

## Eksresi gen penyandi ACCase subunit biotin karboksilase dari mesokarp buah kelapa sawit pada *Escherichia coli*

*Expression of gene encoding ACCase subunit biotin carboxylase from oil palm fruit mesocarp in Escherichia coli*

Asmini BUDIANI\*)

Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Jl. Taman Kencana No. 1 Bogor 16128, Indonesia

Diterima tanggal 6 Maret 2014/disetujui tanggal 30 Juni 2014

### Abstract

*Production of palm oil could be increased, one of which is by increasing oil content in the mesocarp of oil palm. This might be done by increasing the activity of key enzymes of the oil biosynthesis pathway in the oil palm mesocarp. Acetyl-CoA carboxylase has been reported as the enzyme that plays important role in oil accumulation in the oil palm mesocarp. Gene encoding one subunit of ACCase, biotin carboxylase (BC) had been isolated from oil palm mesocarp and cloned in E. coli. This research was aimed to examine the expression of the cloned BC gene in the E. coli. The cloned cDNA encoding BC was reisolated from recombinant E. coli by PCR using specific primers. The PCR products were verified in the agarose gel, and then ligated to pTrcHis-TOPO expression vector. The ligation product, recombinant vector pTrcHis-TOPO/BC, was introduced into E. coli XLI-Blue. Recombinant colonies grew in the selection media were analyzed using PCR to confirm the existent of the target DNA. The colonies, which have been confirmed to contain target DNA were then subcultured in the LB media, for extraction of total protein. The protein extract was then analyzed quantitatively by Lowry method, and qualitatively by electrophoresis on SDS polyacrylamide gel. The result showed that recombinant plasmid pTrcHis-TOPO/BC has been successfully inserted into E. coli XLI-Blue. SDS-PAGE analysis of the extracted protein showed that recombinant E. coli produced specific protein with MW of about 43 kDa, much higher compared with that of untransformed E. coli. This results demonstrate that the cloned BC was strongly expressed in E. coli.*

[Keywords: Palm oil, oil biosynthesis, over expression, acetyl-CoA carboxylase]

### Abastrak

Produksi minyak sawit dapat ditingkatkan, salah satunya dengan meningkatkan rendemen minyak. Hal ini dapat dilakukan dengan cara meningkatkan aktivitas enzim kunci biosintesis minyak pada mesokarp buah sawit. Acetyl-CoA carboxylase telah dilaporkan merupakan enzim yang berperan penting dalam akumulasi minyak pada mesokarp kelapa sawit. Pada penelitian sebelumnya, gen penyandi salah satu subunit ACCase, yaitu biotin carboxylase (BC), telah diisolasi dari jaringan mesokarp kelapa sawit dan diklon pada *E.coli*. Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji ekspresi gen tersebut pada *E. coli*. cDNA penyandi BC diisolasi kembali dari *E. coli* rekombinan dengan PCR menggunakan pasangan primer spesifik. Hasil isolasi diverifikasi pada gel agarose, kemudian diligasasi dengan vektor ekspresi pTrcHis-TOPO. Vektor rekombinan (pTrcHis-

\*) Penulis korespondensi: asminib@yahoo.com

TOPO/BC) hasil ligasi diintroduksi ke dalam *E. coli* XLI-Blue. Koloni rekombinan yang tumbuh pada media seleksi dianalisis menggunakan PCR untuk mengkonfirmasi ada tidaknya sisipan DNA target. Koloni yang terbukti mengandung sisipan DNA target dikulturkan pada media LB kemudian protein total diekstrak dari kultur *E. coli* dan dianalisis dengan elektroforesis SDS-PAGE. Hasil PCR koloni menunjukkan bahwa transformasi *E. coli* XLI-Blue menggunakan konstruk vektor rekombinan pTrcHis-TOPO/BC berhasil baik. Analisis SDS-PAGE dari ekstrak protein menunjukkan bahwa *E. coli* rekombinan menghasilkan protein dengan berat molekul sekitar 43 kDa yang intensitasnya jauh lebih tinggi dibandingkan dengan protein yang sama yang dihasilkan oleh *E. coli* yang tidak ditransformasi. Hal ini membuktikan bahwa gen penyandi BC dalam vektor pTrcHis-TOPO dapat diekspresikan dengan kuat pada *E. coli*.

[Kata kunci: Minyak sawit, biosintesis minyak, over-ekspresi, acetyl-CoA carboxylase]

### Pendahuluan

Rendemen minyak merupakan salah satu komponen penting dari produktivitas kelapa sawit. Di samping peningkatan berat tandan, usaha peningkatan produksi minyak sawit juga dapat dilakukan dengan peningkatan rendemen minyak. Meskipun penelitian konvensional telah memberikan kontribusi yang signifikan dalam peningkatan produktivitas tanaman kelapa sawit, namun pemuliaan untuk menghasilkan bibit kelapa sawit dengan rendemen minyak tinggi belum banyak dilaporkan, dan upaya demikian akan terkendala oleh lamanya masa seleksi serta sempitnya keragaman genetik yang tersedia. Oleh karena itu diperlukan teknologi alternatif sehingga pemuliaan untuk menghasilkan bahan tanam kelapa sawit unggul dengan rendemen minyak tinggi dapat dilakukan dengan lebih cepat. Salah satu pendekatan yang dinilai sangat potensial adalah melalui bioteknologi molekuler, dengan cara mengoverekspresikan gen kunci dalam biosintesis minyak sawit.

