

Keragaman sekuen DNA fragmen gen penyandi ACCase subunit BCCP dari tiga tipe kelapa sawit

Variability of DNA sequence of gene fragment encoding BCCP subunit of ACCase from three types of oil palm

Asmini BUDIANI¹⁾, Djoko SANTOSO¹⁾ & A.R. PURBA²⁾

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

²⁾Pusat Penelitian Kelapa Sawit, Medan 20158, Indonesia

Summary

Heteromeric acetyl-CoA carboxylase (ht-ACCase) is one of key enzymes in palm oil biosynthesis. Isolation and characterization of the gene is an important step in metabolic engineering to increase palm oil content and quality. The objective of this research was to isolate DNA fragment of gene encoding biotin carboxyl carrier protein (BCCP) subunit of ht-ACCase from three different oil palm types (Simalungun, Hibrida and Backcross) and investigate the variation of its DNA sequence. Total RNA was isolated from the mesocarp of oil palm. DNA fragment encoding BCCP was amplified by means of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) using specific primers with total RNA as a template. The products of RT-PCR were then purified from the gel, cloned and sequenced. The DNA sequences were analyzed for their homologies to BCCP gene using BlastN and aligned to detect the sequence variability using ClustalW program from BioEdit. The results show that one of the two RT-PCR products at about 300 bp was highly homologous with the gene encoding BCCP from Glycine max, Brassica napus and Arabidopsis thaliana. Nucleotide sequences of that BCCP fragments from the three types of oil palm displayed some degrees of variability. Further investigation is needed to analyze the variability of the DNA sequences of the full-length gene in relation with oil content or other characters.

[Keywords: Acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxyl, carrier protein, DNA variability, oil palm].

Ringkasan

Asetil-CoA karboksilase heteromerik (ht-ACCase) merupakan salah satu enzim kunci dalam biosintesis minyak sawit. Isolasi dan karakterisasi gen tersebut merupakan langkah penting dalam upaya rekayasa metabolisme untuk peningkatan rendemen dan kualitas minyak sawit. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi fragmen DNA penyandi subunit *biotin carboxyl carrier protein* (BCCP) dari ht-ACCase dari tiga tipe kelapa sawit yang berbeda (Simalungun, Hibrida dan Backcross) dan mempelajari keragaman susunan nukleotidanya. RNA total diisolasi dari mesokarp buah sawit. Fragmen gen penyandi BCCP diamplifikasi dengan *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) menggunakan primer spesifik dan templat RNA total. Fragmen hasil RT-PCR dimurnikan dari gel, diklon kemudian disekuen. Sekuen DNA yang diperoleh dianalisis homologinya dengan gen BCCP menggunakan BlastN dan disejajarkan untuk mengetahui keragamannya menggunakan program ClustalW dari BioEdit. Hasilnya menunjukkan bahwa satu dari dua fragmen hasil RT-PCR yang berukuran sekitar 300 pb memiliki homologi yang tinggi dengan fragmen gen penyandi BCCP dari *Glycine max*, *Brassica napus* dan *Arabidopsis thaliana*.

Urutan nukleotida fragmen BCCP dari ketiga tipe kelapa sawit menunjukkan keragaman. Perlu analisis lebih lanjut mengenai keragaman sekuen DNA dari gen lengkapnya dan dikaji hubungannya dengan akumulasi minyak atau karakter lain.

Pendahuluan

Kebutuhan akan minyak sawit baik untuk konsumsi dalam negeri maupun untuk ekspor semakin meningkat sejalan dengan peningkatan jumlah penduduk dunia dan kesadaran akan bahaya kolesterol yang berasal dari lemak hewan dan asam lemak trans dari minyak tumbuhan tak jenuh yang mengalami proses hidrogenasi (Darmosarkoro, 2006). Di samping itu, minyak sawit merupakan salah satu bahan bakar alternatif pengganti minyak bumi yang dinilai sangat prospektif, sehingga di tahun yang akan datang permintaan akan minyak sawit juga semakin tinggi. Untuk mengantisipasi hal tersebut, maka upaya peningkatan produksi minyak sawit terus dilakukan.

Meskipun pemuliaan konvensional telah memberikan kontribusi yang nyata terhadap peningkatan produktivitas tanaman kelapa sawit, namun perbaikan genetik yang dihasilkan relatif lambat, antara lain karena lamanya siklus seleksi, keterbatasan *gene pool* dan kebutuhan pengujian yang ekstensif (Asmono, 2006). Oleh karena itu diperlukan pendekatan alternatif untuk membantu mengatasi masalah tersebut. *Marker Assisted Selection* (MAS), yang merupakan kombinasi antara pemuliaan klasik dengan penanda DNA dipercaya dapat memecahkan masalah inefisiensi dalam program pemuliaan. Penelitian ke arah tersebut tengah dilakukan oleh berbagai institusi (Rajinder et al., 2001; Asmono et al.,

2002; Billotte et al., 2005). Pendekatan lain dalam upaya peningkatan produktivitas adalah melalui rekayasa metabolisme untuk meningkatkan rendemen minyak.

