

Deteksi metilasi DNA genom *Elaeis guineensis* Jacq hasil kultur jaringan dengan teknik *Randomly Amplified Fingerprint (RAF) DNA* dan *Reverse Phase HPLC (RP-HPLC)*

Analysis DNA genom methylation of Elaeis guineensis Jacq from tissue culture by Randomly Amplified Fingerprint DNA (RAF) and Reverse Phase HPLC (RP-HPLC)

Nurita TORUAN-MATHIUS¹⁾, Nesti F. SIANIPAR²⁾, G.A.WATTIMENA³⁾,
Hajrial ASWIDINNOOR³⁾, Maggy THENAWIDJAYA-SUHARTONO⁴⁾
& Gale GINTING⁵⁾

¹⁾ PT SMART, Biotechnology Department, Plant Production Division, Bogor, Indonesia

²⁾ Jurusan Biologi, Universitas Pelita Harapan, Jakarta, Indonesia

³⁾ Jurusan Agronomi, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Indonesia

⁴⁾ Jurusan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian,
Institut Pertanian Bogor, Indonesia

⁵⁾ Balai Penelitian Marihat, Medan, Indonesia

Summary

Embryo somatic (ES) abnormalities of oil palm were probably caused by numbers and location of DNA genom cytosin methylation. Quantity of methylation could be determined by Reverse phase HPLC (RP-HPLC) techniques, while location of DNA cytosin methylation was detected by Random Amplified Fingerprint DNA (RAF-DNA) technique. The objective of this research was to determine numbers and pattern of DNA cytosin methylation of normal or abnormal ES and normal ortet as a standard. DNA genomic of samples were cut by HpaII and MspI enzymes at CCGG site, and amplified by RAF. HpaII cut at ^mCCGG sequences, but if second C were methylated the sequences can not be cut by HpaII. While MspI will cut if internal of cytosine was methylated (C^mCGG). The results showed that AB16, AE11, AO12 and AP12 primers could detect the changes of methylation site on normal ortet and abnormal ES cotyledone. RP-HPLC analyses showed that DNA cytosin methylation content between ES globular and ES cotyledone, both normal and abnormal and also normal plantlet and

ortet were insignificantly different. DNA methyl content was around 0.25 – 2.72 %. Internal and fully methylation was found on 124 – 457 bp. Abnormal ES of MK638 clone showed the hipomethylation pattern. It was concluded that methylation cytosine content was very low and it seems that DNA methylation undirectly affects on process of morphology abnormalities. Abnormalities of ES globular and cotyledone might be caused by the change of DNA genom sequences.

[Key words: Oil palm, DNA methylation, embryo somatic - abnormality, RAF-DNA, RP-HPLC]

Ringkasan

Abnormalitas pada embrio somatik (ES) tanaman kelapa sawit diduga disebabkan oleh kandungan serta lokasi terjadinya metilasi sitosin DNA genom. Kandungan metilasi dapat ditetapkan dengan teknik *Reverse Phase HPLC (RP-HPLC)*, sedang lokasi terjadinya metilasi sitosin DNA genom ES dapat dideteksi dengan teknik *Random Amplified Fingerprint DNA (RAF-DNA)*. Tujuan penelitian ini adalah

untuk menetapkan pola metilasi sitosin DNA genom ES kotiledon normal dan abnormal, sebagai pembanding adalah ortet yang normal. DNA genom contoh dipotong dengan enzim *HpaII* dan *MspI* yang mengenali situs CCGG, selanjutnya diamplifikasi dengan RAF. Enzim *HpaII* memotong sekuen ^mCCGG tetapi jika C kedua mengalami metilasi sekuen tersebut tidak terpotong. *MspI* akan memotong apabila sitosin internal termetilasi (C^mCCGG). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa terjadi perubahan situs metilasi antara ortet normal dan ES kotiledon abnormal. Perubahan situs metilasi sitosin dapat dibedakan dengan primer RAF, yaitu AB16, AE11, AO12 dan AP12. Hasil analisis RP-HPLC menunjukkan bahwa perbedaan kandungan metilasi sitosin DNA ES globular maupun kotiledon masing-masing antara yang normal dan abnormal, serta antara planlet dan ortet normal sangat kecil. Kandungan metil sitosin berkisar antara 0,25 – 2,72 %. Tampak bahwa pada 124 - 457 pb terjadi metilasi internal, eksternal maupun metilasi penuh. Pada ES abnormal klon MK638 menunjukkan terjadi hipometilasi sitosin. Perbedaan kandungan metilasi sitosin yang sangat kecil diduga tidak berpengaruh langsung terhadap proses abnormalitas. Abnormalitas yang terjadi pada ES globular dan kotiledon kemungkinan akibat terjadinya perubahan sekuens DNA genom.

Pendahuluan

Abnormalitas pembuahan pada tanaman kelapa sawit asal kultur jaringan dikenal dengan istilah mantel, yaitu mesokarp tidak berkembang dan dapat juga terjadi bunga jantan steril (Corley *et al.*, 1986). Abnormalitas terjadi pada rata-rata 5-10 % dari populasi bibit asal kultur jaringan (Jaligot *et al.*, 2000), dan bersifat epigenetik (Tregear *et al.*, 2002). Abnormalitas yang terjadi pada bibit klonal kelapa sawit tersebut diduga berhubungan erat dengan perubahan pola metilasi DNA selama dalam kultur

(Phillips *et al.*, 1990; Jaligot *et al.*, 2000). Matthes *et al.* (2001) menyatakan adanya korelasi yang nyata antara hipometilasi dengan pembungaan mantel pada bibit kelapa sawit asal kultur jaringan. Menurut Kaeppler *et al.* (2000) adanya hubungan antara hipermetilasi dari residu sitosin DNA dalam gen atau promoter gen yang menekan ekspresi gen. Grandbastien (1998) mengemukakan bahwa akibat terjadinya metilasi secara konsisten menyebabkan adanya abnormalitas pembungaan tanaman kelapa sawit setelah beberapa tahun di lapang.

