantitas yang tinggi adalah umur pertumbuhan yang sekaligus menentukan jumlah miselium yang dipanen. Kapang yang dipanen untuk isolasi RNA umumnya mengandung sekitar 6×10^8 sel atau ekivalen dengan



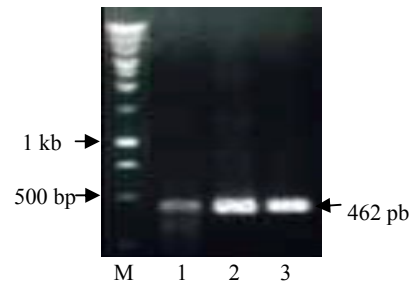
Gambar 1. Profil RNA total tiga galur kapang. (M) 1kb plus DNA ladder; (1) *R. oligosporus*; (2) *A. corymbifera*; dan (3) *R. oryzae* dengan konsentrasi masing-masing 250 ng

Figure 1. Total RNA profile from three strains of fungi. (M) 1kb plus DNA ladder; (1) *R. oligosporus*; (2) *A. corymbifera*; and (3) *R. oryzae*, each quantity 250 ng.

1– 1,5 gram biomassa miselium, yang menunjukkan bahwa metabolisme kapang sedang berada pada laju eksponensial. Di samping itu prosedur isolasi RNA yang dikembangkan dari gabungan metode Chang *et al.* (1993) dan Liu *et al.* (1998) untuk mengatasi kandungan senyawa polisakarida yang tinggi nampaknya sangat efektif untuk isolasi RNA dari kapang. Kapang dengan dinding sel yang 80% terdiri dari polisakarida lebih mudah mengalami lisis sehingga jumlah RNA yang diperoleh sangat tinggi. RNA kapang yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk sintesis cDNA.

Amplifikasi fragmen gen LIPASE

Hasil amplifikasi fragmen gen LIPASE dari ketiga kapang ditunjukkan pada Gambar 2. Nampak bahwa ketiganya menghasilkan fragmen DNA berukuran sedikit lebih rendah dari 500 bp. Untuk mengetahui secara pasti panjang dan



Gambar 2. Profil RT-PCR kapang *Rhizopus oligosporus* (1), *A. corymbifera* (2), dan *R. oryzae* (3) menggunakan pasangan primer LIP4F/R. (M) 1kb DNA ladder.

Figure 2. T-PCR profile from *R. oligosporus* (1), *A. corymbifera* (2) and *R. oryzae* (3) using LIP4F/R primers. (M) 1kb DNA ladder.

susunan nukleotida fragmen produk RT-PCR tersebut, dilakukan isolasi dan pemurnian fragmen dari gel, kloning dan isolasi plasmid rekombinan, dilanjutkan dengan sekuensing. Kuantifikasi hasil amplifikasi tersebut dengan program *UN-SCAN-IT Gel 6.1* dirangkum pada Tabel 2. Prinsip kerja program ini adalah membandingkan *pixel* gambar masing-masing sampel dengan menggunakan marka DNA sebagai standar konsentrasi. Baik secara visual maupun secara kuantitatif nampak hasil RT-PCR tertinggi diperoleh dari *A. corymbifera* (348 ng), sedangkan *R. oligosporus* memberikan hasil terendah dengan konsentrasi sebesar 47 ng (Tabel 2)

Perbedaan kuantitas hasil RT-PCR tersebut dapat mencerminkan perbedaan tingkat ekspresi gen *LIPASE* dari ketiga kapang yang dianalisis. *A. corymbifera*

paling kuat mengekspresikan *LIPASE* dibanding dua kapang lainnya. Apabila hal ini benar, maka *A. corymbifera* merupakan kandidat yang baik untuk produksi lipase, baik langsung maupun dengan rekayasa genetika. Namun perbedaan kuantitas hasil RT-PCR juga dapat disebabkan oleh perbedaan spesifisitas primer terhadap sekuen gen *LIPASE* dari ketiga kapang. Semakin tinggi spesifisitas primer, maka semakin tinggi produk RT-PCR yang dihasilkan. Ekstraksi dan analisis aktivitas lipase dari ketiga kapang akan mengkonfirmasi apakah kuantitas produk RT-PCR disebabkan oleh perbedaan tingkat ekspresi atau karena perbedaan spesifisitas primer.