Biosintesis minyak (triasil-gliserol) merupakan proses multikompartemen yang terdiri dari serangkaian reaksi dan melibatkan sejumlah enzim, sehingga enzim yang menjadi target dalam rekayasa metabolisme minyak adalah enzim kunci yang merupakan regulator dalam proses biosintesis minyak sawit. Asetil-CoA Karboksilase (ACCase) dilaporkan merupakan salah satu enzim kunci dalam biosintesis minyak pada berbagai tanaman (Jin et al., 1998; Francki et al., 2002. Page et al., 1994; Shintani & Ohlrogge 1995), termasuk pada kelapa sawit (Budiani, 2005; Budiani et al., 2006) Enzim ini mengkatalisis pembentukan malonil-CoA dari Asetil-CoA, tahapan pembatas dalam biosintesis minyak (Lehninger et al., 1993). Beberapa hasil penelitian menunjukkan adanya korelasi antara aktivitas ACCase dengan kecepatan sintesis asam lemak maupun dengan akumulasi minyak (Jin et al., 1998; Francki et al., 2002). Pada tanaman *barley*, jagung dan tembakau, ACCase terbukti merupakan enzim pengendali utama arus metabolit pada alur biosintesis lemak (Page et al., 1994; Shintani & Ohlrogge 1995).

Pada tanaman telah diketahui dan diisolasi dua bentuk ACCase yang berbeda secara fisik, yaitu ACCase homomerik (hm-ACCase) dan ACCase heteromerik (ht-ACCase) (Li & Cronan 1992; Sasaki et al., 1993, 1995; Alban et al., 1994; Shorrosh et al., 1994, 1995). Ht-ACCase terdiri dari empat subunit yaitu *biotin carboxylase* (BC) yang berfungsi mentransfer gugus karboksil ke biotin, *biotin-carboxyl carrier protein* (BCCP)

yaitu situs pengikatan biotin, dan *carboxyl transferase* (CT) α dan β , yang mentransfer gugus karboksil dari biotin ke senyawa lainnya (Li & Cronan, 1992). Berbeda dengan ht-ACCase yang terdiri dari subunit yang dapat dipisahkan satu dengan lainnya, pada hm-ACCase ketiga domain (BC, BCCP, dan CT) terdapat dalam satu polipeptida yang tidak terpisahkan (Sasaki *et al.*, 1995).

Gen-gen penyandi BC, BCCP dan CT dari ht-ACCase telah diklon antara lain dari *A. thaliana* (Choi *et al.*, 1995), *B. napus* (Schulte *et al.*, 1994, 1997), jagung (Ashton *et al.*, 1994) dan tembakau (Shorosh *et al.*, 1995). Demikian juga gen penyandi hm-ACCase (Egli *et al.*, 1993, Shorosh *et al.*, 1994, Anderson *et al.*, 1995). Budiani (2005) melaporkan adanya dua isoform BCCP dengan berat molekul sekitar 37 dan 32 kD dalam mesokarp buah kelapa sawit. Ekspresi kedua protein tersebut sangat tinggi pada buah masak yang kandungan minyaknya tinggi, sebaliknya pada buah muda yang belum aktif mensintesis minyak, ekspresinya sangat rendah. Hal tersebut menunjukkan bahwa BCCP mempunyai peran penting dalam proses akumulasi minyak. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi sekuen DNA fragmen gen penyandi BCCP dari tiga tipe kelapa sawit yang berbeda rendemen minyaknya, sebagai bagian dari upaya mempelajari regulasi ekspresi gen penyandi ACCase pada mesokarp buah kelapa sawit.

Bahan dan Metode

Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mesokarp buah sawit yang sedang aktif mensintesis minyak dari tiga tipe kelapa sawit, yaitu Simalungun,

Hibrida dan Backcross. Tipe pertama adalah hasil persilangan Dura x Pisifera (D x P) yang termasuk dalam spesies *E. guineensis* yang tinggi rendemen minyaknya. Tipe kedua merupakan hasil silangan antara Simalungun dengan *E. oleifera* yang tinggi kandungan oleatnya, tetapi rendemen minyaknya rendah. Sedangkan tipe ketiga adalah hasil silang balik Hibrida dengan Simalungun.

Perancangan primer untuk amplifikasi fragmen BCCP

Perancangan primer untuk amplifikasi fragmen gen penyandi BCCP dilakukan berdasarkan informasi sekuen gen tersebut yang tersedia di *GenBank*. Sekuen gen yang sama dari berbagai spesies tanaman diijarkan menggunakan program *BioEdit ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), sehingga dapat diidentifikasi daerah konservatifnya. Berdasarkan sekuen daerah konservatif tersebut didesain primer menggunakan program *Primer3* (<http://www.biotech.uconn.edu/>).