Berbagai analisis digunakan untuk mengungkapkan kejadian abnormalitas bunga dan buah kelapa sawit yang berasal dari kultur jaringan. Studi ploidi (Rival *et al.*, 2004) dan transposon (Kubis *et al.*, 2003) menunjukkan bahwa tidak ada hubungan abnormalitas buah bersayap dengan perbedaan ploidi dan aktivitas transposon, tetapi berhubungan dengan perubahan pola metilasi DNA.

Bentuk metilasi DNA genom yang umum adalah metilasi pada basa sitosin yang dikatalisis oleh enzim metiltransferase dengan menambahkan gugus metil ke basa sitosin (Martienssen & Colot, 2001). Metilasi DNA pada tanaman diimplikasikan pada pengaturan ekspresi gen, yaitu berpengaruh langsung terhadap transkripsi DNA atau tidak langsung melalui perubahan struktur kromatin (Antequera & Bird, 1988; Adams, 1990). Kaliz & Purugganan (2004) melaporkan bahwa ada dua tipe utama metilasi yang dihubungkan dengan perubahan epigenetik, yaitu metilasi DNA dan Histon. Gardner *et al.* (1991) melaporkan bahwa pada eukariot metilasi yang tinggi mengakibatkan rendahnya ekspresi gen atau sebaliknya. Davey *et al.* (1997) berpendapat bahwa regulasi ekspresi gen terjadi melalui perubahan struktur

kromatin lokal. Metilasi dan demetilasi sitosin pada daerah promotor merupakan mekanisme yang penting meregulasi ekspresi gen pada sel dan jaringan spesifik (Boyes & Bird, 1991).

Fraga & Esteller (2002) menyatakan bahwa metilasi sitosin pada posisi lima dari cincin pirimidin merupakan epigenetik yang sangat penting pada tanaman, metil sitosin umumnya ditemukan pada sitosin yang terikat pada basa guanin dengan sekuens trinukleotida (C_pN_pG). Ehrlich & Ehrlich (1998) mengemukakan bahwa adanya lima metilsitosin pada promotor gen spesifik akan mengubah pelekatan faktor transkripsional dan protein lainnya pada DNA. Di samping itu dapat juga terjadi penarikan metil-DNA-binding protein dan histon deasetilase yang akan mengubah struktur kromatin di sekitar daerah awal transkripsi pada gen. Kedua mekanisme tersebut memblokir transkripsi dan menyebabkan gen *silencing*. Wolffe *et al.* (1999) menyatakan bahwa residu metilasi C dalam DNA genomik memegang peranan dalam regulasi ekspresi gen.

Menurut Lewin (1997) enzim *HpaII* memotong sekuens CCGG tetapi apabila C keduanya mengalami metilasi, sekuens tersebut tidak terpotong. *MspI* tidak memotong apabila C eksternal termetilasi (^mCCGG) tetapi akan memotong apabila sitosin internal termetilasi (C^mCCGG) (McClelland *et al.*, 1994). Matthes *et al.* (2001) membuktikan penurunan metilasi diperoleh pada situs CCGG. Sekuens CCGG ini berhubungan dengan ekspresi gen karena ditemui juga pada daerah promotor, yaitu pada GC boks. Metilasi DNA dapat menghambat transkripsi secara langsung dengan menghalangi penempelan faktor transkripsi ke promotor. Ng & Bird (1999) mengemukakan pembentukan struktur kromatin

pada tempat yang termetilasi merupakan penyebab tidak aktifnya transkripsi.

Beberapa teknik digunakan untuk mempelajari keberadaan atau lokasi terjadinya metil sitosin dalam genom, salah satunya dengan teknik *Randomly Amplified Fingerprinting* (RAF) DNA, yaitu teknik yang mengkombinasikan antara teknik RFLP dan cDNA *Amplification Fingerprinting* (DAF). Dalam teknik RAF, pada tahap awal DNA genom dipotong dengan enzim kemudian diamplifikasi menggunakan teknik RAF. Sedang tingkat metil sitosin dalam DNA genom dapat diukur dengan *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) atau dengan sistem enzim maupun kimiawi (Fraga *et al.*, 2002). Matthes *et al.* (2001) membuktikan penurunan metilasi diperoleh pada situs CCGG.

Penelitian ini bertujuan untuk menetapkan kuantitas metilasi DNA sitosin dan posisi terjadinya metilasi dihubungkan dengan abnormalitas pada ortet, embrio somatik serta planlet, masing-masing menggunakan teknik RP-HPLC dan teknik RAF.

Bahan dan Metode

Bahan tanam yang digunakan dalam percobaan ini adalah ES fase globular dan kotiledon, sedang planlet dan ortet digunakan sebagai pembanding. Masing-masing sampel dari klon MK 638 yang memiliki morfologi normal dan abnormal. Penetapan bentuk normal dan abnormal berdasarkan Sianipar *et al.* (2007). DNA contoh diisolasi menggunakan metode Orozco-Castillo *et al.* (1994) dengan memodifikasi beberapa komponen dalam proses awal ekstraksi DNA. Uji kualitas dan penetapan kuantitas DNA dilakukan

dengan metode elektroforesis gel agarose menurut Sambrook *et al.* (1989).

Deteksi situs metilasi DNA dengan teknik RAF-sensitif metilasi

Deteksi situs metilasi sitosin DNA yang digunakan berdasarkan protokol RAF menurut Waldron *et al.* (2002) yang dimodifikasi, khususnya pemotongan DNA genom yang diuji dengan enzim sensitif metilasi DNA. Sebanyak 0,5 µg DNA genom yang diuji dipotong dengan 5 U *HpaII* dan 5 U *MspI*, dalam 5 µL bufer Tango 10 X yang mengandung 10 mM Tris-Asam asetat pH 7,4; 10 mM Magnesium asetat; 66 mM Potasium asetat; dan 0,1 mg/mL BSA diinkubasi pada suhu 37°C selama dua jam. Hasil pemotongan enzim difraksinasi dengan elektroforesis 1,4 % gel agarose dalam bufer 1 x TAE, dan diberi pewarnaan 0,5 µg/mL etidium bromida. DNA yang telah dipotong dengan enzim *HpaII* dan *MspI* diencerkan 10 kali dengan bufer TE kemudian disimpan di lemari pendingin untuk digunakan dalam percobaan selanjutnya.

