

Kloning parsial gen penyandi enoil-ACP reduktase dari mesokarp buah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.)

Partial cloning of gene encoding enoil-ACP reductase from mesocarp of oil palm (Elaeis guineensis Jacq.)

Asmini BUDIANI¹⁾, Djoko SANTOSO¹⁾, Hajrial ASWIDINNOOR²⁾
& Antonius SUWANTO³⁾

¹⁾ Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

²⁾ Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia

³⁾ Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia

Summary

*Enoil-ACP reductase (ENR) is a component of fatty acid synthase (FAS) that is considered to play an important role in fatty acid elongation and oil accumulation of several plants. One of the proteins expressed coinciding with fruit development and oil accumulation in oil palm has been detected from the previous study and had homology with ENR. Therefore, as a part of genetic engineering program to improve oil content and quality in oil palm mesocarp, this research was aimed to clone cDNA conserved region of gene encoding enoil-ACP reductase from oil palm mesocarp. Based on the amino acid sequence of the polypeptide that was homologous with ENR and combined with information of conserved region sequences of the same gene from other plant sources, primers were designed for amplifying conserved region of the ENR gene. Amplification was carried out by RT-PCR using total RNA as template, at several annealing temperatures and MgCl₂ concentrations. Amplification product was cloned using pCR 2.1-TOPO, and the sequence was subjected into BlastN analysis. The results confirmed that the cloned cDNA fragment with 698 bp in size was the conserved region of the ENR gene. This sequence was highly homologous with the same gene from other plants such as *Oryza sativa*, *Olea europaea*, *Brassica napus*, *Triticum aestivum* and *Arabidopsis thaliana* with E-*

value 1e-96, 7e-77, 2e-64, 5e-41 and 3e-36, respectively. Based on this result, primers have been made and used to amplify the 5'- and 3' ends of the ENR -cDNA of oil palm mesocarp.

[Key words: *Elaeis guineensis* Jacq. enoil-ACP reductase (ENR), partial cloning, RT-PCR]

Ringkasan

Enoil-ACP reduktase (ENR) merupakan salah satu komponen asam lemak sintase (FAS) yang berperan penting dalam pemanjangan asam lemak dan akumulasi minyak pada berbagai tanaman. Salah satu protein yang ter-ekspresi sejalan dengan tahapan perkembangan buah sawit dan akumulasi minyak pada penelitian sebelumnya diketahui mempunyai homologi dengan ENR. Oleh karena itu, sebagai salah satu bagian dari usaha rekayasa metabolisme minyak pada mesokarp buah sawit, penelitian ini bertujuan untuk mengklon cDNA daerah konservatif gen penyandi ENR dari mesokarp buah sawit. Berdasarkan sekuen asam amino polipeptida yang mempunyai homologi dengan ENR dan dikombinasikan dengan hasil peninjauan daerah konservatif gen tersebut dari berbagai tanaman lain, dirancang primer untuk amplifikasi daerah konservatif ENR. Amplifikasi dilakukan dengan RT-PCR menggunakan templat RNA total pada berbagai suhu penempelan dan konsentrasi MgCl₂.

Hasil amplifikasi dimurnikan dari gel dan diklon menggunakan vektor kloning pCR2.1-TOPO serta dianalisis nya menggunakan BlastN. Hasilnya mengkonfirmasi fragmen cDNA terklon berukuran 698 pb sebagai daerah konservatif *ENR* tersebut mempunyai homologi tinggi dengan gen yang sama dari *O. sativa*, *O. europaea*, *B. napus*, *T. aestivum* dan *A. thaliana* masing-masing dengan *E-value* 1e-96, 7e-77, 2e-64, 5e-41 dan 3e-36. Berdasarkan hasil tersebut telah dibuat primer spesifik untuk amplifikasi cDNA daerah ujung 5'- dan 3'- gen *ENR* dari mesokarp kelapa sawit.

Pendahuluan

Sintesis asam lemak pada tanaman terjadi dalam plastid menggunakan dua sistem enzim, yaitu asetil-CoA karboksilase (ACCase) dan *Fatty Acid Synthase* (FAS). Pembentukan asam palmitat (C₁₆) memerlukan satu molekul asetil-CoA dan tujuh molekul malonil-CoA yang ditambahkan secara sekuensial untuk memasukkan dua atom karbon pada setiap tahap dan melepaskan satu molekul CO₂. Reaksi ini dikatalisis oleh FAS. Seperti halnya ACCase, sejauh ini telah diidentifikasi dua tipe FAS, yaitu tipe eukariotik (FAS I) dan tipe prokariotik (FAS II). FAS I dijumpai pada binatang dan *yeast* terdiri dari satu atau dua protein multifungsional berukuran besar yang tidak terdisosiasi, sedangkan FAS II terdapat pada bakteri dan tanaman, terdiri dari beberapa protein yang dapat terdisosiasi, masing-masing mengkatalisis satu tahapan reaksi (Sasaki *et al.*, 1995; O'Hara *et al.*, 2002).