Isolasi RNA dari mesokarp buah kelapa sawit

Isolasi RNA dari jaringan mesokarp dilakukan menggunakan prosedur sebagaimana dilaporkan oleh Chaidamsari (2005). Jaringan mesokarp dihaluskan dalam nitrogen cair, dihomogenkan dengan bufer ekstraksi (Tris.HCl 0,2 M, LiCl 0,3 M, EDTA 0,01 M, thiourea 5 mM, asam aurin trikarboksilat 1 mM, dan β -merkapto-etanol 1%) dengan dikocok kuat-kuat, kemudian ditambahkan satu volume larutan fenol : kloroform : isolamil alkohol (25:24:1). Setelah divorteks 3x30 detik, campuran disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit pada suhu

4 °C. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke tabung sentrifus baru kemudian dilakukan ekstraksi kembali menggunakan campuran kloroform : isoamil alkohol. Setelah divortex 3x30 detik, campuran disentrifus pada 15.000 rpm selama 15 menit pada 4°C. Lapisan atas dipindahkan ke dalam tabung sentrifus baru, kemudian ditambahkan 1/30 volume larutan Na⁺asetat 3,3 M dan 0,1 volume etanol absolut. Setelah dikocok perlahan, campuran disimpan dalam es selama 30 menit. Endapan dipisahkan dengan disentrifugasi 15.000 rpm selama 20 menit. Ke dalam supernatan ditambahkan 1/10 volume larutan Na⁺asetat 3,3 M dan dua volume etanol absolut. Setelah disentrifugasi 15.000 rpm selama 20 menit, endapan RNA dibilas dengan etanol 70% dingin dan disentrifugasi pada 8.000 rpm selama lima menit. Semua sisa etanol diuapkan dan endapan RNA dilarutkan dalam *DEPC-treated* H₂O. RNA hasil isolasi dimurnikan dari kontaminan DNA dengan menambahkan 8M LiCl sebanyak volume tertentu sehingga konsentrasi akhirnya menjadi 2 M, kemudian larutan disimpan selama 4-16 jam dalam lemari pendingin (kulkas). Setelah disentrifugasi pada suhu 4°C selama 20 menit, endapan dibilas dengan etanol dingin 70% (5.000 rpm, lima menit) kemudian dilarutkan dalam *DEPC-treated* H₂O. RNA yang diperoleh diuji kualitas dan kuantitasnya dengan elektroforesis pada gel agarosa 1% dan dengan mengukur absorbansinya pada λ 260, 280 dan 230 nm.

Amplifikasi fragmen gen penyandi BCCP dengan RT-PCR

RT-PCR menggunakan primer heterologus yang dirancang untuk amplifikasi fragmen daerah konservatif gen penyandi

BCCP dilakukan dengan templat RNA total mesokarp dari ketiga tipe yang dianalisis. Sintesis utas pertama cDNA dilakukan dengan kit *Superscript II First Strand cDNA Synthesis* dari Invitrogen menggunakan primer oligo-dT yang tersedia dalam kit. Selanjutnya reaksi PCR dilakukan menggunakan primer spesifik heterologus yang telah dirancang sebelumnya, dengan program sebagai berikut: satu siklus denaturasi awal pada suhu 94°C selama dua menit, 35 siklus masing-masing terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama 15 detik, penempelan primer pada suhu 55°C selama 45 detik, dan ekstensi pada suhu 70°C selama dua menit. Selanjutnya reaksi diakhiri dengan ekstensi pada suhu 70°C selama empat menit. Untuk mendapatkan hasil yang terbaik dilakukan optimasi kondisi PCR terutama pada suhu penempelan. Hasil PCR diverifikasi pada gel agarosa.

Isolasi dan kloning fragmen gen BCCP

Fragmen DNA hasil RT-PCR diisolasi dan dimurnikan dari gel menggunakan kit *AxyPrepTM DNA Gel Extraction* (Axygen), kemudian diklon ke dalam sel *E. coli* DH5 α kompeten menggunakan vektor pGEM-T easy (Promega). Prosedur untuk preparasi sel kompeten dan transformasinya dilakukan sesuai petunjuk dalam buku manual (Doyle, 1996). Sel-sel transforman ditumbuhkan pada medium seleksi LB agar yang mengandung antibiotik ampicilin 50 mg/L dan IPTG 0,1 mM serta X-Gal 40 mg/L.