Teknik RAF-sensitif metilasi

Amplifikasi DNA dengan PCR dilakukan berdasarkan metode Waldron *et al.* (2002) menggunakan empat primer RAF 10-mer. Sebelum melakukan PCR dibuat campuran utama (master mix) lalu di masukkan ke dalam Eppendorf 0,5 mL. Selanjutnya sebanyak 5 µL (10ng/µL) DNA dari masing-masing contoh yang diuji dimasukkan ke dalam Eppendorf 0,2 mL steril, kemudian ditambahkan 15 µL campuran utama dan disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama lima menit.

Amplifikasi DNA yang telah dipotong dengan enzim *MspI* atau *HpaII* dilakukan menggunakan primer 10-mer oligonukleotida yang sudah dilabel dengan FAM (6- karboksi fluoresein). Reaksi amplifikasi dilakukan menggunakan alat *Thermal cycler* Gene PCR (ABI 9700) dengan siklus termal sebanyak 30 kali dengan tahapan sebagai berikut : denaturasi lima menit pada suhu 94°C kemudian setengah menit pada suhu 94°C; penempelan satu menit pada suhu 57°C, satu menit pada suhu 56°C, satu menit pada suhu 55°C, satu menit suhu 54°C, satu menit 53°C dan waktu ekstensi (tahap ramping) lima menit pada suhu tetap 72°C. Hasil PCR diencerkan sebanyak 10 kali dengan TE bufer dan disimpan pada suhu -20 °C.

Fragmentasi DNA hasil amplifikasi dilakukan dengan elektroforesis menggunakan 2 µL sampel ditambah dengan 0,2 uL Gene Scan™ -500 LIZ dan 7,8µL HiDi pewarna formamid. Campuran didenaturasi pada suhu 95° C selama lima menit dan didinginkan dalam es selama 10 menit. Campuran kemudian dimasukkan ke dalam kapiler yang panjangnya 50 cm pada alat 3130 DNA Analyser (Applied Biosystems) selama 32 menit untuk empat contoh. Data berupa fragmen RAF-sensitif metilasi adalah dalam bentuk elektroferogram, yang disimpan menggunakan software ABI 3130.

Kuantifikasi metilasi sitosin dengan RP-HPLC

DNA genom diisolasi dari 0,5 g bahan tanam yang diuji menurut metode Orozco-Castillo *et al.* (1994). Tingkat metilasi absolut diukur dengan teknik RP-HPLC dengan metode enzimatik menurut Kubis *et al.* (2003). Sebanyak 1-10 µg DNA yang diuji diencerkan dalam air,

selanjutnya dipanaskan selama dua menit dalam air mendidih dan segera didinginkan dalam es. Sebanyak 5 µL 10 mM ZnSO₄ dan 10 µL nuklease S1 (1U/µL dalam 30 mM Sodium asetat pH 5,4) ditambahkan kemasing-masing sampel dan campuran kemudian diinkubasi pada 37° C selama 16 jam. Sebanyak 10 µL dari 0,5 M Tris pH 8,3 dan 10 µL alkalin fosfatase (Sigma, 100 U/mL dalam 2,5 M amonium sulfat) dan campuran diinkubasi pada suhu 37° C selama dua jam, dan disentrifugasi untuk membuang protein.

Sebanyak 20 µL sampel DNA yang diuji disuntikkan ke dalam suatu kolom superkoil LC-18S (150 mm x 4,6 mm, Supelco) dan dipisahkan dengan alat Waters otomatis HPLC. Elusi dilakukan dalam fase mobil pada 0,05 M NH₄ H₂ PO₄, 8% metanol pH 4,2 dengan kecepatan aliran 1 mL/menit pada suhu ruang. Identifikasi puncak nukleosida spesifik yang diperoleh dibandingkan dengan sampel standar sitidin, 5-metilsitidin dan campuran uji nukleosida. Pengujian dilakukan secara duplo. Basa nukleotida dideteksi pada 254 nm, sedang presentase 5-metilsitidin (5mC) dihitung dengan rumus $(5\text{mC}/[5\text{mC} + \text{C}] \times 100)$.

Hasil dan Pembahasan

Deteksi situs metilasi sitosin dengan teknik RAF

Hasil RAF yang diperoleh menghasilkan fragmen DNA yang polimorfis dalam bentuk elektroferogram (Gambar 1). Pola metilasi yang diperoleh setelah pemotongan *MspI* dan *HpaII* dari ortet normal dan ES kotiledon abnormal menghasilkan tiga kelas fragmen, yaitu terjadinya metilasi penuh (*fully-metilated*), etilasi internal (*hemimetilated*) dan metilasi eksternal.

Dari enam primer yang diuji ternyata hanya primer AB-16, AE - 11, AO-12 dan AP-20 yang dapat mengamplifikasi DNA contoh setelah dipotong dengan enzim *MspI* dan *Hpa II*. Amplifikasi DNA genom ES kotiledon normal menggunakan primer AB-16 menunjukkan bahwa terjadi metilasi sitosin pada lokasi sekitar 124 pb sampai 385 pb. Namun, pada ES kotiledon abnormal di lokasi yang sama (124 pb) tidak ditemukan metilasi sitosin termetilasi. Hal ini berarti terjadi perubahan sekuens basa DNA sehingga DNA genom ES kotiledon normal sebagai cetakan tidak komplemen dengan basa-basa nukleotida primer AB-16.