Biosintesis minyak merupakan serangkaian reaksi yang melibatkan banyak enzim, salah satunya adalah Acetyl-CoA carboxylase (ACCase). ACCase telah diketahui merupakan penentu dalam biosintesis minyak pada berbagai tanaman termasuk kelapa sawit (Francki *et al.*, 2002; Budiani, 2005). Enzim ini berperan dalam reaksi pembentukan malonyl-CoA

dari acetyl-CoA, tahapan kunci dalam sintesis asam lemak (Tong, 2005). Di samping sebagai komponen penyusun minyak/triasilgliserol, asam lemak juga merupakan penyusun membran dan kutikula (Kunst & Samuels, 2003), serta diperlukan dalam sintesis berbagai senyawa yang berperan dalam sistem pertahanan tanaman (Kachroo & Kachroo, 2009). Gen penyandi ACCase juga dinilai merupakan target gen yang penting dalam pengembangan tanaman transgenik penghasil minyak dan biodiesel (Jigiong *et al.*, 2011). Pada mamalia deposisi lemak pada hati diketahui menjadi penyebab berbagai penyakit. Chajes *et al.* (2006) mengemukakan bahwa ACCase berperan penting untuk mempertahankan daya hidup sel-sel kanker payudara.

Di sisi lain, studi genetik ACCase pada bakteri menunjukkan bahwa ACCase sangat diperlukan untuk pertumbuhan *in vitro* berbagai bakteri (Salama *et al.*, 2004; Payne *et al.*, 2007). Oleh karena itu, dalam bidang kedokteran ACCase menjadi objek penelitian yang sangat intensif untuk pengembangan obat terhadap obesitas, diabetes, kanker dan beberapa penyakit akibat infeksi mikroba (Tong & Harwood Jr, 2006; Wright & Reynolds, 2007; Parsons & Rock, 2011). Struktur, fungsi, kontrol aktivitas dan mekanisme inhibitor enzim ini telah banyak diteliti (Zhang *et al.*, 2004; Tong, 2005, Polyak *et al.*, 2012).

Dua jenis ACCase, yaitu multi subunit atau heteromerik dan multi fungsional atau homomerik telah diidentifikasi pada sebagian besar tanaman. ACCase heteromerik, terdapat dalam plastid dan terdiri dari empat subunit yang dapat dipisahkan, yaitu biotin carboxy-lase (BC), yang berfungsi mentransfer gugus carboxyl ke biotin, biotin-carboxyl carrier protein (BCCP) yaitu situs untuk pengikatan biotin, dan carboxyl transferase (CT)  $\alpha$  dan  $\beta$ , yang mentransfer gugus carboxyl dari biotin ke senyawa lainnya. ACCase homomerik terdapat dalam sitosol dan merupakan protein tunggal yang memiliki domain BC, BCCP dan CT (Ke *et al.*, 2000; Nikolau *et al.*, 2003).

Keberadaan ACCase homomerik atau hm-ACCase dan ACCase heteromerik atau ht-ACCase telah dikonfirmasi pada mesokarp kelapa sawit, namun peran ht-ACCase dalam akumulasi minyak sawit lebih besar dibandingkan peran hm-ACCase. (Budiani, 2005). Peningkatan aktivitas ACCase pada mesokarp kelapa sawit mulai dideteksi dari buah berumur 14 minggu hingga umur 20 minggu setelah anthesis. Hasil elektroforesis protein pada gel SDS-poliakrilamid menunjukkan adanya dua protein yang konsentrasinya meningkat sejalan dengan peningkatan kandungan minyak. Analisis sekuen asam amino dari protein tersebut menghasilkan beberapa polipeptida yang mempunyai homologi dengan gen penyandi ACCase subunit BC, gen penyandi enoyl-ACP reductase dan glyceraldehyde-3P dehydrogenase (Budiani *et al.*, 2008). Hasil tersebut membuktikan bahwa ACCase merupakan salah satu enzim yang berperan penting dalam akumulasi minyak pada mesokarp buah sawit. cDNA lengkap penyandi ACCase

subunit biotin carboxylase (BC) telah diklon (Budiani *et al.*, 2013). Penelitian ini bertujuan untuk menguji ekspresi cDNA penyandi ACCase subunit BC yang telah diklon pada *Escherichia coli*.

## Bahan dan Metode

Bahan yang digunakan dalam kegiatan penelitian ini adalah sel *E. coli* rekombinan yang mengandung cDNA lengkap penyandi ACCase subunit biotin karboksilase (BC) dari mesokarp kelapa sawit yang disimpan dalam gliserol pada freezer bersuhu  $-40^{\circ}\text{C}$ .