Pengujian adanya fragmen DNA BCCP dalam sel yang tumbuh pada medium seleksi dilakukan dengan PCR koloni. Koloni tunggal berwarna putih dihomogenkan pada 10 μ L H₂O, kemu-

dian suspensi sel diinkubasi pada mesin PCR untuk lisis sel dengan program sebagai berikut: 96°C, lima menit; 50°C, satu menit 30 detik; 96 °C, satu menit 30 detik; 45°C, satu menit 30 detik; 96°C, satu menit; dan 40°C, satu menit. Selanjutnya ke dalam setiap tabung mikro berisi suspensi sel yang telah dilisis dimasukkan campuran reaksi PCR yang terdiri dari 2 µL bufer PCR 10x, 0,6 µL MgCl₂ 50 mM, 0,4 µL dNTP 10 mM, 0,12 µL masing-masing primer 50 pmol, 6,71 µL dH₂O dan 0,05µL Taq DNA polymerase. Amplifikasi dijalankan dengan kondisi PCR sebagai berikut: denaturasi pada suhu 94°C selama 15 detik, penempelan primer pada suhu 55°C selama 45 detik dan ekstensi DNA pada suhu 70°C selama dua menit, dengan jumlah siklus sebanyak 35. Koloni yang telah terkonfirmasi mengandung sisipan DNA target dikulturkan pada medium LB yang mengandung ampisilin, kemudian diisolasi plasmid rekombinannya menggunakan *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche) dengan cara sebagaimana diuraikan dalam buku manualnya. Plasmid rekombinan hasil isolasi kemudian didigesti dengan enzim restriksi *EcoRI* dan diverifikasi pada gel agarosa.

Analisis sekuen DNA fragmen hasil RT-PCR

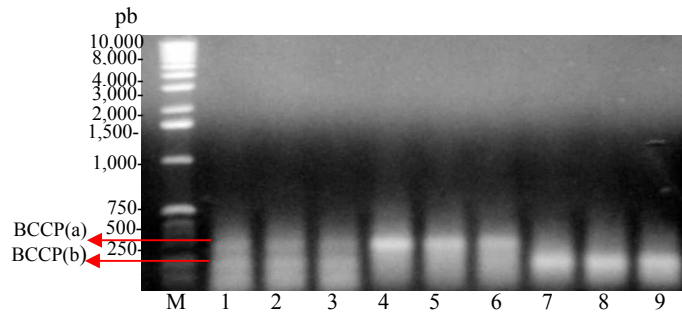
Untuk mengetahui susunan nukleotida dari fragmen DNA terklon dilakukan sekuensing menggunakan primer universal. Sekuensing DNA dilakukan di Lembaga Biologi Molekuler Eijkmann, Jakarta. Sekuen DNA yang dihasilkan selanjutnya dianalisis homologinya menggunakan BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) dan dianalisis keragaman nukleotidanya melalui penjajaran dengan Clustal-W program BioEdit.

Hasil dan Pembahasan

Amplifikasi fragmen gen penyandi BCCP dengan RT-PCR

Primer untuk amplifikasi daerah konservatif gen penyandi BCCP dirancang berdasarkan hasil penjajaran gen yang sama dari beberapa tanaman lain, karena sampai saat ini sekuen DNA gen tersebut dari kelapa sawit belum pernah dilaporkan. Urutan nukleotida pasangan primer tersebut adalah: BCCP2-F : 5'- ACCTA CACCA CCACCAGCTC dan BCCP2-R : 5'-TAA ACAGAGGCGTGT CAACG. Pasangan primer tersebut kemudian digunakan dalam reaksi RT-PCR untuk mengamplifikasi fragmen BCCP dengan templat RNA total dari mesokarp buah sawit. Dari hasil elektroforesis maupun hasil pengukuran serapannya menggunakan alat spektrofotometer pada λ 260, 280 dan 230 nm menunjukkan bahwa RNA total yang diisolasi dari mesokarp buah ketiga tipe kelapa sawit mempunyai kualitas dan kuantitas tinggi dan memenuhi syarat untuk reaksi RT-PCR (data tidak disajikan). Hasil amplifikasi menunjukkan adanya dua fragmen DNA yaitu fragmen BCCP(a) dengan ukuran sekitar 300 pb dan fragmen BCCP(b) berukuran sekitar 200 pb (Gambar 1). Usaha untuk mendapatkan hasil yang

lebih baik dengan mencoba beberapa suhu penempelan dan konsentrasi Mg²⁺ ternyata tidak memberikan hasil sebagaimana diinginkan. Oleh karena itu, kedua fragmen DNA hasil RT-PCR tersebut masing-masing direamplifikasi, sehingga diperoleh fragmen DNA berukuran sekitar 300 pb (Gambar 1, lajur 4-6) dan 200 pb (Gambar 1, lajur 7-9). Untuk mengetahui fragmen mana yang sesuai dengan target



Gambar 1. Profil elektroforesis hasil RT-PCR menggunakan pasangan primer BCCP2F/R. Lajur 1-3 berturut-turut Simalungun (S), Hibrida (H) dan Backcross (BC), lajur 4-6 hasil reamplifikasi dengan templat fragmen BCCP(a) dari S, H dan BC; lajur 7-9 hasil reamplifikasi dengan templat fragmen BCCP(b) dari S, H dan BC. M : Marker DNA 1 kb ladder.