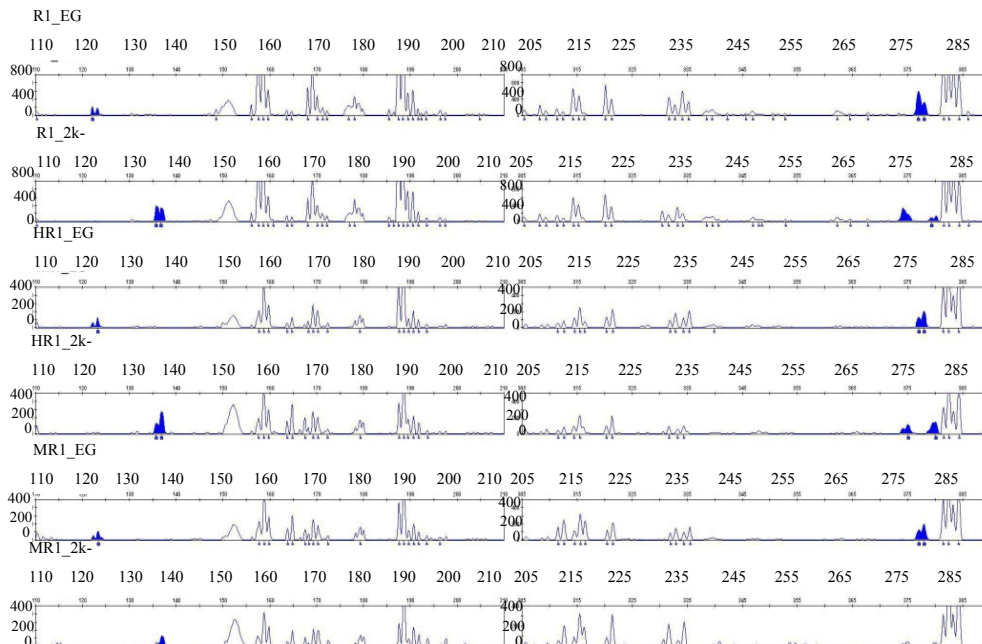
Hasil elektroferogram menunjukkan bahwa pada ortet normal terjadi metilasi penuh (^mC^mCGG) yang terdapat di lokasi sekitar 124 pb (Tabel 1 & Gambar 1). Tampak bahwa pola metilasi yang terjadi pada ortet normal dan ES kotiledon abnormal adalah berbeda. Pada ortet normal situs metilasi sitosin terdapat di sekitar 124 pb dan 378 pb, sedangkan pada ES kotiledon abnormal dilokasi sekitar 138 pb, 375 pb dan 385 pb. Pada ES kotiledon abnormal terjadi metilasi eksternal pada sekitar 375 pb dan 385 pb, serta metilasi penuh di situs 138 pb (Tabel 1 & Gambar 1).

Menurut McClelland *et al.* (1994) dan Belluci *et al.* (2002) enzim *MspI* hanya memotong C^{5m}CGG, tetapi tidak memotong pada ^{5m}CCGG. Oleh sebab itu metilasi internal terdeteksi dengan pemotongan enzim *MspI* yang tidak dapat memotong pada sitosin, karena sitosin termetilasi (C^{5m}CGG). Hasil RAF dari DNA ortet normal dengan primer AE-11(5'-AAGACCGGGA-3') menunjukkan bahwa terjadi metilasi secara penuh pada 168 pb, sedangkan pada 446 pb dan 457 pb terjadi metilasi internal. Pada ES kotiledon abnormal terjadi mutasi titik

pada 168 pb dan 446 pb, dan metilasi internal pada 457 pb. Tampak bahwa baik pada ortet normal maupun ES kotiledon abnormal terjadi metilasi internal di lokasi sekitar 457 pb (Tabel 1 & Gambar 1).

Hasil amplifikasi DNA genom tanpa dan dengan pemotongan enzim menggunakan primer AO-12 (5'-TCCCGG TCTC-3'), menunjukkan bahwa pada ortet normal terjadi metilasi penuh pada

lokasi sekitar 195 pb dan 290 pb. Pada ES kotiledon abnormal terjadi mutasi titik pada lokasi 195 pb dan 290 pb (Tabel 1 & Gambar 1). Hal ini berarti primer AO 12 komplemen dengan DNA tanaman normal, sedangkan pada ES kotiledon abnormal tidak komplemen. Hasil yang diperoleh kemungkinan disebabkan adanya perubahan satu basa dalam sekuens DNA genom ES abnormal, yang disebut sebagai mutasi titik.



Gambar 1. Deteksi fluoresen teknik RAF dengan primer AB-16 (5'-CCCGGATGGT-3') yang dilabel dengan FAM (6-carboxy-fluorecein) pada tanaman kelapa sawit klon MK638. (R1-EG) ortet normal. (R1-2K-) kotiledon abnormal, (HR1-EG) ortet normal dipotong dengan *Hpa* II, (HR1-2K-) ES kotiledon abnormal dipotong dengan *Hpa* II, (MR1-EG) ortet normal dipotong dengan *Msp* I, (MR1-2K-) ES kotiledon abnormal dipotong dengan *Msp* I.

Figure 1. RAF fluorescence detection with AB-16 (5'-CCCGGATGGT-3') primer labeled with FAM (6-carboxy-fluorecein) of oil palm MK 638 clone. (R1-EG) normal ortet. (R1-2K-) abnormal cotyledone, (HR1-EG) normal ortet cut by *Hpa* II, (HR1-2K-) abnormal ES cotyledone cut by *Hpa* II, (MR1-EG) normal ortet cut by *Msp* I, (MR1-2K-) abnormal ES cotyledone cut by *Msp* I.

Deteksi metilasi DNA genom Elaeis guineensis Jacq hasil kultur jaringan....

Tabel 1. Hasil deteksi lokasi metilasi sitosin DNA genom dengan metode RAF pada klon MK 638.

Table 1. Location detection of DNA genom methylated cytosine by RAF technique of MK 638 clone.