Produksi lipase oleh kapang pada umumnya dipengaruhi kondisi lingkungan Minyak sawit yang terkandung dalam medium menginduksi kapang untuk

Tabel 1. Kualitas dan kuantitas RNA total yang diisolasi dari tiga galur kapang.

Table 1. *Quality and quantity of total RNA isolated from three strains of fungi.*

Galur kapang <i>Strains</i>	Rasio serapan <i>Absorbance ratio (nm)</i>		Kuantitas <i>Quantity</i> (ng/ μ L)
	A260/280	A260/230	
<i>R. oligosporus</i>	1,8	1,9	350
<i>A. corymbifera</i>	2,0	1,9	1030
<i>R. oryzae</i>	1,9	1,8	1250

Tabel 2. Kuantitas hasil RT-PCR dari tiga galur kapang.

Table 2. *Quantity of RT-PCR product from three strains of molds.*

Galur kapang <i>Strains</i>	Kuantitas (<i>Quantity</i>) ng
<i>R. oligosporus</i>	47
<i>A. corymbifera</i>	348
<i>R. oryzae</i>	304

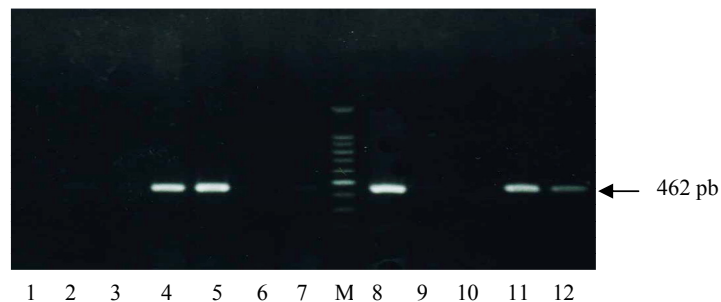
menghasilkan lipase ekstraseluler sebagai biokatalis untuk mencerna lemak. Perakitan sel rekombinan memerlukan enzim lipase dengan sekresi tinggi, sehingga perbedaan kuantitas cDNA yang dihasilkan oleh ketiga jenis kapang melalui RT-PCR dalam penelitian ini merupakan informasi berharga, terutama apabila teknik yang sama akan digunakan dalam isolasi gen lengkapnya untuk rekayasa genetika. Karena kuantitasnya yang tinggi, maka fragmen produk RT-PCR dari *A. corymbifera* (*Ac_LIP4*) dipilih untuk kloning ke dalam *E. coli* dilanjutkan dengan analisis DNA untuk mengkonfirmasi kebenaran produk RT-PCR sebagai fragmen gen *LIPASE*.

Isolasi dan analisis fragmen DNA *Ac_LIP4* hasil RT-PCR

Koloni putih hasil transformasi *E. coli* XL1Blue menggunakan fragmen DNA produk RT-PCR asal *A. corymbifera* (*Ac_LIP4*) dianalisis untuk memastikan ada tidaknya sisipan fragmen DNA produk RT-PCR terklon, dengan teknik PCR koloni menggunakan primer LIP4F/R