*Isolasi cDNA lengkap penyandi BC terklon dari E. coli rekombinan*

*E. coli* rekombinan yang mengandung vector pGEM-T pembawa cDNA penyandi ACCase subunit BC (pGEM-T/BC) diremajakan dalam LB cair selama 16 jam. *E. coli* rekombinan yang tumbuh kemudian dipanen dengan sentrifugasi pada 10.000 rpm selama lima menit. Isolasi plasmid rekombinan pGEM-T/BC dari sel *E. coli* dilakukan menggunakan kit *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN). Plasmid rekombinan hasil isolasi dicek ukurannya pada gel agarose. Sementara itu, keberadaan cDNA penyandi ACCase subunit BC pada plasmid rekombinan diketahui berdasarkan ukuran plasmid hasil isolasi pada gel agarosa, dan hasil amplifikasi cDNA penyandi BC dengan templat DNA plasmid rekombinan menggunakan sepasang primer yang spesifik untuk gen tersebut, yaitu FLBCF/R. Primer tersebut dirancang menggunakan program Primer3 berdasarkan sekuen DNA penyandi BC yang telah diperoleh sebelumnya (Budiani *et al.*, 2013). Di samping itu, PCR juga dilakukan menggunakan primer SP6 dan T7 untuk memastikan bahwa fragmen DNA yang diamplifikasi adalah sisipan DNA target dalam plasmid, karena kedua primer tersebut mengapit DNA target yang dibawa. Selanjutnya hasil PCR diverifikasi pada gel agarosa.

*Konstruksi vektor rekombinan pTrcHis-TOPO/BC dan introduksinya ke dalam E.coli XL1-Blue*

cDNA penyandi BC yang telah diisolasi dari plasmid rekombinan pGEM-T/BC, diligasikan pada vektor ekspresi pTrcHis-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen life technologies) untuk diekspresikan di *E. coli*. Campuran ligasi yang terdiri dari produk PCR (cDNA penyandi BC) (4  $\mu\text{L}$ ) dan vektor pTrcHis-TOPO<sup>®</sup> (1  $\mu\text{L}$ ), diinkubasi lima menit. Selanjutnya digunakan dua prosedur untuk mengintroduksi plasmid rekombinan hasil ligasi, yaitu: (i) sebanyak 2  $\mu\text{L}$  campuran ligasi diinkubasi selama lima menit pada suhu kamar, dilanjutkan introduksi hasil ligasi ke *E. coli*, dan (ii) sisa campuran ligasi (3  $\mu\text{L}$ ) disimpan terlebih dahulu pada  $-20^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam, sebelum diintroduksi ke *E. coli*.

Introduksi vektor rekombinan hasil ligasi ke dalam sel kompeten *E. coli* XL-1 Blue dilakukan dengan teknik kejutan panas. Setelah diinkubasi di es selama 30 menit, campuran diinkubasi pada suhu  $42^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, kemudian didinginkan kembali

dalam es. Setelah ditambah media SOC 250  $\mu$ L dan dikocok 150 rpm pada suhu 37 °C selama satu jam, sel *E. coli* dikulturkan pada media LB yang mengandung ampicilin 50  $\mu$ g/mL dan glukosa 0,5%, selama semalam pada suhu 37 °C. Keberadaan cDNA penyandi BC dalam koloni berwarna putih yang dihasilkan dikonfirmasi dengan PCR menggunakan primer spesifik BC. Plasmid rekombinan diisolasi kembali dari koloni yang positif mengandung cDNA penyandi BC tersebut menggunakan kit *High Pure Plasmid Isolation* (Roche)

#### Uji ekspresi BC dalam *E. coli* rekombinan

Pengujian ekspresi cDNA penyandi BC terklon dilakukan dengan mengekstrak protein dari kultur *E. coli* XL-1 Blue hasil transformasi dengan plasmid rekombinan pTrcHis-TOPO/BC maupun kultur *E. coli* XL-1 Blue *native* yang tidak ditransformasi. Untuk mengekstrak protein, sel *E. coli* dikulturkan pada media LB + ampicilin 50  $\mu$ g/mL + glukosa 0,5% semalam pada suhu 37 °C. Setelah disentrifus, pellet dilarutkan dalam 1 mL bufer lisis (Tris HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 5 mM, dan NaCl 100 mM). Supernatan yang diperoleh dipisahkan, kemudian konsentrasi protein dalam supernatan dan dalam pellet ditentukan dengan metode Lowry (Waterborg, 2002). Ekstrak protein dianalisis pola proteinnya dengan elektroforesis pada gel SDS-poliakrilamid (SDS-PAGE).

### Hasil dan Pembahasan

#### Isolasi gen penyandi BC terklon dari *E. coli* rekombinan

Susunan nukleotida dari primer yang digunakan untuk mengamplifikasi cDNA penyandi BC dari plasmid rekombinan pGEM-T/BC dan dari plasmid rekombinan pTrcHis-TOPO<sup>®</sup>/BC disajikan pada Tabel 1. Primer SP6 dan T7 digunakan untuk menguatkan atau meyakinkan bahwa produk PCR yang diisolasi adalah benar berdasarkan ukurannya pada gel poliakrilamid.

Gambar 1A menyajikan hasil isolasi plasmid rekombinan pGEM-T/BC yang diisolasi dari kultur *E. coli* rekombinan, sedangkan Gambar 1B memperlihatkan hasil isolasi kembali cDNA penyandi BC dari plasmid rekombinan dengan PCR menggunakan

Tabel 1. Susunan nukleotida primer yang digunakan untuk isolasi kembali cDNA penyandi BC

Table 1. Nucleotide sequence of primers used for reisolation of the cDNA encoding BC