Primer AB-16 (5'-CCCGGATGGT-3')	Contoh Sample	Utuh Full	Dipotong dengan Cut by		Keterangan Explanation
			<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>	
Band (pb) 124	EG 2K-	+ -	+ -	+ -	Metilasi penuh (<i>Fully methylation</i>) ^m C ^m CGG Mutasi titik (<i>Point mutation</i>)
138	EG 2K-	- +	- +	- +	Primer tidak komplemen (<i>Uncomplemented primer</i>) Metilasi penuh (<i>Fully methylation</i>) ^m C ^m CGG Mutasi titik (<i>Point mutation</i>)
375	EG 2K-	- +	- +	- -	Tidak ada homologi (<i>Non homology</i>) Mutasi titik dan metilasi eksternal (<i>Point and eksternal methylation</i>) ^m CCGG
378	EG 2K-	+ -	+ -	+ -	Metilasi penuh (<i>Fully methylation</i>) ^m C ^m CGG Mutasi titik (<i>Point mutation</i>)
385	EG 2K-	- +	- +	- -	Primer tidak komplemen (<i>Uncomplemented primer</i>) Mutasi titik dan metilasi eksternal (<i>Point mutation and external methylation</i>) Metilasi penuh (<i>Fully methylation</i>) ^m CCGG
Primer AE-11 (5'-AAGACCGGA-3')					
Band (pb) 168	EG 2K-	+ -	+ -	+ -	Metilasi penuh (<i>Full methylation</i>) ^m C ^m CGG Mutasi titik (<i>Point methylation</i>)
446	EG 2K-	+ -	+ -	- -	Metilasi eksternal (<i>External methylation</i>) ^m CCGG Mutasi titik (<i>Point mutation</i>)
457	EG 2K-	+ +	- -	+ +	Metilasi internal (<i>Internal mutation</i>) Metilasi internal (<i>Internal methylation</i>)
Primer AO-12 (5'-TCCCGGTCTC-3')					
Band (pb) 195	EG 2K-	+ -	+ -	+ -	Metilasi penuh (<i>Fullmethylation</i>) Mutasi titik (<i>Point mutation</i>)
290	EG 2K-	+ -	+ -	+ -	Metilasi penuh (<i>Full methylation</i>) ^m C ^m CGG Mutasi titik (<i>Point mutation</i>)
Primer AP-20 (5'-CCCGGATACA-3')					
Band (pb) 235	EG 2K-	- +	- +	- -	Tidak ada homologi (<i>Nonhomology</i>) Metilasi eksternal dan mutasi titik (<i>External methylation and point mutation</i>) ^m CCGG

Keterangan : EG (ortet normal), 2K- (ES kotiledon abnormal), ada fragmen (+), tidak ada fragmen (-)

Explanation : EG (normal ortet), 2K- (Abnormal ES cotyledon), fragment present (+), No fragment (-)

Toruan-Mathius et al.

DNA genom ES kotiledon abnormal yang dipotong dengan enzim *HpaII* dan *MspI* kemudian diamplifikasi dengan primer AO-11, menunjukkan tidak kom-plemen sehingga tidak terdeteksi terjadinya metilasi. Namun demikian, terjadi mutasi titik pada lokasi 195 pb dan 290 pb. Amplifikasi DNA genom ES abnormal dengan primer AP-20 (5'-CCGGATACA-3') memberikan hasil bahwa terjadi metilasi eksternal dan mutasi titik pada lokasi sekitar 235 pb (Tabel 1).

Penggunaan *MspI* dan *HpaII* sebagai enzim pemotong DNA genom dengan tujuan untuk mendeteksi lokasi terjadinya metilasi sitosin sudah digunakan pada beberapa tanaman, yaitu padi, apel, arabidopsis dan *Pisum*. Metode ini telah digunakan untuk mengetahui metilasi CpG dengan menggunakan enzim pengenal pada situs CCGG, yaitu pada genom padi (Xiong *et al.*, 1999), karakterisasi perubahan metilasi yang berkaitan dengan mikropropagasi Apel (Xu *et al.*, 2004), dan variasi somaklonal kelapa sawit (Matthes *et al.*, 2001).

Empat dari enam primer yang diuji, yaitu AB-16, AE-11, AO-12 dan AP-20 dapat mendeteksi terjadinya metilasi internal, metilasi eksternal, dan metilasi penuh pada DNA genom ES kotiledon abnormal dan ortet normal. Bird (1996) menyatakan bahwa metilasi DNA terjadi pada tempat spesifik genom eukariot termetilasi adalah tidak seragam. Hanya daerah spesifik yang termetilasi, sedangkan domain lain yang tersisa tidak termetilasi. Sebagian besar kelompok metil ditemukan pada CG. DNA eukariot tingkat tinggi, termetilasi pada C dari beberapa sitosin. Shapiro (1976) dan Matassi *et al.* (1992) melaporkan bahwa proporsi sitosin yang termodifikasi dengan

metilsitosin(5-mC) lebih dari 30 % pada beberapa spesies tanaman.

Abnormalitas ES kotiledon yang terjadi dalam penelitian perbanyakan tanaman kelapa sawit melalui kultur jaringan, diduga disebabkan variasi somaklonal selama dalam kultur. Larkin & Scowcroft (1981) menyebutkan variasi pada tanaman yang diregenerasi secara *in vitro* sebagai variasi somaklonal. Menurut Leroy & Branchard (2000) perubahan kromosom terjadi dengan frekuensi yang tinggi pada tahap awal atau kultur sel cair, adalah sebagai penyebab abnormalitas. Chen *et al.* (1988) dan Miura *et al.* (2001) menyatakan bahwa abnormalitas fenotipik dapat disebabkan oleh akumulasi mutasi. Menurut Kakutani *et al.* (1996) hipometilasi DNA dapat meningkatkan laju mutasi karena terjadi transposisi elemen atau peningkatan laju rekombinasi penyusunan genom kembali.