Enoil-ACP reduktase (*ENR*) merupakan salah satu komponen FAS yang berperan dalam tahap akhir reaksi kondensasi malonil-CoA membentuk asil-ACP. Tahapan reaksi ini dipandang sebagai tahap regulator kunci dalam pemanjangan asam lemak (Heath & Rock

1995; Bergler *et al.*, 1996; Heath *et al.*, 2000). Enzim ini juga merupakan target dari beberapa senyawa anti mikroba dan herbisida (Fawcett *et al.*, 2000; O'Hara *et al.*, 2000), serta dihambat oleh palmitoil-CoA (Bergler *et al.*, 1996) dan fenilglioksal (Cottingham *et al.*, 1989).

Studi mengenai *ENR* dan kloning gen penyandinya (*ENR*) dari berbagai sumber telah banyak dilaporkan (Heath & Rock 1995; Heath *et al.*, 2000; Kater *et al.*, 1991). Fawcett *et al.* (1994) melaporkan bahwa pada *B. napus* ekspresi mRNA dari enzim ini mencapai level maksimum saat kandungan minyak juga mencapai maksimum. Sedangkan hasil penelitian kuantitatif immunoassay pada *B. napus* menunjukkan bahwa peningkatan enzim ini diperlukan untuk mempertahankan level biosintesis minyak yang tinggi. Mou *et al.* (2000) melaporkan bahwa mutan *A. thaliana* yang mengalami substitusi asam amino pada *ENR* mengalami penurunan aktivitas *ENR* dan kandungan lemak totalnya, hingga berakibat pada kematian. Hasil-hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa *ENR* memainkan peran penting dalam sintesis asam lemak dan minyak. Pada tanaman kelapa sawit penelitian mengenai enzim enoil-ACP reduktase maupun upaya kloning gennya belum pernah dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk mengklon fragmen daerah konservatif *ENR* dari mesokarp buah sawit, sebagai bagian dari upaya mengklon dan memahami regulasi ekspresi gen-gen kunci biosintesis minyak pada mesokarp buah sawit.

Bahan dan Metode

Bahan Tanaman

Sebagai bahan percobaan digunakan mesokarp buah sawit tipe Tenera yang

sedang aktif mensintesis minyak. Buah sawit dikupas kulitnya kemudian mesokarp dipotong-potong dan segera disimpan pada suhu -80°C sampai digunakan.

Isolasi RNA dari mesokarp buah sawit

RNA total diisolasi dari jaringan mesokarp dengan metode Chang *et al.* (1993) yang dimodifikasi. Jaringan mesokarp dihaluskan dalam nitrogen cair, dihomogenkan dengan bufer ekstraksi (CTAB 2%, PVP 2%, Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 25 mM, NaCl 2,0 M, spermidin 0,5 g/L dan β -Merkapto etanol 2%) pada suhu 65°C dilanjutkan dengan dua kali ekstraksi menggunakan campuran kloroform : isoamil alkohol (24:1). Setelah ditambah $\frac{1}{4}$ volume LiCl 10 M, RNA diendapkan semalam pada suhu 4°C , kemudian disentrifugasi 30 menit pada 11.000 rpm. Pelet dilarutkan dalam bufer SSTE (NaCl 1%, SDS 0,5%, Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0) dan diekstrak kembali dengan kloroform: isoamil alkohol. Setelah diendapkan dalam 2 volume etanol absolut pada suhu -20°C selama dua jam, endapan RNA dilarutkan dalam DEPC – treated water.

RNA hasil isolasi dimurnikan dari kontaminan DNA dengan cara ditambahkan 0,1 volume LiCl 8M ke dalam RNA total, kemudian campuran diinkubasi di es selama dua jam, dilanjutkan sentrifugasi 30 menit pada 13.000 rpm dengan suhu 4°C . Pelet dilarutkan dalam 200 μL DEPC – treated water, ditambah 0,1 volume Na-asetat 3M dan 2 volume etanol absolut, didinginkan pada suhu -20°C selama 30 menit. Setelah disentrifugasi, pelet dicuci dengan 70 % etanol dingin. RNA yang diperoleh diuji kualitas dan kuantitasnya dengan elektroforesis pada gel agarose 1% dan mengukur

absorbansinya pada panjang gelombang 260 dan 280 nm.

Perancangan primer dan amplifikasi fragmen daerah konservatif ENR

Amplifikasi daerah konservatif ENR dilakukan dengan RT-PCR (*Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction*). Utas pertama cDNA disintesis menggunakan kit *SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR* invitrogen dengan template RNA total dari jaringan mesokarp yang aktif mensintesis minyak, menggunakan primer acak heksamer yang tersedia dalam kit. Utas pertama cDNA selanjutnya dijadikan cetakan dalam sintesis ds-cDNA menggunakan primer *degenerate*.