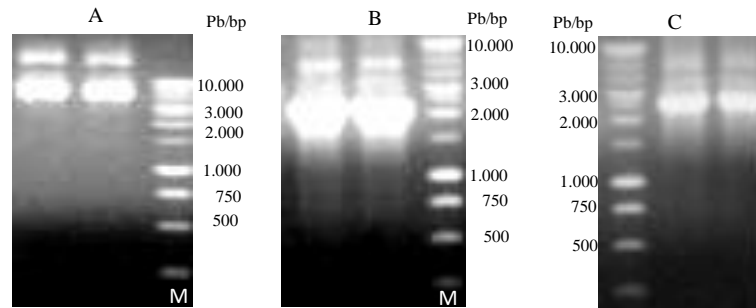
Primer	Susunan nukleotida (Nucleotide sequence)
FLBC-F	5'- AGTACGCGGGGATCTCTTCT - 3'
FLBC-R	5'- CCCAAATTGTTTCCAAGCAG - 3'
SP6	5'- ATTTAGGTGACACTATAG -3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
pTrcHis-F	5'-GAGGTATATATTAATGTATCG-3'
pTrcHis-R	5'-GATTTAATCTGTATCAGG-3'

primer FLBC-F/R. Gambar 1C adalah hasil isolasi cDNA yang sama menggunakan primer SP6/T7. Nampak bahwa produk amplifikasi dari Gambar 1A memiliki ukuran yang sesuai dengan plasmid rekombinan yang membawa cDNA penyandi BC terklon yaitu sekitar 5200 pb. Ukuran vektor pGEM-T adalah 3000 pb sehingga ukuran fragmen DNA yang dibawa diperkirakan sekitar 2200 pb. Hal ini sesuai dengan hasil pada Gambar 1B yang memperlihatkan fragmen DNA hasil amplifikasi dengan primer FLBC-F/R dengan ukuran sekitar 2200 pb, ukuran yang sama dengan cDNA lengkap penyandi BC. Amplifikasi menggunakan primer SP6/T7 menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran sedikit lebih besar dari ukuran fragmen yang dihasilkan dari amplifikasi dengan primer FLBC-F/R (Gambar 1C). Hal ini karena posisi primer T7 pada vektor kloning pGEM-T adalah sekitar 50 basa di atas gen tersisip, sedangkan primer SP6 berada pada posisi sekitar 70 basa di bawah gen tersisip (Gambar 2A). Hasil tersebut menunjukkan kestabilan gen penyandi BC yang diklon dalam *E. coli* menggunakan vektor pGEM-T Easy.

#### Konstruksi vektor rekombinan pTrcHis-TOPO<sup>®</sup>/BC dan introduksinya ke dalam *E. coli* XLI-Blue

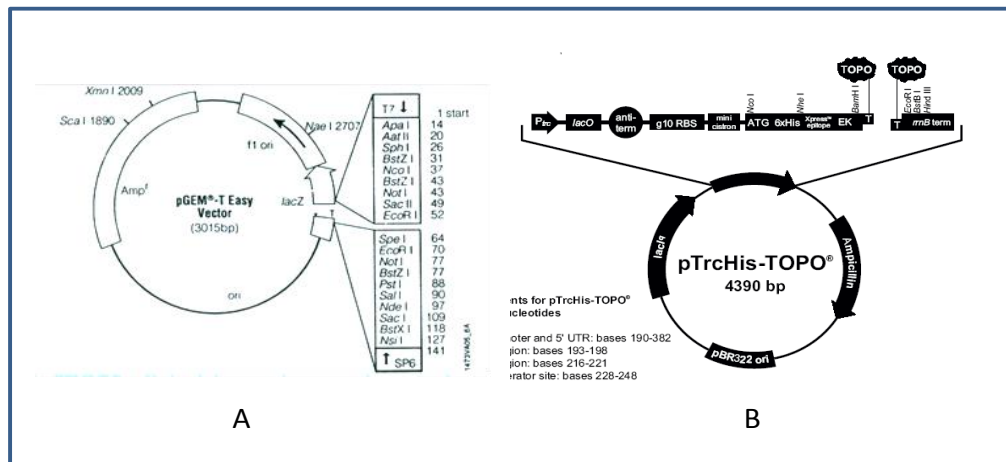
Ligasi cDNA penyandi BC (sekitar 2200 pb) ke vektor pTrcHis-TOPO<sup>®</sup> yang berukuran 4390 pb (Gambar 2B) akan menghasilkan vektor rekombinan pTrcHis-TOPO<sup>®</sup>/BC dengan ukuran sekitar 6,5 kb. Introduksi vektor rekombinan pTrcHis-TOPO<sup>®</sup>/BC ke dalam *E. coli* akan menghasilkan *E. coli* rekombinan yang tumbuh pada media seleksi. Hasil analisis PCR koloni produk transformasi yang tumbuh pada media seleksi disajikan pada Gambar 3. Dua prosedur transformasi yang berbeda menghasilkan jumlah koloni rekombinan yang berbeda. Prosedur pertama, yaitu campuran ligasi diinkubasi lima menit pada suhu kamar, volume sel transforman yang dikultur pada media seleksi sebanyak 10  $\mu$ L dan 50  $\mu$ L; sedangkan prosedur kedua, sisa campuran ligasi pertama disimpan 24 jam pada -20 °C sebelum digunakan untuk transformasi, dan volume sel hasil transformasi yang dikulturkan pada media seleksi adalah 100  $\mu$ L dan 200  $\mu$ L. Kedua prosedur tersebut menghasilkan jumlah koloni transforman yang berbeda setelah dikulturkan pada media seleksi. Prosedur pertama hanya menghasilkan satu koloni putih, sedangkan prosedur kedua menghasilkan masing-masing 16 dan 17 koloni putih. Hasil analisis PCR dari koloni putih yang diperoleh disajikan pada Gambar 3. Nampak koloni dari prosedur (1) dan dua koloni dari prosedur (2) yang teruji mengandung sisipan DNA berukuran lebih kurang sama dengan ukuran BC yang diintroduksi.