Van Harten (1998) dan Hershkovitz *et al.* (1990) menyatakan ketidakaturan mitotik berperan dalam ketidakstabilan kromosom, terjadi amplifikasi gen atau delesi dan inaktif gen atau aktif kembali gen-gen silent. Beberapa aktivitas gen tanaman muncul berhubungan dengan metilasi sedangkan gen-gen lain tidak mengalaminya, sehingga dikatakan ada regulasi perubahan gen melalui perubahan metilasi *in vitro* Transposisi dan pindah silang disebutkan juga sebagai faktor penyebab. Menurut Pesche & Phillips (1992) beberapa tipe utama variasi genetik terjadi karena (1) aktivasi elemen transposon, (2) aberasi kromosom, dan (3) perubahan metilasi.

Pada tanaman tingkat tinggi 5m-C ditemukan pada beberapa sekuens genom nuklear, yang lebih sering ditemukan pada dinukleotida CG dan trinukleotida CNG.

Metilasi sitosin pada nukleotida CG dan CNG ditemukan sepanjang kromosom dan

Deteksi metilasi DNA genom Elaeis guineensis Jacq hasil kultur jaringan.....

bertindak meregulasi ekspresi gen yang terjadi, pada level gen atau secara

regional yang mempengaruhi daerah kromosom. Fungsi metilasi regional adalah untuk menginaktivkan heterokromatin dan elemen pada atau dekat heterokromatin yang menyebabkan frekuensi metilasi pada daerah kromatin lebih besar (Bird, 1986). Struktur heterokromatin memperlambat transkripsi, sedangkan struktur eukromatin mengaktivasi gen (Richards & Elgin, 2000). Beberapa pendapat menyatakan bahwa regulasi gen terjadi melalui perubahan struktur kromatin lokal (Davey *et al.*, 1997).

Dapat disimpulkan bahwa pada ortet normal primer AB-16, AE-11, dan AO-12 sedangkan pada ES kotiledon abnormal hanya primer AB-16 yang dapat mendeteksi metilasi penuh. Situs terjadinya metilasi penuh berbeda pada ortet normal dan ES kotiledon abnormal.

Kuantifikasi metilasi sistosin dengan teknik RP-HPLC

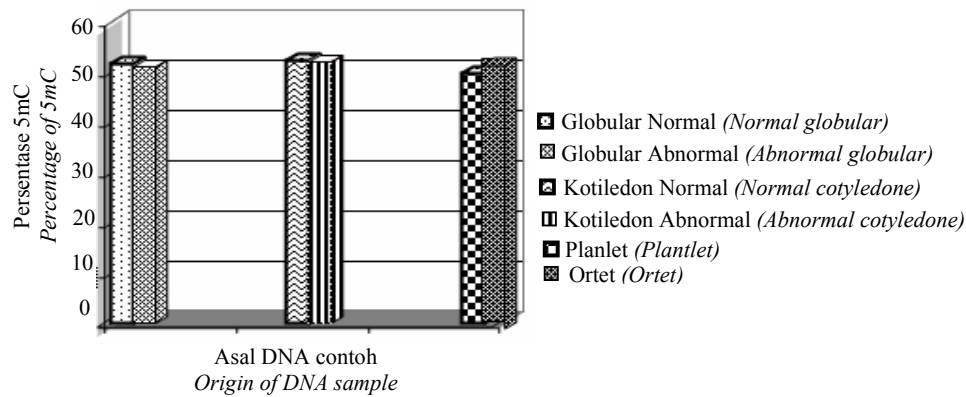
Kandungan metil sitosin dari ES fase kotiledon, ES globular, planlet dan ortet yang normal dan abnormal adalah sangat kecil. Pada klon 638 perbedaan kandungan metilsitosin antara ES globular normal dan abnormal 0,64 %, antara ES kotiledon normal dan abnormal 0,25 %, antara planlet dan ortet normal 2,72%. Data ini menunjukkan perubahan kandungan metil sitosin antara ES globular normal dan abnormal menurun, perubahan ini disebut hipometilasi (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa perubahan metilasi sitosin pada DNA genom ES globular, ES kotiledon, planlet dan ortet tidak berhubungan langsung dengan proses abnormalitas. Abnormalitas yang terjadi diduga kemungkinan disebabkan oleh perubahan sekuens DNA genom atau

mutasi. Hal ini masih perlu untuk diteliti lebih lanjut.

Baurens *et al.* (2003) mengatakan bahwa untuk mempelajari metilasi sitosin pada DNA genom dengan pengukuran jumlah sitosin yang termetilasi pada tingkat genom, membutuhkan degradasi lengkap DNA secara enzimatis. Namun metode ini tidak dapat menentukan lokasi sitosin termetilasi pada genom. Menurut Rival *et al.* (2004) ditemukan juga hipometilasi pada kalus pertumbuhan cepat (100% regenerasi abnormal) dibandingkan dengan kalus kompak (5% regenerasi abnormal) pada klon yang sama. Shah *et al.* (1999) membuktikan terjadi hipermetilasi pada tanaman kelapa sawit abnormal. Kubis *et al.* (2003) menyatakan perbedaan tingkat metilasi sitosin antara kalus dan ortet adalah sekitar 2,2 %, atau tidak berbeda nyata. Tingkat metilasi lebih rendah pada pohon-pohon yang berasal dari klon buah bersayap dibandingkan dengan ortet tua.

Chen *et al.* (1988) dan Miura *et al.* (2001) mengatakan bahwa abnormalitas fenotipik disebabkan akumulasi mutasi. Finnegan *et al.* (1996) menyatakan bahwa sejumlah aberasi perkembangan yang terjadi, dihipotesiskan sebagai hasil hipometilasi genom global yang diinduksi secara genetik atau epigenetik dalam sekuens tunggal pada tanaman maupun hewan. Kakutani *et al.* (1996) menemukan terjadinya hipometilasi sitosin pada tanaman *Arabidopsis thaliana* yang termutasi. Jacobsen & Meyerowitz (1997) menyatakan bahwa hipometilasi DNA dapat meningkatkan laju mutasi karena terjadi transposisi elemen atau peningkatan laju rekombinasi penyusunan kembali genom. Perubahan pada level metilasi menginduksi mutasi atau supresi

gen. Metilasi menyebabkan perubahan morfologi dan fisiologi secara nyata pada tanaman.
Toruan-Mathius et al.