Pada percobaan ini digunakan dua pasang primer *degenerate*, yaitu satu *forward primer* (ENRF) dan dua *reverse primer* (ENRR1 dan ENRR2). Primer ENRF(5'-TGGRYTKCCHRTYGATYTG AG-3'), dirancang berdasarkan nukleotida hasil translasi balik polipeptida yang mempunyai homologi dengan gen ENR dari tanaman lain (Budiani *et al.*, 2002), dikombinasikan dengan hasil penjajaran cDNA/ mRNA gen yang sama dari berbagai tanaman. Sedangkan ENRR1 (5'-GGCTTCYYAAW GGAC CYG-3') dan ENRR2(5'-YYAAWGGACCYGCAGAK ATG-3') dirancang berdasarkan hasil penjajaran daerah konservatif ENR dari berbagai tanaman lain. Penjajaran ENR dari beberapa tanaman lain dilakukan menggunakan program ClustalW dari BioEdit (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), sedangkan perancangan primer dilakukan menggunakan program Primer3 (<http://www.biotech.uconn.edu/primer3/>). Penampilan grafis hasil penjajaran daerah konservatif gen ENR dan posisi primer

ENRF, ENRR1 dan ENRR2 disajikan pada Gambar 1.

Untuk mendapatkan kondisi amplifikasi yang optimum, PCR dilakukan pada suhu penempelan 53°C-60°C dan konsentrasi MgCl₂ 1,5; 2,0 dan 2,5 mM. Hasil RT-PCR dicek pada gel agarosa 0,8%.

Kloning dan analisis DNA hasil amplifikasi

Fragmen DNA hasil amplifikasi yang diperkirakan berukuran sekitar 700 pb dimurnikan dari gel menggunakan kit *QIAquick Gel Extraction* dari QIAGEN. Fragmen hasil RT-PCR tersebut diklon dan dianalisis DNANYA menggunakan BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Apabila hasil analisis DNA menunjukkan bahwa fragmen DNA tersebut benar merupakan fragmen daerah konservatif gen *ENR* (mempunyai homologi yang tinggi dengan fragmen daerah konservatif gen yang sama dari berbagai tanaman lain), maka tahapan selanjutnya adalah ligasi fragmen DNA pada vektor kloning pCR2.1-TOPO. Ligasi dilakukan menggunakan enzim T4-DNA ligase sesuai petunjuk teknis yang disarankan dalam kit. Hasil ligasi pCR2.1-TOPO/*ENR* ditransfer ke *E. coli* kompeten dengan cara elektroporasi. Seleksi sel transforman dilakukan pada medium LB agar yang mengandung kanamisin 50 mg/L dan X-Gal 40 mg/L. Sel-sel yang tertransformasi pCR2.1-TOPO/*ENR* akan tumbuh membentuk koloni berwarna putih, sedangkan koloni biru adalah sel yang hanya tertransformasi pCR2.1-TOPO. Sel yang tidak tertransformasi akan mati.

Analisis adanya fragmen terklon pada koloni putih dilakukan dengan PCR menggunakan pasangan primer sama dengan yang digunakan dalam RT-PCR. Plasmid rekombinan diisolasi dari koloni

putih yang berdasarkan analisis PCR memberikan hasil positif, menggunakan kit *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN), kemudian didigesti dengan enzim restriksi *EcoRI*, disekuon dan dianalisis DNANYA untuk konfirmasi kembali kebenaran sekuen DNA terklon sebagai fragmen daerah konservatif *ENR*.