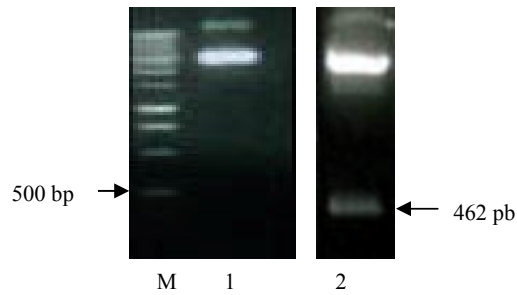
(Gambar 3). Dari 12 koloni yang dianalisis, lima koloni menunjukkan hasil positif, yang ditunjukkan oleh adanya sisipan DNA berukuran sekitar 462 pb. Isolasi plasmid kemudian dilakukan untuk mendapatkan plasmid yang telah tersisipi fragmen *Ac_LIP4*. Gambar 4 memperlihatkan plasmid hasil isolasi dari *E. coli* rekombinan. Digesti plasmid membuktikan kembali keberadaan DNA sisipan pada plasmid rekombinan (Gambar 4 lajur 2).

Sekuensing DNA yang dilanjutkan dengan analisis BLAST VecScreen untuk menghilangkan kontaminasi sekuen DNA yang berasal dari vektornya, menghasilkan sekuen DNA sepanjang 462 bp (Gambar 5). Hasil analisis BLASTn secara jelas menunjukkan skor yang tinggi (435 - 773) dan *E value* yang sangat rendah (6e-119 sampai 0.0) antara fragmen *Ac_LIP4* produk RT-PCR terklon dengan gen *LIPASE* dari *R. oryzae*, *R. niveus*, *R. delemar*, *R. microsporus* dan *R. Stolonifer* (Tabel 3). Dengan demikian dapat dipastikan bahwa fragmen tersebut adalah fragmen gen *LIPASE*.



Gambar 3. Profil PCR koloni dari *E. coli* rekombinan yang membawa fragmen *Ac_LIP4*, (M) 100 bp DNA ladder; lajur (1-12) koloni terpilih untuk PCR.

Figure 3. Profile of colony PCR from recombinant *E. coli* carrying *Ac_LIP4* fragment, (M) 100 bp DNA ladder; lane (1-12) selected colonies for PCR.



Gambar 4. Profil elektroforesis plasmid hasil isolasi dari *E. coli* rekombinan yang membawa fragmen *Ac_LIP4*. (M) 1 kb DNA ladder; (1) pGEMT-*Ac_LIP4*; (2) Plasmid yang didigesti menggunakan *EcoRI*.

Figure 4. Electrophoretic profile of plasmid isolated from recombinant *E. coli* carrying *Ac_LIP4* fragment. (M) 1 kb DNA ladder; lane (1) pGEMT-*Ac_LIP4*; lane (2) Digested plasmid using *EcoRI*.



Gambar 5. Sekuen DNA fragmen *Ac-LIP4* produk RT-PCR terklon. Anak panah penunjukkan posisi primer LIP4F (====▶) dan LIP4R (◀.....)

Figure 5. DNA sequence of the cloned RT-PCR product of *Ac_LIP4* fragment. Arrows showed position of primer LIP4F (====▶) and primer LIP4R (◀.....)

Isolasi fragmen gen LIPASE dari kapang Absidia corymbifera.....