Gambar 3. Persentase 5-metilsitosin dari embriosomatik, planlet dan ortet normal klon MK 638.

Figure 3. 5-methylcytosin percentage of embryosomatic, plantlet and normal ortet of MK 638 clone.

Kaeppler & Phillips (1993) melaporkan bahwa perubahan metilasi DNA dapat menghasilkan perubahan struktur kromatin, sehingga replikasi terlambat pada heterokromatin, kecacuan kromosom, perubahan ekspresi gen. Hipometilasi pada kromosom spesifik berhubungan dengan ketidakstabilan kromosom sebagai penyebab kecacuan kromosom, atau efek dosis gen yang abnormal karena kehilangan atau penambahan fragmen kromosom. Fraga & Esteller (2002) menyatakan bahwa metilasi sitosin pada posisi lima dari cincin pirimidin merupakan epigenetik yang sangat penting pada tanaman, metil sitosin umumnya ditemukan pada sitosin yang terikat pada basa guanin dengan sekuens trinukleotida (C_pN_pG).

Sebagian besar hipotesis pola metilasi yang terbentuk selama perkembangan mengalami demetilasi pada jaringan spesifik dimana kelompok metil dilepaskan dari tempat kritis dari suatu gen yang telah dijadwalkan tereksresi pada tipe sel tertentu. Pada perkembangan awal sel embrio, sebagian besar gen termetilasi

kemudian diferensiasi sel membentuk jaringan spesifik terjadi penghilangan kelompok metil pada basa sitosin atau demetilasi menyebabkan gen-gen tereksresi pada jaringan tersebut (Gardner *et al.*, 1991). Lewin (1997) juga mengatakan kondisi metilasi dapat hilang dengan dua cara yaitu gagal terjadi metilasi pada situs hemimetilasi dan diturunkan melalui replikasi selanjutnya dan gugus metil secara efektif dihilangkan oleh enzim demetilase.

Untuk lebih memahami fenomena abnormalitas pada embrio somatik yang dihasilkan dari perbanyakan tanaman kelapa sawit menggunakan teknik kultur jaringan, diperlukan penelitian lebih lanjut menggunakan lebih banyak klon dan berbagai tingkat perkembangan embrio somatik.

Kesimpulan

Teknik RAF menggunakan primer AB-16, AE-11, AO-12 dan AP-12 dapat mendeteksi situs atau lokasi terjadinya

metilasi pada ES kotiledon abnormal dan ortet normal. Terjadi metilasi internal,

Deteksi metilasi DNA genom Elaeis guineensis Jacq hasil kultur jaringan.....

eksternal dan penuh pada 124 bp- 457 bp untuk ES kotiledon abnormal maupun

ortet normal Perbedaan kandungan metilasi sitosin antara ES globular normal dan abnormal, antara ES kotiledon normal dan abnormal, antara planlet dan ortet normal adalah berkisar antara 0,25 – 2,72 %, artinya terjadi hipometilasi. Hal ini mengindikasikan bahwa metilasi sitosin tidak berpengaruh langsung terhadap proses abnormalitas pada embriosomatik tanaman kelapa sawit.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini didanai oleh Dewan Riset Nasional dalam proyek "RUSNAS KELAPA SAWIT" untuk tahun 2007, yang pelaksanaannya dilakukan di Lab. Plant Tree Breeding and Biotechnology, SEAMEO BIOTROP. Untuk penelitian analisis RAF dilaksanakan di laboratorium Biotechnology PT BISI, Surabaya.

Daftar Pustaka

- Adams, R.L.P. (1990). DNA methylation. The effect of minor bases on DNA-protein interaction. *Biochem J.*, **265**, 309-320.
- Antequera, F. & A.P. Bird (1988). Unmethylation CpG island association with gene in higher plant DNA. *EMBO J.*, **7**, 2295-2299.
- Baurens, F.C, F. Bonnot, D. Bienvenu, S. Causse & T. Legavre (2003). Using SD-AFLP and MSAP to asses CCGG methylation in the banana genome. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **21**, 339-348.
- Belluci, M. F., F. Paolucci, Damiani & S. Arcioni (2002). Plant DNA methylation and gene expression. *In Jain, S.M. et.al. (Eds). Molecular Techniques in Crop Improvement.* USA, Kluwer Academic Pub. p. 501-509.

- Bird, A.P. (1996). Gene number, noise reduction and biological complexity. *Trends Genet.*, **11**, 94-100.
- Bird AP. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**, 209 – 213.
- Boyes, J. & A. Bird (1991). DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell*, **64**, 1123-1134.
- Chen, R.Z., U. Pettersson, C. Beard, L. Jackson-Grusby & R. Jaenisch (1988). DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*, **395**, 89-93.
- Corley, R.H.V., C.H. Lee, I.H. Law & C.Y. Wong (1986). Abnormal flower development in oil palm clones. *Planter*, **62**, 233-240.
- Davey, C., S. Pennings & J.Allen (1997). CpG methylation re-models chromatin structure *in vitro*. *J. Mol Biol.*, **267**, 276 -288.
- Ehrlich, M. & K. C. Ehrlich (1993). Effect of DNA methylation on the binding of vertebrate and plant proteins to DNA. *EXS* **64**, 145-168.
- Finnegan, E.J., W.J. Peacock & E.S. Dennis (1996). Reduce DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *In. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**, 8449 – 8454.
- Fraga, M.F. & M. Esteller (2002). DNA methylation: A profile of methods and applications. *Bio Tech.*, **33**, 632-649.
- Gardner, E.J., M.J.Simmons & D.P Snustad (1991). *Principle of Genetics*. 8th edition. New York, John Wiley & Sons, Inc. 649 p.