Hasil dan Pembahasan

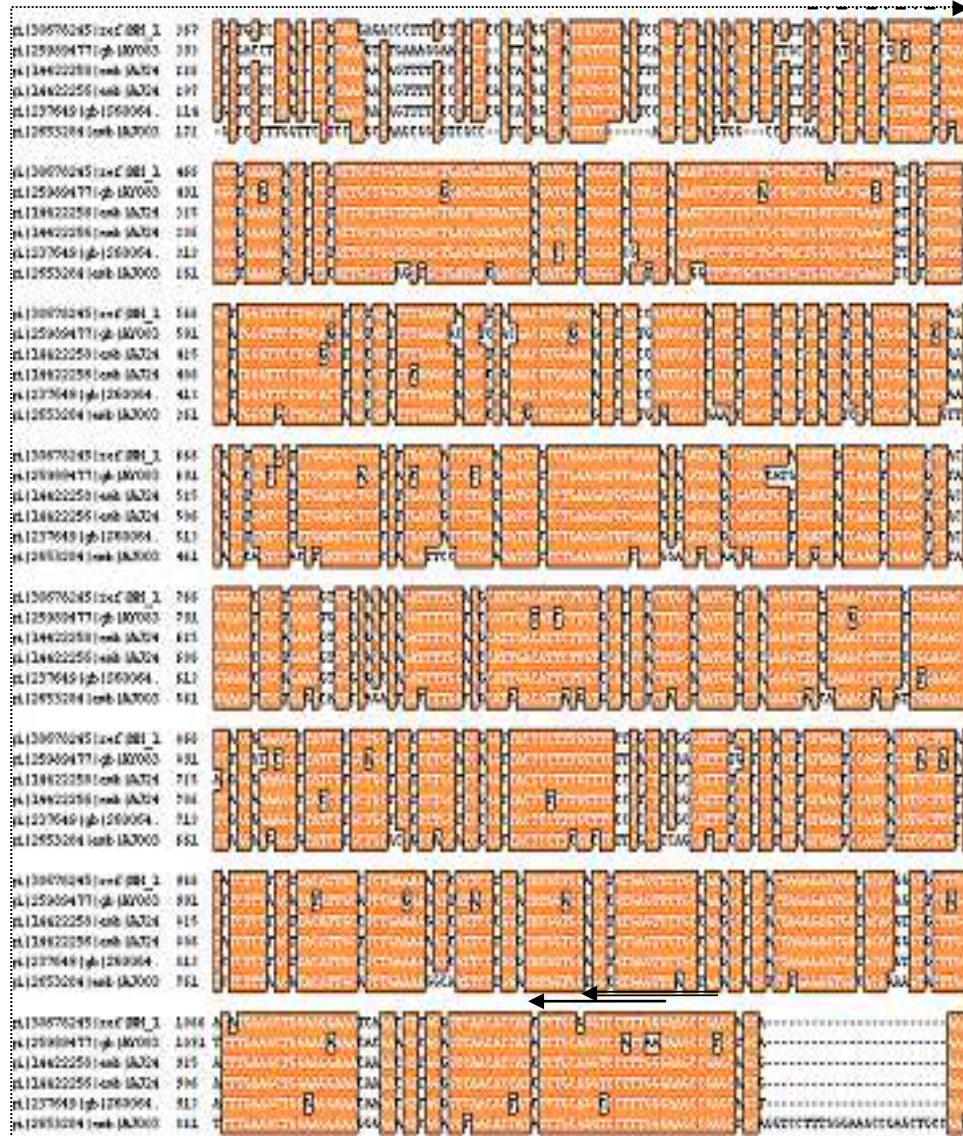
Kuantitas dan kualitas RNA hasil isolasi

Elektroforesis hasil isolasi RNA total dari jaringan mesokarp, konsentrasi dan kemurniannya disajikan pada Gambar 2. Dari gambar tersebut nampak bahwa metode Chang *et al.* (1993) yang dimodifikasi dapat menghasilkan RNA total dengan konsentrasi dan kemurnian tinggi. Kualitas RNA merupakan salah satu faktor penting dalam berbagai penelitian seperti isolasi gen atau mRNA target yang terekspresi pada organ atau tahap perkembangan tertentu. Namun, isolasi RNA dari suatu jaringan tanaman seringkali menghadapi berbagai hambatan sehingga RNA yang dihasilkan dalam keadaan terdegradasi atau terkontaminasi oleh komponen lain termasuk DNA. Saat ini berbagai prosedur isolasi RNA telah banyak dipublikasi (Chang *et al.*, 1993; Lewinsohn *et al.*, 1994; Ikoma *et al.*, 1996). Dari Gambar 2 tampak bahwa RNA dengan kemurnian dan konsentrasi yang tinggi telah diperoleh, yang kemudian digunakan sebagai templat dalam RT-PCR untuk isolasi *daerah konservatif ENR*.

Amplifikasi DNA daerah konservatif ENR

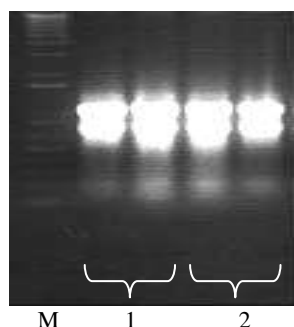
Kedua pasang primer dirancang untuk mengamplifikasi DNA berukuran sekitar

Kloning parsial gen penyandi enoil-ACP reduktase.....



Gambar 1. Penampilan grafis hasil penjajaran sekuen cDNA/mRNA daerah konservatif ENR dari berbagai tanaman dan lokasi primer (---▶ = ENRF, —▶ = ENRR1, ==▶ = ENR2).

Figure 1. Graphic view of the alignment of cDNA/mRNA ENR conserved region from several plants and the primers positions (---▶ = ENRF, —▶ = ENRR1, ==▶ = ENR2).