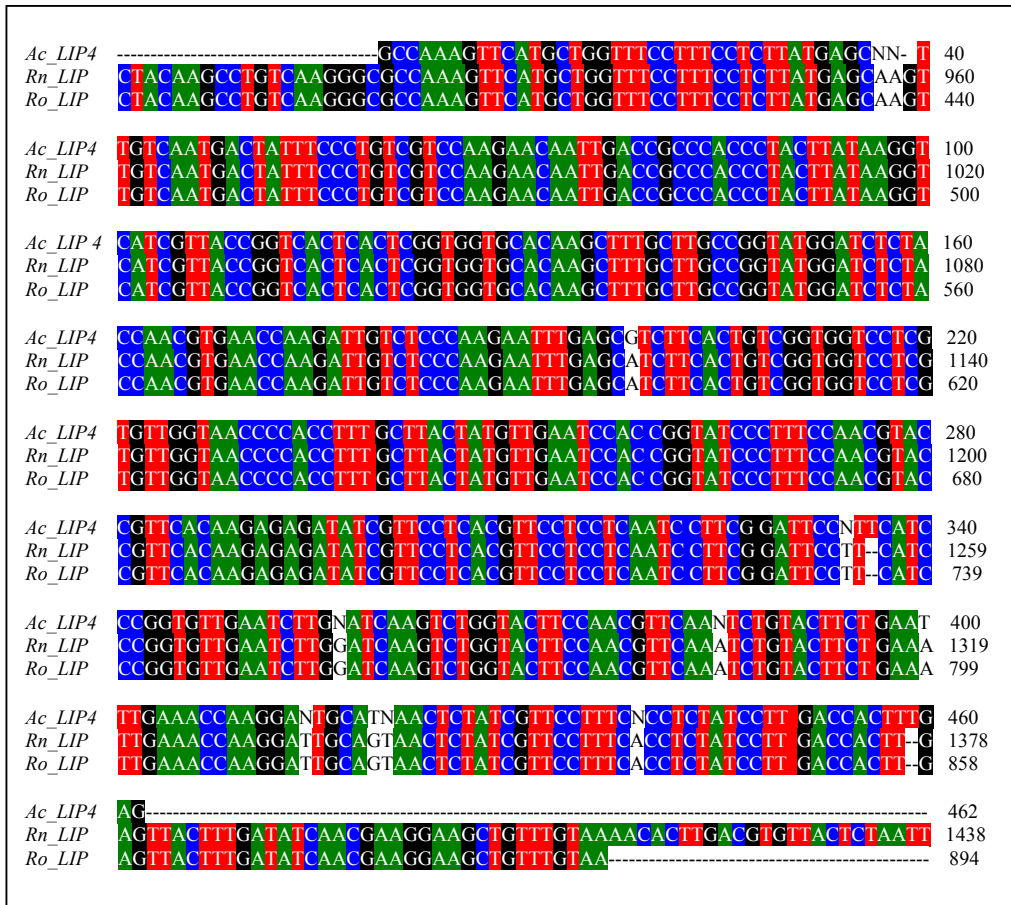
Tabel 3. Gen *LIPASE* dari berbagai spesies yang mempunyai homologi tinggi dengan fragmen *Ac_LIP4* produk RT-PCR.

Table 3. *LIPASE genes from several species which are highly homologous with RT-PCR product of Ac_LIP4 fragment.*

No. Akses	Deskripsi (<i>Description</i>)	Skor (bit)	<i>E- value</i>
AB433531.1	<i>R. oryzae</i> ROL gene for lipase preproprotein, complete cds	773	0.0
D13206.1	<i>R. niveus</i> gene for lipase, complete cds	773	0.0
AY513724.1	<i>R. oryzae</i> Lipadyou-2 gene, partial cds	773	0.0
AB013496.1	<i>R. niveus</i> gene for lipase, complete cds	773	0.0
M38352.1	<i>R. delemar</i> carboxyl ester hydrolase mRNA, complete cds	773	0.0
S39525.1	RNL=lipase [<i>Rhizopus niveus</i> , mRNA Partial, 958 nt]	769	0.0
D12680.1	<i>R. niveus</i> mRNA for lipase, partial cds	769	0.0
DQ489719.1	<i>R. oryzae</i> lipase precursor, gene, partial cds	755	0.0
DQ080073.1	<i>R. oryzae</i> lipase precursor (Liprbs-1) gene, partial cds	724	0.0
AF229435.1	<i>R. oryzae</i> lipase precursor gene, complete cds	715	0.0
EF405962.2	<i>R. microsporus</i> var. <i>chinensis</i> lipase gene, complete cds	435	6e-119
DQ139862.1	<i>R. stolonifer</i> lipase lipRs mRNA, complete cds	402	4e-109