Grandbastein, M.A. (1998). Activation of plant retrotransposons under stress conditions.

Trends Plant Sci., **3**, 181-187.

Toruan-Mathius et al.

HersHKovitz, M., Y. Gruenbaum, P. Renbaum, A. Razin & A. Loyer (1990). Effect of CpG methylation on gene expression in transfected plant protoplasts. *Gene*, **94**, 189-193.

Jacobsen, S.E. & E.M. Meyerowitz (1997). Hypermethylated SUPERMAN epigenetic alleles in Arabidopsis. *Science*, **277**, 1100 – 1103.

Jaligot E., A. Rival, T. Beule, S. Dussert, & J.L. Verdeil (2000). Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. *Plant Cell Rep.*, **19** (7), 684 - 690.

Kaepfler, S.M., H.F. Kaepfler & Y. Rhee (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol. Biol.*, **43**, 179-188.

Kaepfler, S.M. & R.L. Phillips (1993). Tissue culture-induce DNA methylation variation in maize. *PNAS*, **90** (19), 8773-8776.

Kalisz, S. & M.D. Purugganan (2004). Epialleles via DNA methylation: consequences for plant evolution. *Trends in Ecol. & Evol.*, **19** (6), 309 – 314.

Kakutani, T., J.A. Jeddloh, S.K. Flowers, K. Minakota & E. J. Richards (1996). Developmental abnormalities and epimutations association with DNA hypomethylation mutation. *PNAS*, **93** (22), 12406 – 12411.

Kubis, S. E., A. M. M. F. Castilho, A.V. Vershinin & J. S. Helsop-Harrison (2003). Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant Mol. Biol.*, **52**, 69-79.

Larkin, P. J. & W. R. Scowcroft (1981). Somaclonal variation-A novel source of variability from cell culture for plant

improvement. *Theor. Appl. Genet.*, **60**, 167-214.

Leroy, X.J., K. Leon & M. Branchard (2000). BIP-ISSR and Somaclonal variation: a new molecular technique for a important in vitro phenomenon. *Electronic J. of Biotech.*, **3**, 10-11.

Lewin, B. (1997). *Genes VI*. New York, Oxford Univ. Press. 1260p.

Martienssen, R.A. & V. Colot (2001). DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science*, **293**, 1070-1074.

Matthes, M., R.Singh, S.C. Cheah & A. Karp (2001). Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLPs with methylation-sensitive enzymes. *Theor. Appl. Genet.*, **102**, 971-979.

Matassi, G., R. Melis, K.C. Kuo, G. Macaya, C.W. Gehrke & G. Bernardi (1992). Large-scale methylation patterns in the nuclear genomes of plant. *Gene*, **122**, 239 – 245.

McClelland, N., M. Nelson & E. Raschke (1994). Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferase. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 3640-3659.

Miura, A., S.Yonebayashi, K.Watanabe, T.Toyama & H. Shimada (2001). Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature*, **411**, 212 -214.

Ng, H.H. & A.P.Bird (1999). DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet. Dev.*, **9**, 158-163.

Orozco-Castillo C., K.J. Chalmers., R. Waugh & W.Powell (1994). Detection of genetic

- diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theor. Appl. Gen.*, **87**, 934-940.
- Deteksi metilasi DNA genom Elaeis guineensis Jacq hasil kultur jaringan.....*
- plants. *In Advances in Genetic*. Vol 29. USA, Academic Press. Inc. p, 41-75.
- Richards, E.J. & S.C.R. Elgin (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell*, **108**, 489-500.
- Rival, A., E. Jalignot, T. Beule, J.L. Verdil & J. Tregear (2004). Inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker in *Theobroma cacao* L. *J Am. Soc. Hort. Sci.*, **120**(4), 681-686.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab. Press. 2nd ed.
- Shapiro, H.S. (1976). Distribution of purines and pyrimidines in deoxyribonucleic acids. *In*. Fasman, G.D. (Ed). *CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology vol 2*. 3rd edition. Cleveland, CRC Press. p, 241-281.
- Shah, F.H., G.K.A. Parveez & A. B. Maharen (1999). Levels of C-methylation as molecular markers in oil palm. *In*. N. Rajanaidu & B.S. Jalani (Eds). *Proc. Symp. The Science of Oil Palm Breeding* Kuala Lumpur, Palm Oil Res. Inst. of Malaysia. p 256-273.
- Sianipar, N, F., G. A. Wattimena, H. Aswidinnoor, M.S. Thenawidjaya, N. Toruan-Mathius & G. Ginting (2007). Karakterisasi secara morfologi abnormalitas embriomatik kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) dari eksplan daun. *J. Agro Biogen.*, **3** (1), 32-39.
- Peschke, V.M. & R.L. Philips (1992). Genetic implication of somaclonal variation in
- Tregear, J. W., F. Marcillo, A. Berger, R. Singh, S. C. Cheah, C. Hartman, A. Rival & Y. Duval (2002). Characterization of a defensin gene expressed in oil palm inflorescence: induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variation events. *J. Exp Bot.*, **53**(373), 1387-1396.
- Van Harten, A.M. (1998). *Mutation Breeding. Theory and Practical Applications*. Cambridge, Cambridge Univ. Press. 353p.
- Waldron, J. (2002). Randomly amplified DNA fingerprinting: a culmination of DNA marker technologies based on arbitrarily-primed PCR amplification. *J. Biomed. & Biotech.*, **2**(3), 141-150.
- Wolffe, A.P., P.L. Jones & P.A. Wade (1999). DNA demethylation. *PNAS*, **96**(11), 5894-5896.
- Xiong, L.Z., C.G. Xu, M.A. Saghai-Marooof & Q. Zang (1999). Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Mol. Gen. Genet.*, **261**, 439-446.
- Xu Mingliang, Li Xiangqian & S.S. Korban (2004). DNA-methylation alterations and exchanges during *in vitro* cellular differentiation in rose (*Rosa hybrida* L.). *Theor. Appl. Genet.*, **109**, 899-910.