Figure 1. Electrophoretic profile of RT-PCR product using primer pair of BCCP2F/R. Lanes 1-3: Simalungun, (S), Hibrida (H) and Backcross (BC) respectively. Lanes 4-6: reamplification product using template of BCCP(a) fragment of S, H and BC; Lanes 7-9: reamplification product using template of BCCP(b) fragment of S, H and BC.

DNA yaitu yang mempunyai homologi dengan BCCP, maka kedua fragmen tersebut dimurnikan dari gel kemudian diseku. Hasil analisis sekuen ternyata menunjukkan bahwa hanya fragmen BCCP(a) yang homolog dengan gen penyandi BCCP, sehingga, hanya fragmen BCCP(a) yang kemudian diklon dan dianalisis lebih lanjut.

Isolasi dan kloning fragmen hasil RT-PCR

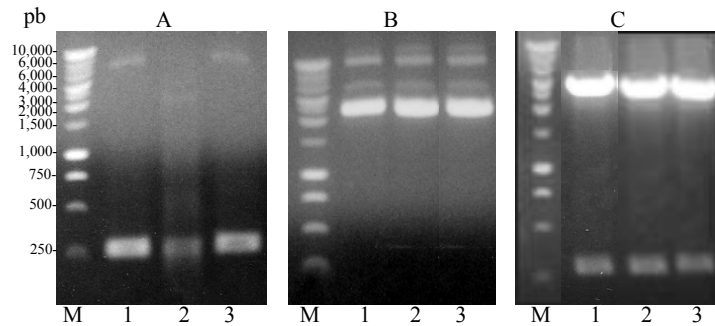
Fragmen BCCP(a) diisolasi dan dimurnikan dari gel kemudian diligasikan ke vektor kloning pGEM-T easy dilanjutkan dengan kloning ke dalam *E. coli*. Gambar 2A menunjukkan elektroforesis hasil PCR koloni menggunakan pasangan primer BCCP2-F/R dari sel-sel rekombinan hasil transformasi fragmen BCCP(a) masing-masing dari Simalungun, Hibrida dan Backcross. Nampak bahwa ketiga koloni mengandung sisipan DNA yang berdasarkan ukurannya diharapkan adalah BCCP(a). Gambar 2B adalah hasil elektroforesis plasmid rekombinan yang diisolasi

dari ketiga koloni, yang melalui PCR telah terbukti mengandung sisipan DNA. Sedangkan hasil digesti plasmid rekombinan dengan enzim berasal dari tipe Simalungun, Hibrida dan Backcross telah terklon pada *E. coli* DH5 α restriksi *Eco*RI disajikan pada Gambar 2C, yang menunjukkan bahwa ketiga fragmen DNA dari BCCP(a) yang masing-masing berasal dari tipe Simalungun, Hibrida dan Backcross telah terklon pada *E. coli* DH5 α .

Analisis sekuen DNA fragmen BCCP dari ketiga varietas

Sekuen DNA fragmen BCCP(a) dari tipe Hibrida disajikan pada Gambar 3, sedangkan Tabel 1 adalah rangkuman hasil analisis BlastN sekuen DNA dari fragmen tersebut. Seperti halnya sekuen DNA dari tipe Hibrida, sekuen DNA dari Simalungun dan Backcross juga menunjukkan homologi dengan gen penyandi BCCP dari *G. max*, *B. napus* dan *A. thaliana* (data tidak ditampilkan).

Keragaman sekuen DNA fragmen gen penyandi ACCase...



Gambar 2. Hasil elektroforesis dari (A) PCR koloni transforman yang mengandung sisipan DNA fragmen BCCP(a); (B) plasmid rekombinan yang diisolasi dari koloni transforman; (C) hasil digesti plasmid rekombinan dengan *EcoRI*. (lajur 1: Simalungun; 2: Hibrida; 3: Backcross; M: marker DNA 1 kb ladder).

Figure 2. Electrophoretic product of (A) colony PCR of the transformants containing DNA fragment of BCCP(a); (B) recombinant plasmids isolated from the transformant colonies; (C) Digestion product of recombinant plasmid with *EcoRI*. (lane 1: Simalungun; 2: Hibrida; 3: Backcross; M: 1-kb DNA ladder).

Hasil penjarangan sekuen fragmen BCCP(a) menunjukkan adanya variabilitas pada sekuen DNA dari ketiga sampel (Gambar 4). Variabilitas yang tinggi (*less conserved region*) terdapat pada nukleotida ke 1 - 110 dan nukleotida diatas 187. Sebaliknya nukleotida ke 111 - 187 menunjukkan tingkat keragaman yang lebih rendah (*conserved region*). Perbedaan pada susunan nukleotida ini sangat menarik terutama mengingat bahwa ketiga tipe kelapa sawit yang dianalisis mempunyai karakteristik yang berbeda. Simalungun (*E. guineensis*) adalah tipe komersial yang rendemen minyaknya tinggi (sekitar 58-60 %) tetapi kandungan oleatnya rendah, sedangkan Hibrida (Simalungun x *E. oleifera*) mempunyai karakter antara *E. guineensis* dan *E. oleifera*. Rendemen minyak pada Hibrida lebih tinggi dibandingkan dengan *E. oleifera* yaitu sekitar 33%, demikian juga kandungan oleatnya lebih tinggi dibandingkan dengan

Simalungun. Karakter lain yang berbeda adalah kecepatan tumbuh batang. Pada umur yang sama, tinggi batang dari tipe Hibrida lebih kurang setengah dari tinggi batang dari tipe Simalungun. Pada Backcross, karakter rendemen minyak yang dimiliki hampir sama dengan Simalungun, kandungan oleatnya lebih tinggi sedangkan pertumbuhan batangnya lebih lambat dibandingkan dengan Simalungun.