Hasil isolasi plasmid rekombinan dari koloni yang telah teruji positif mengandung sisipan DNA target sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 3B dan 3C, dapat dilihat pada Gambar 4. Berdasarkan ukurannya, diharapkan plasmid tersebut adalah plasmid rekombinan yang mengandung cDNA penyandi BC.



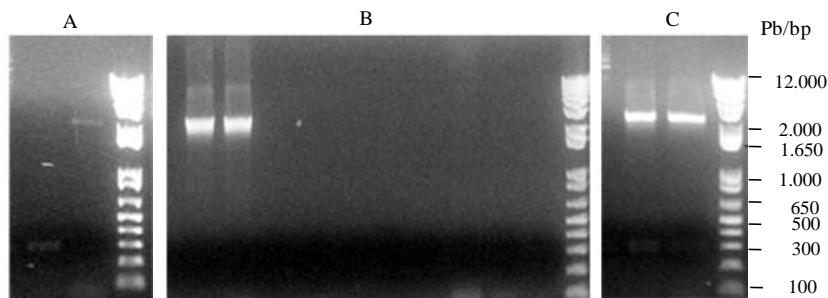
Gambar 1. Profil elektroforesis dari : (A) plasmid rekombinan pGEM-T/FLBC hasil isolasi dari dua koloni *E. coli* rekombinan, (B) cDNA penyandi BC hasil isolasi dari kedua plasmid rekombinan pGEM-T/FLBC dengan PCR menggunakan primer FLBC-F/R, dan (C) cDNA penyandi BC hasil isolasi dari kedua plasmid rekombinan dengan PCR menggunakan primer SP6/T7. M= 1 kb DNA ladder.

Figure 1. Electrophoretic profile of; (A) recombinant plasmid pGEM-T/FLBC isolated from the two colonies of recombinant *E. coli*, (B) cDNA encoding BC isolated from the two recombinant plasmids of pGEM-T/FLBC by PCR using specific primers FLBC-F/R, and (c) cDNA encoding BC isolated from the two recombinant plasmids of pGEM-T/FLBC by PCR using SP6/T7 primers.



Gambar 2. (A) Peta vektor kloning pGEM-T dan (B) peta vektor ekspresi pTrcHis-TOPO.

Figure 2. (A) Maps of pGEM-T cloning vector, and (B) pTrcHis-TOPO expression vector.



Gambar 3. Profil elektroforesis dari (A) hasil PCR koloni yang diperoleh dari prosedur transformasi pertama. (B) hasil PCR koloni dari prosedur transformasi kedua dengan primer FLBC-F/R. (C) hasil PCR kembali dua koloni positif pada (B) dengan primer pTrcHis-F/R.

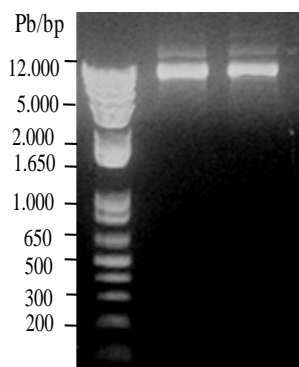
Figure 3. Electrophoretic profile of (A) PCR of colonies produced from the the first transformation procedure, (B) PCR of colonies produced from the second transformation procedure, and (C) PCR of the two positive colonies from Figure 3B using primers of pTrcHis-F/R.

*Eksresi gen penyandi BC dalam E. coli rekombinan*

Protein total diekstrak dari kultur *E. coli* rekombinan dan *E. coli* non rekombinan (yang tidak ditransformasi). Konsentrasi protein hasil ekstraksi dari kedua kultur tersebut disajikan pada Tabel 2. Untuk sel yang ditransformasi diukur konsentrasinya baik dari pelet maupun dari supernatan yang diperoleh setelah sel dilisis dan disentrifugasi. Konsentrasi protein dalam supernatan pada sel rekombinan dan non rekombinan hampir sama yaitu 1025,10 µg/mL dan 1057,98 µg/mL. Untuk sel yang ditransformasi, konsentrasi protein pada pelet lebih besar dibandingkan dengan konsentrasi protein dalam supernatan.

Profil protein hasil elektroforesis SDS-PAGE dari *E. coli* rekombinan hasil transformasi dengan *pTrcHis/BC* dan dari *E. coli* yang tidak ditransformasi ditampilkan pada Gambar 5. Dari Gambar tersebut nampak jelas *E. coli* transforman mengekspresikan protein pada berat molekul sekitar 43 kDa jauh lebih tinggi dibandingkan dengan *E. coli* yang tidak ditransformasi. Peningkatan akumulasi protein tersebut sangat jelas dan ditemukan baik pada supernatan maupun pelet dari *E. coli* rekombinan. Hasil tersebut memperlihatkan bahwa peningkatan akumulasi protein 43 kDa disebabkan karena introduksi dan ekspresi cDNA penyandi ACCase subunit biotin carboxylase.