Gambar 2. Profil elektroforesis RNA total dari jaringan mesokarp buah kelapa sawit (1) buah muda, belum aktif men- sintesis minyak, A260/A280 = 2,1084, konsentrasi = 4,914 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, (2) buah yang sedang aktif men-sintesis minyak, A260/A280 = 2,0881, konsentrasi = 6,358 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Figure 2. Electrophoretic profile of total RNA from oil palm mesocarp (1) young fruit not yet actively synthesizing oil, $A_{260}/A_{280} = 2.1084$, concentration = 4.914 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, (2) fruit that actively synthesizing oil, $A_{260}/A_{280} = 2.0881$, concentration = 6.358 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

700 pb. Hasil RT-PCR untuk amplifikasi daerah konservatif disajikan pada Gambar 3. Gambar 3A adalah profil elektroforesis hasil RT-PCR menggunakan kedua pasang primer pada berbagai suhu penempelan. Dari gambar tersebut nampak bahwa pasangan primer ENRF dengan ENRR1 menghasilkan dua pita yang intensitasnya cukup tinggi masing-masing dengan ukuran sekitar 700 pb dan 300 pb, sedangkan primer ENRF dengan ENRR2 menghasilkan satu pita DNA yang tebal pada 500 pb. Karena primer dirancang untuk amplifikasi DNA dengan ukuran sekitar 700 pb, maka selanjutnya digunakan pasangan primer yang pertama. Pada Gambar 3B disajikan hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer ENRF

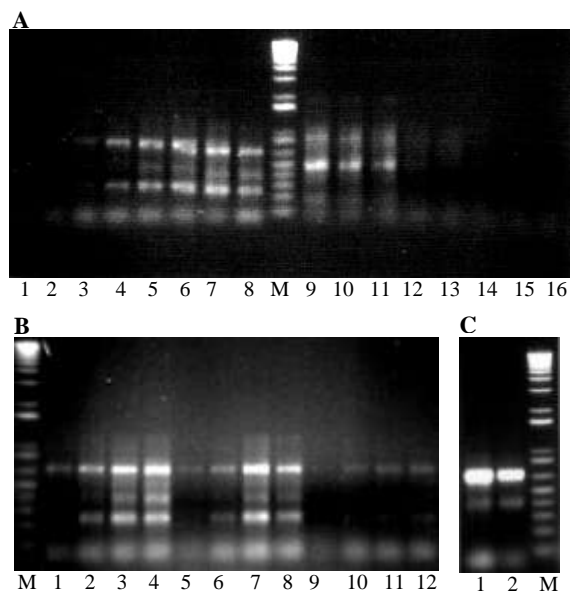
dengan ENRR1 pada berbagai suhu penempelan dan konsentrasi MgCl_2 . Berdasarkan hasil tersebut dipilih kondisi terbaik untuk amplifikasi yaitu suhu penempelan 57°C dan konsentrasi MgCl_2 sebesar 2,5 mM (Gambar 3C).

Selain spesifisitas primer, suhu penempelan dan konsentrasi MgCl_2 , keberhasilan reaksi RT-PCR juga sangat ditentukan oleh kualitas dan kuantitas RNA yang digunakan. Tingginya kualitas RNA yang digunakan dalam penelitian ini sebagaimana disajikan pada Gambar 2, merupakan salah satu penentu keberhasilan proses amplifikasi. Produk amplifikasi dipotong dan dimurnikan dari gel, kemudian diklon ke dalam *E.coli*.

Kloning dan analisis DNA fragmen hasil RT-PCR

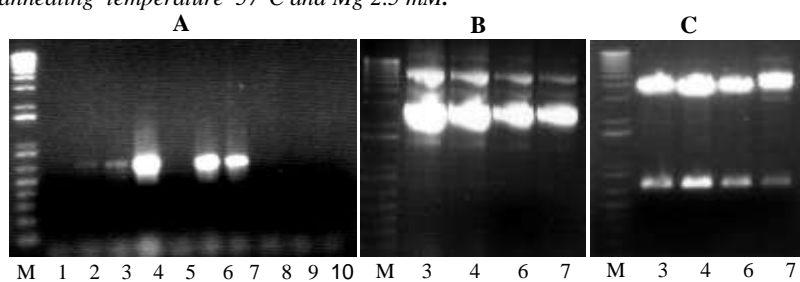
Uji PCR dari 10 koloni putih hasil transformasi produk RT-PCR ke dalam *E. coli*, yang diambil secara acak menunjukkan bahwa tidak semua koloni putih mengandung DNA sisipan yang diinginkan. Hanya lima koloni yang terbukti mengandung insert berukuran sekitar 700 pb (Gambar 4, lajur nomer 2, 3, 4, 6 dan 7). Dalam vektor kloning pCR2.1-TOPO, fragmen hasil RT-PCR terinsersi di antara dua situs *EcoRI*, sehingga verifikasi adanya DNA sisipan dilakukan dengan digesti plasmid rekombinan menggunakan *EcoRI*. Hasil digesti empat dari lima koloni tersebut, menggunakan enzim restriksi *EcoRI* menunjukkan adanya DNA sisipan berukuran sama dengan hasil RT-PCR, yaitu sekitar 700 pb. Plasmid hasil isolasi dan digestinya disajikan pada Gambar 4. DNA hasil sekuensing fragmen terklon (Data tidak dicantumkan) dianalisis untuk penghilangan kontaminan dari vektor kloningnya, dilanjutkan dengan analisis

Kloning parsial gen penyandi enoil-ACP reduktase.....