Sebagai salah satu subunit dari ht-ACCase, BCCP tidak mempunyai aktivitas katalitik namun berperan penting dalam sintesis malonil-CoA dari asetil-CoA. Gugus karboksil (CO_2) dari bikarbonat diikat oleh molekul biotin yang terdapat pada BCCP kemudian ditransfer ke asetil-CoA sehingga menjadi malonil-CoA. Adanya lebih dari satu jenis BCCP telah dilaporkan pada beberapa tanaman. Pada *A. thaliana* telah diidentifikasi adanya dua isoform BCCP (AtBCCP1 dan

```

GCAACCAAGCATATGGGAAGCCATCGCTCTTGCTCCTTTCAGCCCCCGA 50
TGGCCGGAACATTTTACCGCCGCCACCACCTGGGGCCCCCCTTCTCGA 100
GGGTTGGAGACAAGGGGCACCCTGGCCAGGTTGTTTGCATCATTGAGGCT 150
ATGAAATTGATGAATGAGATTGAGGCTGATCACTCTCCTCTTCTCTGAG 200
ATATCGCAGAAGATGGAAAAGCAGTTAGCGTTGACACGCCTCTGTTTAA 250
TTAACCTGCTTGAACGACACACATGACTTTGGATTTCCTCCAGGAGGAGT 300
TGGCACCAGTTCCAAAAGGCTGAAACCATCCCTGTCCTCCATGAGATGAT 350
CCTT..... 354
    
```

Gambar 3. Sekuen DNA fragmen BCCP(a) dari varietas Hibrida.

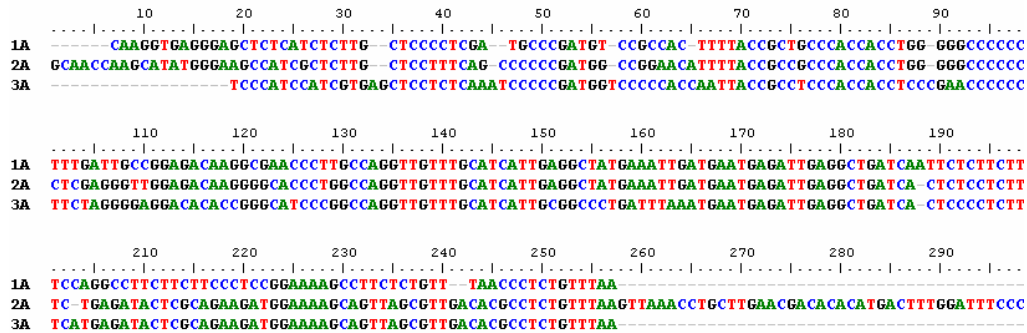
Figure 3. DNA sequence of BCCP (a) fragment of Hibrida variety.

Tabel 1. Protein BCCP dan spesies tanaman asalnya, diambil dari hasil analisis BlastN dengan sekuen entri fragmen BCCP (a) varietas Hibrida.

Table 1. BCCP protein and its plant sources, adopted from the output of BlastN analysis with an entry sequence of the BCCP (a) fragment of Hibrida variety.

No. akses bank gen	Protein homolog	Spesies	Skor (bit)	E-value
gi 1143318 gb U40666.1 GMU40666	BCCP precursor (accB-1)	<i>G. max</i>	73,8	2e-10
gi 1070009 emb X90732.1 BNPBP7	BCCP mRNA (pBP7)	<i>B. napus</i>	69,9	4e-09
gi 44190487 gb AY538674.1	BCCP mRNA (pBP6)	<i>B. napus</i>	67,9	1e-08
gi 1070005 emb X90730.1 BNPBP4	BCCP mRNA (pBP4)	<i>B. napus</i>	67,9	1e-08
gi 12006164 gb AF271071.1 AF271071	BCCP precursor (accB-2)	<i>G. max</i>	58,0	1e-05
gi 30685405 ref NM_121557.2	BCCP2 mRNA	<i>A. thaliana</i>	54,0	2e-04
gi 8886868 gb AF223948.1 AF223948	BCCP2 mRNA	<i>A. thaliana</i>	54,0	2e-04

Keragaman sekuen DNA fragmen gen penyandi ACCase...