Pengujian ekspresi merupakan tahapan penting yang perlu dilakukan dalam isolasi gen, untuk mengetahui apakah gen yang diklon dalam suatu plasmid dapat menghasilkan protein yang diinginkan. Pada beberapa kasus, gen yang diklon dalam suatu plasmid tidak dapat diekspresikan menghasilkan protein target, salah satunya disebabkan karena sekuen DNA yang dimiliki tidak *in frame* atau berada di kode inisiasi translasi yang tepat. Vektor pTrcHis-TOPO® yang digunakan dalam kegiatan ini adalah vektor ekspresi yang dirancang untuk ekspresi protein rekombinan secara efisien pada *E. coli* serta purifikasinya. Sisipan



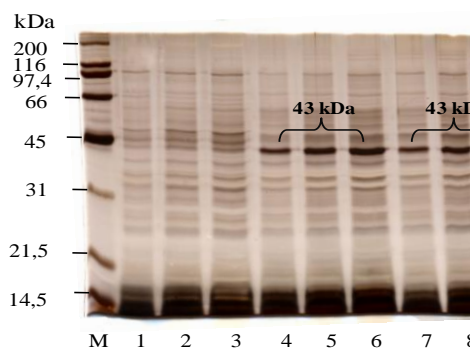
Gambar 4. Profil elektroforesis dua plasmid rekombinan hasil isolasi dari kedua koloni positif sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 3B.

Figure 4. Electrophoretic profile of two recombinant plasmids isolated from the two positif colonies as shown in figure 3B. M: 1 kb plus DNA ladder.

Tabel 2. Konsentrasi protein hasil ekstraksi dari kultur *E. coli* transforman dan non transforman.

Table 2. Concentration of protein extracted from culture of transformed and untransformed *E. coli*.

Sumber protein Source of protein	A <sub>750</sub>	Protein (µg/mL)
XL-1 Blue non rekombinan, supernatan	0.354	1057.98
XL-1 Blue rekombinan, pelet	0.331	989.24
XL-1 Blue rekombinan, supernatan	0.343	1025.10



Gambar 5. Profil SDS-PAGE ekstrak protein. Lajur 1-3: *E. coli* native; lajur 4-6: *E. coli* rekombinan dari ekstraksi pelet; lajur 7-9: *E. coli* rekombinan dari ekstraksi supernatan. Lajur 1, 4, 7: volume loading 5 µL ekstrak protein, lajur 2, 5, 8: volume loading 10 µL ekstrak protein; lajur 3, 6, 9: volume loading 15 µL ekstrak protein. M: marker protein

Figure 5. SDS-PAGE profile of the extracted protein. Lanes 1–3: native *E. coli*; lanes 4–6: recombinant *E. coli* of extracted pellets; lanes 7–9: recombinant *E. coli* of extracted supernatants). Lanes 1, 4, 7: loading volume 5 µl extracted protein; lanes 2, 5, 8: loading volume 10 µL extracted protein; lanes 3, 6, 9: loading volume 15 µL extracted protein. M: protein marker.

DNA target diposisikan di bawah (*downstream*) dan *in frame* dengan sekuen yang menyandi enam residu histidin yang berfungsi sebagai *metal binding domain* dalam translasi protein (Gambar 2B). Adanya *N-terminal fusion peptide* pada vektor tersebut akan menambahkan 3-4 kDa dari protein yang diekspresikan. Dengan demikian, BM protein hasil ekspresi cDNA BC terklon adalah sekitar 40 kDa.

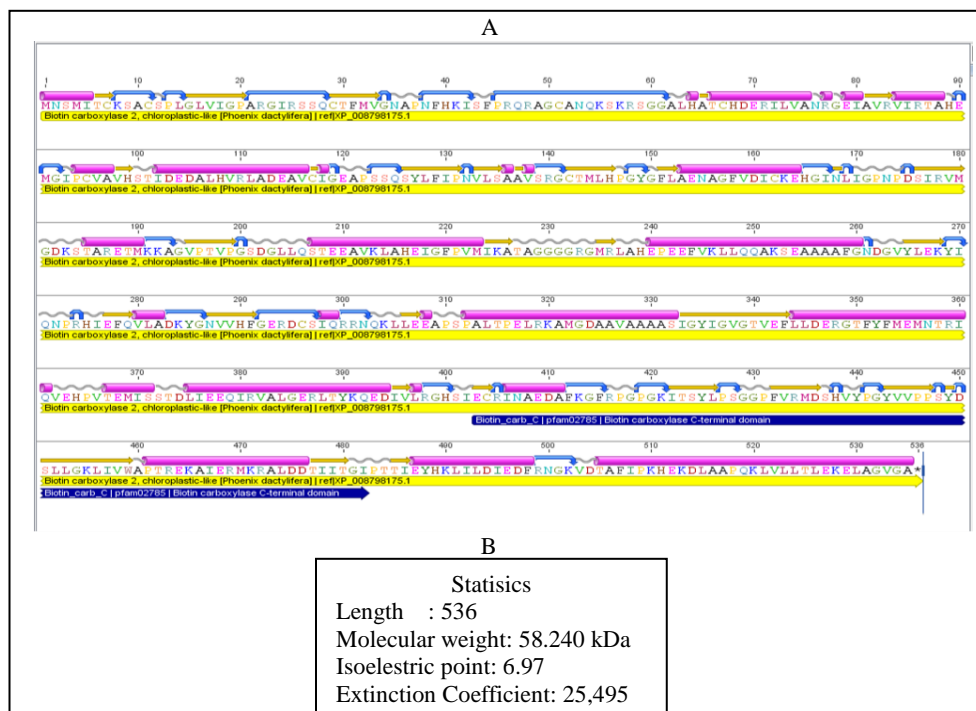
cDNA penyandi ACCase subunit biotin carboxylase yang diuji ekspresinya pada penelitian ini adalah hasil kloning yang telah dilaporkan sebelumnya (Budiani *et al.*, 2013). Panjang nukleotida gen terklon adalah 2182 pb, dengan *start codon* terletak pada basa ke 224-226. Untuk mengetahui fungsi protein yang dihasilkan dan perkiraan berat molekulnya, dilakukan analisis menggunakan program Geneious R5 (Biomatters Ltd.). Hasil analisis menunjukkan bahwa protein hasil translasi tersusun oleh 536 asam amino, mempunyai domain biotin karboksilase dan prediksi berat molekulnya adalah 58,24 kDa (Gambar 6). Hasil ini sama dengan berat molekul ACCase subunit biotin