Gambar 3. Hasil amplifikasi fragmen *ENR* (A) pada berbagai suhu penempelan (lajur 1-8 = 53-60°C, primer ENRF dan ENRR1, lajur 9-16 = 53-60 °C, primer ENRF dan ENRR2) (B) dengan primer ENRF + ENRR1, pada 56°C (lajur 1-4); 57 °C (lajur 5-8); 58 °C (lajur 9-12); Mg = 1,5 mM (lajur 1, 5 dan 9); 2,0 mM (lajur 2, 6 dan 10); 2,5 mM (lajur 3, 7 dan 11); dan 3 mM (lajur 4, 8, dan 12). (C) Gel preparatif dari hasil amplifikasi pada suhu penempelan 57°C, Mg 2,5 mM.

Figure 3. Amplification products of *ENR* fragment (A) at several annealing temperatures (lanes 1-8 = 53- 60 °C, *ENRF* and *ENRR1* primer, lanes 9-16 = 53-60°C *ENRF* and *ENRR2*, primer) (B) using *ENRF* + *ENRR1* primer, at 56°C (lanes 1-4); 57°C (lanes 5-8); 58 °C (lanes 9-12); Mg=1.5 mM (lanes 1, 5 and 9); 2.0 mM (lanes 2, 6 and 10); 2.5 mM (lanes 3, 7 and 11); and 3 mM (lanes 4, 8, and 12). (C) Preparative gel of amplification products at annealing temperature 57°C and Mg 2.5 mM.



Gambar 4. (A) Analisis PCR dari 10 koloni putih hasil transformasi menggunakan fragmen daerah konservatif *ENR*. (B) Plasmid rekombinan hasil isolasi dari koloni no 3, 4, 6 dan 7 tanpa digesti dan (C) yang didigesti dengan *EcoRI*.

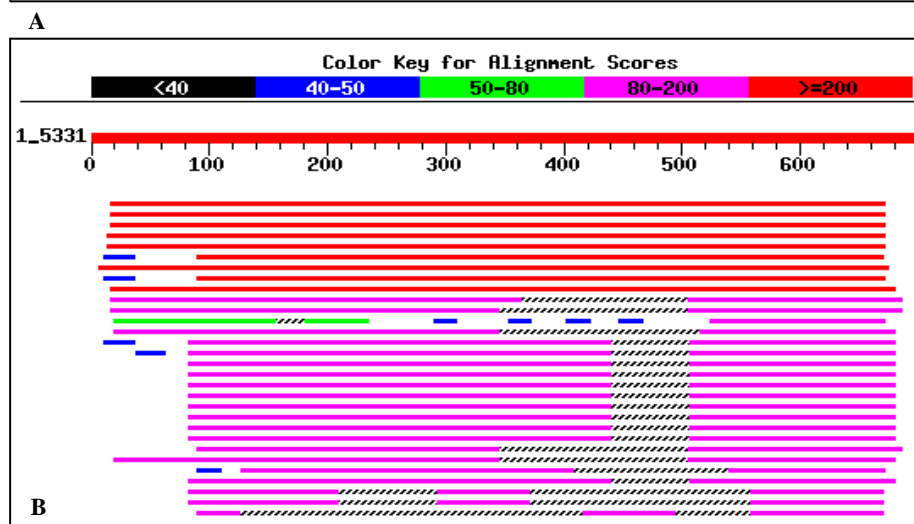
Figure 4. (A) PCR analysis of white colonies of transformation results using *ENR* conserved region fragment. (B) recombinant plasmid isolated from colonies no. 3, 4, 6 and 7, undigested, and (C) digested with *EcoRI*.

Tabel 1. Enam spesies tanaman yang menunjukkan homologi tinggi dengan fragmen *ENR* terklon berdasarkan skor (bit) dan *E-value*.

Table 1. Six plant species showing high homology with the cloned *ENR* based on the score bit and *E-value*.