Gambar 4. Hasil penjarangan sekuen fragmen BCCP-a ketiga tipe. 1A : Simalungun; 2A: Hibrida; 3A: Backcross.

Figure 4. Alignment of the sequences of the BCCP-a fragment of the three types. 1A : Simalungun; 2A Hibrida; 3A: Backcross.

AtBCCP2) (Thelen *et al.*, 2001). AtBCCP1(37 kD) terdapat pada semua organ sedangkan AtBCCP2 (25 kD) lebih dominan pada biji. Pada biji yang sedang berkembang dari tanaman rapeseed, dideteksi empat BCCP dengan ukuran 22, 25, 35 dan 37 kD. Selain pada biji yang sedang berkembang, protein 37 kD juga terdapat pada daun, sedangkan tiga protein lainnya tidak (Thelen *et al.*, 2001). Pada mesokarp buah kelapa sawit, adanya dua isofarm BCCP dan peran penting keduanya dalam akumulasi minyak telah ditunjukkan oleh hasil penelitian sebelumnya (Budiani, 2005).

Perbedaan sekuen DNA ketiga fragmen BCCP yang berasal dari tipe kelapa sawit yang berbeda memberikan harapan kemungkinan dapat dikembangkan suatu pelacak yang dapat menjadi pembeda antar varietas dengan karakter tertentu seperti rendemen minyak tinggi, kecepatan pertumbuhan batang, ataupun

kandungan oleat. Namun karena sekuen DNA yang dianalisis pada penelitian ini hanya sebagian dari sekuen gen lengkapnya, maka belum dapat ditarik suatu korelasi antara keragaman sekuen yang ada dengan karakter tertentu terutama rendemen minyak. Untuk itu berdasarkan informasi sekuen yang telah diperoleh pada penelitian ini dapat dilakukan analisis lebih lanjut terhadap keragaman sekuen DNA BCCP yang lebih panjang, dan apabila memungkinkan dari gen lengkapnya, maupun dari daerah 5'-flanking gennya. Selanjutnya dapat dikaji hubungan sekuen DNA yang dihasilkan dengan karakter tertentu, seperti rendemen minyak, menggunakan teknik-teknik yang telah berkembang seperti RFLP maupun PCR genomik., serta memanfaatkan peta pautan (*high density linkage map*) yang telah disusun oleh Billotte *et al.* (2005) dan data kuantitatif rendemen minyak.

Kesimpulan dan Saran

Fragmen gen penyandi BCCP telah diisolasi dari mesokarp buah kelapa sawit tipe Simalungun, Hibrida dan Backcross. Sekuen DNA fragmen gen penyandi BCCP dari ketiga tipe kelapa sawit tersebut menunjukkan variabilitas tinggi. Analisis lebih lanjut terhadap sekuen lengkap dari gen penyandi BCCP memberikan harapan dapat dirakitnya suatu pelacak/marka rendemen minyak.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian yang didanai RUT XII berjudul "Regulasi ekspresi gen penyandi ACCase dalam produksi minyak pada mesokarp buah kelapa sawit sebagai dasar perakitan

Marka Rendemen minyak tinggi". Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Negara Riset dan Teknologi RI atas pembiayaan penelitian RUT XII yang telah diberikan.

Daftar Pustaka

- Alban, C., P. Baldet & R. Douce (1994). Localization and characterization of two structurally different forms of acetyl-CoA carboxylase in young pea leaves, of which one is sensitive to aryloxy-phenoxypropionate herbicides. *Biochem. J.*, **30**, 557-565.
- Anderson, J.V., S.M. Lutz, B.G. Gengenbach & J.W. Gronwald (1995). Genomic sequence for a nuclear gene encoding acetyl-Coenzyme A carboxylase (Accession no. L42814) in soybean. *Plant Physiol.*, **109**, 338-340.
- Ashton, A.R., C.L. Jenkins & P.R. Whitfield. (1994). Molecular cloning of two different cDNAs for maize acetyl-CoA carboxylase. *Plant Mol. Biol.*, **24**, 35-49.
- Asmono, D., N. Toruan-Mathius, Subronto, D.P. Komalaningtyas, T. Hutabarat, Subardjo (2002). Pemetaan genom pengendali produktivitas minyak pada kelapa sawit. *Laporan Riset Unggulan Terpadu VII Bidang Bioteknologi*. Jakarta, Kementerian Riset dan Teknologi RI dan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, 2002.
- Asmono, D. (2006). Penelitian dan Pengembangan teknologi genomik dan rekayasa genetika kelapa sawit: Status saat ini dan permasalahannya. *Focus Group Discussion Agenda Riset Penguatan Industri Hulu Kelapa Sawit, MAKSI PPS-IPB*. Bogor, 20 April 2006.
- Billotte, N., N. Marseillac, A.M. Risterucci, B. Adon, P. Brottier, F.C. Baurens, R. Singh, A. Herran, H. Asmady, C. Billot, P. Amblard, T. Durran-Gasselin, B. Courtois, D. Asmono, S.C. Sheah, W. Rohde, E. Ritter, A. Charrier (2005). Microsatellite-based high density linkage map in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theor. Appl. Genet.*, **110**(4), 754-765.
- Budiani A. (2005). Ekspresi protein spesifik dalam biosintesis minyak dan Kloning gen penyandi ht-ACCase subunit biotin karboksilase dan enoil-ACP reduktase dari mesokarp kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Disertasi S3*. Bogor. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Budiani, A., D. Santoso, H. Aswidinnoor & A. Suwanto (2006). Aktivitas ACCase mesokarp kelapa sawit dan kloning fragmen gen penyandi ACCase subunit biotin karboksilase. *Menara Perkebunan*, **74** (1), 33-43.
- Chaidamsari, T. (2005). Biotechnology for cocoa pod borer. *Ph.D. Thesis* Wageningen, Wageningen University.