Gambar 6 menyajikan hasil pen-jajaran sekuen DNA fragmen *Ac_LIP4* dengan gen *LIPASE* dari *R. niveus* (*Rn_LIP*) yang diakses pada bank gen, dan fragmen DNA produk PCR genomik dari *R. oryzae* (*Ro_LIP*) yang dihasilkan dari penelitian sebelumnya (Putranto *et al.*, 2006). Dari gambar tersebut dapat dilihat bahwa fragmen *Ac_LIP4* terklor mempunyai homologi tinggi dengan *Rn_LIP* pada nukleotida ke-920 sampai 1380, serta dengan fragmen gen yang sama dari *R. oryzae* (*Ro_LIP*) pada nukleotida ke-400 hingga 860. Perbedaan dapat dideteksi pada nukleotida ke-198, yaitu G (Guanine) pada *Ac_LIP4* dan A (Adenine) pada *Rn_LIP* dan *Ro_LIP*, nukleotida ke-400, yaitu T (Thymine) pada *Ac_LIP4*, dan A pada *Rn_LIP* dan *Ro_LIP* serta nukleotida ke-419, yaitu T pada *Ac_LIP4*, dan G pada *Rn_LIP* dan

Ro_LIP. Sedangkan perbedaan nukleotida lain yang terdeteksi adalah hilangnya G pada posisi antara nukleotida ke-39 dan ke-40, penambahan satu T pada posisi ke-336 dan posisi ke-359 serta beberapa nukleotida yang tidak dapat dibaca oleh mesin sekuensing yang dinyatakan sebagai N (pada posisi ke- 38, 39, 334, 357, 385, 414, 421 dan 440). Perlu analisis lebih lanjut untuk mengetahui apakah perbedaan nukleotida yang terdeteksi adalah akibat mutasi atau hanya kesalahan pembacaan mesin sekuensing yang sering terjadi, serta untuk mendapatkan pembacaan nukleotida yang benar pada beberapa posisi yang ditunjukkan sebagai N. Sekuen DNA yang diperoleh dari penelitian ini akan dijadikan dasar untuk merancang primer spesifik yang diperlukan dalam mendapatkan gen lengkapnya dengan teknik RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*).



Gambar 6. Penjajaran sekuen DNA fragmen *Ac_LIP4* dengan sekuen DNA dari *Rn_LIP* (gen *LIPASE* dari *R. niveus*) dan *Ro_LIP* (fragmen DNA gen *LIPASE* hasil PCR genomik dari *R. oryzae*).

Figure 6. Alignment of DNA sequence of *Ac_LIP4* fragment with *Rn_LIP* gene (*LIPASE* gene from *R. niveus*) and *Ro_LIP* (DNA fragment of *LIPASE* gene produced by genomic PCR from *R. oryzae*).

Kesimpulan dan Saran

Fragmen DNA berukuran 462 bp telah diisolasi dari tiga kapang potensial penghasil lipase, yaitu *A. corymbifera*, *R. oryzae*, dan *R. oligosporus*. Fragmen tersebut telah terkonfirmasi sekuennya sebagai fragmen gen LIPASE. Ketiga kapang mengakumulasi fragmen DNA tersebut dengan kuantitas yang berbeda. Akumulasi tertinggi diperoleh dari *A. corymbifera*, diikuti oleh *R. oryzae* dan terendah adalah *R. oligosporus*.