No.	Spesies	Skor (bit)	<i>E-value</i>
1.	<i>Oryza sativa</i> mRNA eno1l ACP reduktase	361	1e - 96
2.	<i>Olea europaea</i> subsp. europaea ENR	266	7e - 77
3.	<i>Brasica napus</i> ENR isoform B1 (gen enrB1)	254	2e - 64
4.	<i>Brasica napus</i> ENR isoform A2	188	1e - 44
5.	<i>Triticum aestivum</i> ENR	177	5e - 41
6.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	161	3e - 36

5'-GCCCTTGGCTTCTTAATGGACCTGCAGATATTGTATTCACCTCTAATCTTGTGCT TCC
 TCCCTGCTTCAAAAGCTAGCACCATAGTGTGCTCTCTAGGGCTGCTTTTGCTGAACTC
 ATGCCCTCACCATAACCAGGAATGGTCCCTTTCAGAAGCAACGTATGTCAAGGAGATTG
 AAGCACCACCTGGATTCTAATTGGAAGGAAGTGCTTAAGTAGTGATACAAAAGAAT
 AACTTGATGCAGATATAGCAGCAAGGTATCCCTTTCTAGATGTCTCCAAGAGAGGCTT
 GGTGACCTCTGGTCCATTTGCTAGTGAAATGAACAAGAATGTCTATGCTTCCAAAATCA
 TTCTTGACAGATTCAGCTACTTCCTTACAGTCCAATTTGAGGCACCTGCATAACGTTT
 GTTTGTTCTAACATCATCAGGAACATCCTCAGGAGTATCATAAACTGCATCCAATGGG
 TATACTTTGATGATCTCCATAAGAGAACCATTGGGCAACCTGCGTGACTCATCGAATT
 TGCCACGTCTTAAGCTAGTCTCAAAAATGTTAAGTGCAGGCACCCATGTACCAACGAG
 AATTTACAGACCGGCAGCAGCAAGAGCCTTAGCRATGGCCCAACCATAGCCATTATCA
 TCAGCTACACCAGCAACAAATGCCCTTTTACcTCTCaAATCAACAGGAAACCCAAAGG
 gC -3' (698 pb)



Gambar 5. Urutan nukleotida (A) dan hasil analisis BlastN (B) fragment *ENR* terklon .

Figure 5. Nucleotides sequence (A) and the result of BlastN analysis (B) of the cloned *ENR* fragment.

homologi terhadap DNA gen yang sama dari tanaman lain menggunakan BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Hasil analisis menunjukkan bahwa DNA terklon berukuran 698 pb dan mempunyai homologi dengan fragmen daerah konservatif *ENR* dari berbagai spesies tanaman, di antaranya dengan *O. sativa*, *O. europaea*, *B. napus*, *T. aestivum* dan *A. thaliana* masing-masing dengan *E-value* $1e-96$, $7e-77$, $2e-64$, $5e-41$ dan $3e-36$ (Gambar 5 dan Tabel 1). Menurut Claveri & Notterdame (2002) nilai-nilai tersebut mengindikasikan ekivalensi yang tinggi dengan gen sejenis dari berbagai spesies tanaman tersebut. Suatu DNA dinilai memiliki homologi tinggi apabila memiliki *E-value* (nilai peluang) maksimal 10^{-4} ($e-4$) atau mencapai skor minimal 50 bits. Makin rendah *E-value* dan makin tinggi skor, makin signifikan dan makin tinggi homologi protein atau nukleotida yang dianalisis. Pada Gambar 5 tersebut hanya ditampilkan enam spesies yang menunjukkan homologi tertinggi dengan DNA fragmen terklon.

Meskipun studi mengenai *ENR* dan kloning gennya dari berbagai sumber telah dilaporkan, namun sejauh ini belum ditemukan publikasi mengenai kloning gen tersebut maupun analisis aktivitas enzimnya dari kelapa sawit. Keberhasilan mengklon fragmen daerah konservatif *ENR* dalam penelitian ini membuka beberapa peluang penelitian lebih jauh. Saat ini, berdasarkan sekuen fragmen terklon telah dirancang pasangan primer baru untuk mengamplifikasi cDNA daerah ujung 5'- dan 3'- *ENR*. Dengan pendekatan RACE (*Rapid Amplification of cDNA End*), kedua daerah ujung gen tersebut juga telah berhasil diamplifikasi. Untuk memperoleh gen lengkapnya (*full length-gene*), kedua daerah ujung yang

saling *overlap* tersebut dapat diligasi, setelah terlebih dahulu didigesti menggunakan enzim restriksi tertentu yang memotong pada satu situs pengenalan di daerah yang *overlap*. Di samping itu tanpa harus mengklon gen lengkapnya, fragmen DNA daerah konservatif *ENR* yang dihasilkan dalam penelitian ini juga akan digunakan untuk mempelajari ekspresi gen tersebut pada berbagai organ dan fase perkembangan buah kelapa sawit. Studi tersebut akan sangat membantu strategi pengembangan marka rendemen minyak tinggi maupun dalam rekayasa metabolisme untuk merakit tanaman kelapa sawit dengan rendemen minyak tinggi.