- Choi, J-K, F. Yu, E.S. Wurtele & B.J. Nikolau (1995). Molecular cloning and characterization of the cDNA coding for the biotin-containing subunit of the chloroplastic acetyl-CoA carboxylase. *Plant Physiol.*, **109**, 619-626.
- Darmosarkoro, W. (2006). Toward sustainable oil palm industry in Indonesia. In: *Proc. International Oil Palm Conference IOPC 2006*. Bali, Indonesia 19 – 23 June 2006.
- Doyle K. (1996). *Promega Protocols and Application Guide*. 3rd ed. Madison, Promega Corporation, p. 41-54.
- Egli, M.A., B.G. Gengenbach, J.W. Gronwald, D.A. Somers & D.L. Wyse (1993). characterization of maize acetyl-coenzyme A carboxylase. *Plant Physio.*, **101**, 499-506.
- Francki, M.G., P. Whitaker, P.M. Smith & C.A. Atkins (2002). Differential expression of a novel gene during seed triacylglycerol accumulation in lupin species (*Lupinus angustifolius* L. and *L. mutabilis* L.). *Functional & Integrative Genomics*, **26**, 292-300.
- Jin, E.S., J.H. Orf & J.W. Gronwald (1998). Oil accumulation and acetyl-CoA carboxylase activity in developing soybean seed. TEKTRAN US Dept of Agriculture. *Agricultural Research Service*.
- Lehninger, AL, D.L Nelson & M.M Cox. (1993). *Principles of Biochemistry* 2nd ed. New York, Worth Publishers.
- Li, S-J & Je. Jr. Cronan (1992). The gene encoding the biotin carboxylase subunit of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 855-863.
- Page, R.A., S. Okada & J.L. Harwood (1994). Acetyl-CoA carboxylase exerts strong flux control over lipid synthesis in plants. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1210**, 369-372.
- Rajinder, S., S.C. Cheah, M. Madon, L.C.L. Ooi & A.R. Rahimah (2001) Genomic Strategies for enhancing the value of oil palm. In *Proc. of the PIPOC 2001 International Palm Oil Congress*. Agriculture Conference. pp. 3-17.
- Sasaki, Y., K. Hakamada, Y. Suama, Y. Nagano, I. Furusawa & R.Matsuno (1993). chloroplast-encoded protein as a subunit of acetyl-CoA carboxylase in pea plant. *J. Biol. Chem.*, **268**, 25118-25123.
- Sasaki, Y., T. Konishi & Y. Nagano (1995). The compartementation of acetyl-coenzyme A carboxylase in plants. *Plant Physiol.*, **108**, 445-449.
- Schulte, W., J. Schell & R. Topfer (1994). A gene encoding acetyl-coenzyme A carboxylase from *Brassica napus*. *Plant Physiol.*, **106**, 793-794.
- Schulte, W., R. Topfer, R. Srracke, J. Schell & N. Martini (1997). Multi-functional acetyl-CoA carboxylase from *Brassica napus* is encoded by multi-gene family : indication for plastidic localization of at least one isoform. In : *Proc. Natl. Acad Sci.*, **94**, 3465-3470.
- Shintani, D.K. & J.B. Ohlrogge (1995). Feedback inhibition of fatty acid synthesis in tobacco suspension cells. *Plant J.*, **7**, 577-578.
- Shorrosh, B. S., R. A. Dixon & J.B. Ohlrogge (1994). Molecular cloning, characterization and elicitation of acetyl-CoA carboxylase from alfalfa. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 4323-4327.
- Shorrosh, B.S., K.R. Roesler, D. Shintani, F.J. van de Loo & J.B. Ohlrogge (1995). Structural analysis, plastid localization and expression of the biotin carboxylase subunit of acetyl-coenzyme A carboxylase from tobacco. *Plant Physiol.*, **108**, 805 – 812.
- Thelen, J.J., S Mekhedov & J.B. Ohlrogge (2001). Brassicaceae express multiple isoform of biotin carboxyl carrier protein in tissue-specific manner. *Plant Physiol.*, **125**, 2016 - 2028.