carboxylase dari jarak pagar (*Jatropha curcas*) yang diprediksi berdasarkan sekuen cDNA penyandi BC yang berhasil diklon (Gu *et al.*, 2011). Namun, prediksi BM berdasarkan sekuen DNA tersebut ternyata berbeda dengan BM protein pada analisis menggunakan SDS-PAGE yang disajikan pada Gambar 5, yaitu lebih kurang 40 kDa. Perbedaan berat molekul protein BC juga dilaporkan oleh Shen *et al.* (2006) dalam studinya mengenai kaitan antara struktur dengan aktivitas katalitik BC. BC *wild type* yang berbentuk dimer dalam larutan mempunyai BM 87 kDa, sedangkan BM BC yang diperoleh dari filtrasi gel adalah 50 kDa. Beberapa molekul BC lainnya mempunyai BM 43 – 48 kDa, yang dinyatakan sesuai dengan stase monomer protein tersebut dalam larutan.

Gen penyandi ACCase telah diklon dari berbagai tanaman termasuk dari kelapa sawit, namun pengujian ekspresinya pada organisme rekombinan, baik *E. coli* maupun tanaman transgeniknya, belum banyak dilaporkan. Hasil penelitian mengenai kloning, ekspresi dan evolusi gen penyandi ACCase subunit  $\alpha$ -CT dari *Brasica napus* dilaporkan oleh Li *et al.* (2010). Sedangkan kloning gen-gen penyandi keempat subunit penyusun ACCase dari jarak pagar (*Jatropha curcas*) dilaporkan oleh Gu *et al.* (2011). Hasil analisis ekspresi menunjukkan bahwa gen-gen tersebut terekspresi secara temporal dan spasial pada

daun dan endosperm, dan diregulasi oleh perkembangan dan lingkungan. Pada tanaman kelapa sawit, kloning gen penyandi ACCase subunit  $\beta$ -CT dan subunit BC telah dilaporkan (Nugkaew, 2005; Nakkaew *et al.*, 2008; Omar *et al.*, 2008). Dari berbagai studi mengenai struktur, fungsi dan inhibitor ACCase, diketahui pula bahwa  $\beta$ -CT merupakan factor pembatas ACCase heteromerik, sedangkan BCCP adalah regulator negatif dalam sintesis asam lemak (Jieqiong, 2011). Di samping itu, ACCase dari rumput (*grasses*) adalah target dari herbisida yang telah lama dikomersialkan (Tong & Harwood Jr, 2006).

Peran kunci ACCase dalam biosintesis asam lemak dan akumulasi minyak, memberikan peluang ACCase sebagai target gen dalam pengembangan tanaman transgenik penghasil minyak dan biodiesel. Oleh karena itu isolasi dan kloning gen ACCase, serta pengujian ekspresinya merupakan tahapan penting yang diperlukan untuk tujuan tersebut. Peningkatan rendemen minyak dapat dilakukan melalui mekanisme *up regulation* untuk mengover-ekspresikan gen tersebut. Sebaliknya, *down regulation* dari ACCase akan mengarahkan metabolit acetyl-CoA ke produksi PHB (Polyhydroxybutyrate) dan PHBV (poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)), senyawa yang banyak digunakan untuk bioplastik (Omar *et al.*, 2008).



Gambar 6. Hasil analisis sekuen cDNA penyandi BC yang diekspresikan pada *E. coli*. (A) Sekuen asam amino hasil translasi yang menunjukkan adanya domain biotin karboksilase; (B) Prediksi jumlah asam amino dan berat molekul protein hasil translasi.

Figure 6. Results of sequence analysis of cDNA encoding BC expressed in *E. coli*. (A) Amino acid sequence of the translation product showing the biotin carboxylase; (B) Predicted number of amino acid and molecular weight of the translation product.

### Kesimpulan

cDNA lengkap penyandi ACCase subunit biotin carboxylase asal kelapa sawit dapat diekspresikan pada *E. coli* XL-1 Blue dengan vektor ekspresi pTrcHis-TOPO menghasilkan protein dengan berat molekul sekitar 43 kDa. Untuk mengkonfirmasi fungsinya sebagai biotin karboksilase, protein tersebut perlu dimurnikan dan diuji aktivitasnya.

### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dr. Riza Arief Putranto DEA, atas bantuannya dalam penggunaan program Geneious R5 untuk analisis sekuen asam amino.