Kesimpulan

Dengan primer *degenerate* heterologus, fragmen DNA daerah konservatif *ENR* dari mesokarp buah kelapa sawit dapat diamplifikasi dan diklon. Sekuen DNA tersebut menunjukkan homologi yang tinggi dengan sekuen DNA gen yang sama dari *O. sativa*, *O. europaea*, *B. napus*, *T. aestivum* dan *A. thaliana* masing-masing dengan *E-value* $1e-96$, $7e-77$, $2e-64$, $5e-41$ dan $3e-36$.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Basil J. Nikolau di Laboratorium Biochemistry, Biophysics and Molekuler Biology, Iowa State University, Ames, Iowa – Amerika Serikat. Penelitian ini dibiayai oleh Proyek Penelitian Genetika dan Bioteknologi Pertanian APBN 2004 dengan kode proyek 02.1.01388801. 18.11.01 dan Proyek Pengendalian Hama Terpadu (PHT) Perkebunan, Badan Litbang Pertanian tahun 2004.

Daftar Pustaka

- Bergler, H., S. Fuchsbichler, G. Hogenauer & F. Turnowsky (1996). The enoyl-(acyl-carrier-protein) reductase (*FabI*) of *Escherichia coli*, which catalyzes a key regulatory step in Fatty acid biosynthesis, accept NADH and NADPH as cofactors and is inhibited by palmitoil-CoA. *Eur. J. Biochem.*, **15**, 689-694.
- Budiani, A., D. Santoso, H. Aswidinnoor, A. Suwanto & S. Sudiarto (2002). Isolation and characterization of protein differentially expressed during fruit development of oil palm. *Menara Perkebunan*, 2002, **70** (1), 1-11.
- 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.
- Claverie, J. & C. Notredame (2003). *Bioinformatics for Dummies*. New York, John Wiley & Sons Publ. p. 215-238.
- Cottingham, I.R., A.J. Austin & A.R. Slabas (1989) Inhibition and covalent modification of rape seed (*Brassica napus*) enoyl ACP reductase by phenylglyoxal. *Biochim. Biophys. Acta*, **995**, 273-278.
- Fawcett, T., J.W. Simon, R. Swinhoe, J. Shanklin, I. Nishida, W.W. Christie & A.R. Slabas (1994). Expression of mRNA and steady-state levels of protein isoform of enoyl-ACP reductase from *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.*, **26**, 155-163.
- Fawcett, T., C.L. Copse, J.W. Simon & A.R. Slabas (2000). Kinetic mechanism of NAD-enoyl-ACP reductase from *Brassica napus*. PMID: 11163788 [PubMed – indexed for MEDLINE], *FEBS Letters*, **2**, 65-68.
- Heath, R. J. & C. O. Rock (1995). Regulation of malonyl-CoA metabolism by acyl-acyl carrier protein and ketoacyl-acyl carrier protein synthetase in *Escherichia coli*. (JBC Online) *The American Society for Biochem. Mol. Biol.*, **270** 15531-15538.
- Heath, R.J., N. Su, C.K. Murphy & C.O. Rock (2000). The enoyl-(acyl-carrier-protein) reductase *FabI* and *FabL* from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 40128 – 40133.
- Ikoma, Y., M. Yano, K. Ogawa, T. Yoshioka, Z.C. Xu, S. Hisada, M. Omura & T. Moriguchi (1996). Isolation and evaluation of RNA from polysaccharide-rich tissues in fruit for quality by cDNA library construction and RT-PCR. *J. Japan Soc. Hort. Sci.*, **63**, 809- 814.
- Kater, M.M., G.M. Koningstein, H.J. Nijkamp & A.R. Stuitje (1991). cDNA cloning and expression of *Brassica napus* enoyl-acyl carrier protein reductase in *Escherichia coli*. *Plant Mol. Biol.*, **17**, 895-909.
- Lewinsohn, E., L.C. Steel & R. Croteau. (1994). Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms. *Plant Mol. Biol. Rep.* **12**: 20-25.
- Mou, Z., Y. He, Y. Dai, X. Liu & J. Li. (2000). Deficiency in fatty acid synthase leads to premature cell death and dramatic alteration in plant morphology. *Plant Cell*, **12**, 405-418.
- O'Hara, P., R. A. Slabas & T. Fawcett. (2000). Expression of fatty acid and lipid biosynthetic genes. *Biochem. Soc. Trans.*, **28**, 617 -619.
- O'Hara, P., R. A. Slabas & T. Fawcett. (2002). Fatty acid and lipid biosynthetic genes are expressed at constant molar ratios but different absolute levels during embryogenesis. *Plant Physiol.*, **129**, 310 – 320.
- Sasaki, Y., T. Konishi & Y. Nagano (1995). The compartmentation of Acetyl-Coenzyme A Carboxylase in Plants. *Plant Physiol.*, **108**, 445-449.