Daftar Pustaka

- AOCS Press (2007). Diacylglycerol Oil & Lipases. Chapter 19-22: 197-252.
- Chang, S., J. Puryear & J. Cairney (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **11**, 98 – 100.
- Dunford, N. (2002). *ADM Launches Fat-Fighting Cooking Oil. Food & Agricultural Products Center*. December 17, 2002. Taken from <http://www.fapc.okstate.edu/FAPC-Flash/newcookingoil.pdf>.
- Elisabeth, J. (2003). Roadmap dan agenda Rusnas kelompok kerja farmasi dan nutrasetikal. *Dalam: Panduan Lokakarya Nasional*. Identifikasi agenda riset strategis dalam rangka pengembangan industri hilir kelapa sawit. Jakarta, Masyarakat Perkelapa-Sawitan Indonesia.
- Hoq, M. M, T. Yamane, S. Shimizu, T. Funada, & S. Ishida (1985). Continuous hydrolysis of olive oil by lipase in microporous hydrophobic membrane bioreactor. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **62**, 1016-1021.
- Kosugi, Y., H. Tanaka & N. Tomizuka (1990). Continuous hydrolysis of oil by immobilized lipase in a countercurrent reactor. *Biotech. Bioeng.*, **36**, 617-622.
- Liu, J.J., C.J Goh, C.S Loh, Liu P. & E.C. Pua (1998). A method for isolation of total RNA from fruit tissues of banana. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **16**, 1-6.
- Murooka, Y. & T. Imanaka (1993). *Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications*. New York, Marcel Dekker Pub. 896 pp.
- Nining, A. (2005). Isolasi dan penapisan mikroba penghasil lipase spesifik - gliserida serta penentuan kondisi optimum produksi diasilgliserol menggunakan minyak sawit mentah. Jakarta, Universitas Indonesia. *Tesis*. 60 p.
- Onions, A.H.S., D. Allsopp & H.O.W. Egging (1981). *Smith's Introduction to Industrial Mycology*. 7th eds. London, Edwards Arnold British. P.140-142.
- Pradana, R. (2007). Nyiur Melambai, Nusantara. *Mediacare*. Diunduh dari <http://www.mailarchive.com/mediacare@yahoogroups.com/msg25408.html>.
- Putranto, R.A., D. Santoso, Tri-Panji, Suharyanto & A. Budiani (2006). Karakterisasi gen penyandi Lipase dari kapang *R. oryzae* dan *A. corymbifera*. *Menara Perkebunan*, **74**(1), 1-5.
- Sambrook, J.E, F. Fritsch & T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Saxena, R.K., P.K. Ghosh, R. Gupta, W. S. Davidson, S. Bradoo & R. Gulati (2000). Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. *Curr. Sci.*, **77**, 101–115.
- Suzuki, T., Y. Mushiga, T. Yamane & S. Shimizu (1988). Mass production of lipase by fed-batch culture of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 417-422.
- Tri-Panji (1997). Growth and the content of polyunsaturated fatty acids of Absidia

- corymbifera biomass on media containing crude palm oil. *Menara Perkebunan*, **65** (3) 104-110.
- Tri-Panji, Suharyanto, A.W. Paulus & K. Syamsu (2007). Optimasi pertumbuhan dan aktivitas desaturase *A. corymbifera* dan *R. oryzae* dalam medium basal dengan beberapa variasi sumber karbon. *Jurnal Teknologi Pertanian*, **11**(3), 101-107.
- Van Dijck, P.W.M. (1999). Chymosin and Phytase. Made by genetic engineering (No. 10 in a series of articles to promote a better understanding of the use of genetic engineering). *J. Biotechnol.*, **67**,77-80.
- Yamane, T. (1987). Enzyme technology for the lipids industry : An Engineering overview. In Applewhite, T. H. (ed.). *Proceeding of World Conference on Biotechnology for the Fats and Oils Industry. AOAC Champaign*. p.17-22.
- Yang, T. & X. Xu (2001). Enzymatic modification of palm oils: useful products with potential processes. In: *Proceedings of International Palm Oil Congress: Chemistry and Technology*, MPOB, Kuala Lumpur, p. 45-64
- Yasunaga, K., Y. Katsuragi & T. Yasukawa (2001). Nutritional characteristics of diacylglycerol. In: *2001 PIPOC International Palm Oil Congress*. p. 149-155.