### Daftar Pustaka

- Budiani A (2005). Ekspresi protein spesifik dalam biosintesis minyak dan kloning gen penyandi ht-ACCCase subunit biotin karboksilase dan enoil-ACP reduktase dari mesokarp kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). Tesis S3. Bogor, Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Budiani A, D Santoso, H Aswidinnoor & A Suwanto (2008). Accase activity of oil palm mesocarp and cloning of gene fragment encoding biotin carboxylase subunit of ACCase. *Ind J of Agricul* 1(1), 44-50.
- Budiani A, A Suwanto, H Aswidinnoor, D Santoso & BJ Nikolau (2013). Kloning cDNA lengkap penyandi ACCase subunit biotin carboxylase dari mesokarp kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Menara Perkebunan* 81(2), 55-66.
- Chajes V, M Cambot, K Moreau, GM Lenoir & V Joulin (2006). Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. *Cancer Res* 66, 5287-5294.
- Francki MG, P Whitaker, PM Smith & CA Atkins (2002). Differential expression of a novel gene during seed triacylglycerol accumulation in lupin species (*Lupinus angustifolius* L. and *L. mutabilis* L.). *Funct & Intregative Genom* 26, 292-300.
- Gu K, H Chiam, D Tian & Z Yin (2011). Molecular cloning and expression of heteromeric ACCase subunit genes from *Jatropha curcas*. *Plant Sci* 180(4), 642-649.
- Jieqiong LI, Z Shixue, Y Ziniu & Z Jibing (2011). Acetyl-coenzyme A carboxylase: A key metabolic enzyme of fatty acid and progress of its gene clone. *Chin J Appl Environ Biol* 17(5), 753-758.
- Kachroo A & P Kachroo (2009). Fatty acid – derived signals in plant defense. *Ann Rev Phytopathol* 47, 153-76.
- Ke J, T-N Wen, BJ Nikolau & ES Wurtele (2000). Coordinate regulation of the nuclear and plastidic genes coding for the subunit of heteromeric acetyl-coenzyme A carboxylase. *Plant Physiol* 122, 1057-1071.
- Kunst L & AL Samuels (2003). Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog Lipid Res* 42, 51 – 80.
- Li Z-G, W-B Yin, H Guo, L-Y Song, Y-H Chen, R-Z Guan, J-Q Wang, RR-C Wang & Z-M Hu (2010) Genes encoding the  $\alpha$ -carboxyltransferase subunit of acetyl-CoA carboxylase from *Brassica napus* and parental species: cloning, expression patterns, and evolution. *Genome* 53, 360-370.
- Nakkaew A, W Chotigeat, T Eksomtramage & A Phongdara (2008). Cloning and expression of a plastid-encoded subunit, beta-carboxyltransferase gene (*accD*) and a nuclear-encoded subunit, biotin carboxylase of acetyl-CoA carboxylase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) *Plant Sci* 175(4), 497 – 504.
- Nikolau BJ, JB Ohlrogge & ES Wurtele (2003). Plant biotin-containing carboxylases. *Arch Biochem and Biophys* 414, 211-222.
- Nugkaew A (2005). Cloning Acetyl-CoA Carboxylase beta subunit (AccD) from mesocarp of oil palm (*E. guineensis*). Taken from <http://agris.fao.org/records/th2005002332>. [July, 2006]
- Omar WSW, LB Willis, RHA Chokyun, AJ Sinskey, US Ramli, AMM Yunus, GK Parveez & R Sambanthamurthi (2008). Isolation and utilization of Acetyl-CoA Carboxylase from oil palm (*Elaeis guineensis*) mesocarp. *J Oil palm Res Special Issue on Malaysia* 2, 97. Parsons JB & CO Rock (2011). Is bacterial fatty acid synthesis a valid target for antibacterial drug discovery?. *Curr Opin Microbiol* 14, 544-549.
- Payne DJ, MN Gwynn, DJ Holmes, DL Pompliano (2007) Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov* 6, 29-40.
- Polyak SW, AD Abell, MCJ Wilce, L Zhang & GW Booker (2012). Structure, function and selective inhibition of bacterial acetyl-coa carboxylase. *Appl Microbiol Biotechnol* 93, 983-992.
- Salama NR, B Shepherd & S Falkow (2004). Global transposon mutagenesis and essential gene analysis of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 186,7926-7935.
- Shen Y, C-Y Chou, G-G Chang (2006). Is dimerization required for the catalytic activity of bacterial biotin carboxylase?. *Mol Cell* 22, 807-818.
- Tong L (2005). Acetyl-Coenzyme A Carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cell Mol Life Sci* 62,1784-1802.
- Tong L & HJ Harwood Jr (2006). Acetyl-coenzyme A carboxylases: versatile targets for drug discovery. *J of Cell Biochem* 99, 1476-1488.
- Waterborg JH (2002). The lowry method for protein quantitation. In: J.M. Walker. *The Protein Protocol Handbook*. 2<sup>nd</sup> ed. New Jersey, Humana Press, p. 7-9.
- Wright HT & KA Reynolds (2007). Antibacterial targets in fatty acid biosynthesis. *Curr Opin Microbiol* 10,447-453.
- Zhang H, B Tweel, J Li & L Tong (2004). Crystal structure of the carboxyltransferase domain of Acetyl-coenzyme A carboxylase in complex with CP-640186. *Structure* 12, 1683-1691.