

## Kloning cDNA lengkap penyandi ACCase subunit biotin carboxylase dari mesokarp kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.)

*Cloning of full length cDNA encoding ACCase subunit biotin carboxylase from mesocarp of oil palm (Elaeis guineensis Jacq.)*

Asmini BUDIANTI<sup>1)</sup>, Antonius SUWANTO<sup>2)</sup>, Hajriah ASWIDINNOOR<sup>3)</sup>,  
Djoko SANTOSO<sup>1)</sup> & Basil J NIKOLAU<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Jl. Taman Kencana No. 1 Bogor 16128, Indonesia

<sup>2)</sup> Departemen Biologi, Fakultas Matematika & Ilmu Pengetahuan Alam IPB, Kampus IPB Dramaga Bogor 16680, Indonesia

<sup>3)</sup> Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian IPB, Kampus IPB Dramaga Bogor 16680, Indonesia

<sup>4)</sup> Department of Biochemistry, Biophysics & Molecular Biology, Iowa State University, Ames – USA

Diterima tanggal 26 Agustus 2013/disetujui tanggal 12 Nopember 2013

### Abstract

*Acetyl-CoA Carboxylase (ACCase) is considered to be one of the key enzymes in palm oil biosynthesis. Availability of genes encoding this enzyme would give some advantages in the molecular breeding of oil palm. Over expression of the genes in the oil palm mesocarp might increase the oil production in this tissue. On the other hand, down regulating of ACCase could divert the central metabolite Acetyl-CoA to other product such as PHB (Polyhydroxy-butyrates), one of the known biodegradable plastic. This paper reported the work of cloning of the full length coding sequence of biotin carboxylase (BC), one subunit of the ACCase. Based on the DNA sequence of the BC conserved region that had been cloned previously, primers pairs were designed to amplify 5'- and 3'- cDNA ends of BC using RACE-PCR. The RACE products of 5'- and 3'- cDNA ends of BC were cloned into E.coli, and the DNAs were sequenced and analysed. The full cDNA of BC was obtained by re-isolation of the cloned 5'- and 3'- cDNA ends followed by digestion using KpnI, ligation into pGEM-T vector and cloning into E.coli. Colony PCR was carried out to confirm that the target gene has been cloned. The recombinant plasmid containing full cDNA of BC was then isolated for DNA sequencing. The results showed that the 5'-BC (1367 bp), 3'- BC (1032 bp), and the full length cDNA encoding BC (2182 bp) had been successfully cloned, and the DNA sequence had been confirmed as gene encoding ACCase subunit biotin carboxylase.*

[Keywords: Heteromeric ACCase, palm oil biosynthesis, fatty acid, RACE-PCR]

### Abstrak

Acetyl-CoA Carboxylase (ACCase) merupakan salah satu enzim kunci dalam biosintesis minyak sawit. Ketersediaan gen penyandi enzim ini sangat berguna dalam pemuliaan kelapa sawit secara molekuler. *Over-ekspresi* gen penyandi ACCase pada mesokarp dapat meningkatkan produksi minyak pada jaringan tersebut. Sebaliknya, ekspresi ACCase dapat ditekan melalui mekanisme *down regulation* sehingga metabolit central Acetyl-CoA dapat diarahkan untuk menghasilkan produk lain seperti PHB (polyhydroxybutyrate), salah satu jenis *biodegradable* plastik yang telah

banyak dikenal. Penelitian ini bertujuan untuk mengklon cDNA lengkap penyandi ACCase subunit biotin carboxylase (BC) dari mesokarp kelapa sawit. Berdasarkan sekuen DNA daerah konservatif BC yang telah diklon dari mesokarp kelapa sawit pada penelitian sebelumnya, dua pasang primer dirancang untuk mengamplifikasi daerah ujung 5'- dan 3'- cDNA BC dengan RACE-PCR. Produk 5'-RACE dan 3'-RACE diklon dan diseku. cDNA lengkap penyandi BC diperoleh dengan jalan mengisolasi kembali fragmen 5'- dan 3'- cDNA terklon, dilanjutkan dengan digesti menggunakan enzim restriksi *KpnI*, ligasi kedua fragmen ke vektor kloning pGEM-T, dan introduksi ke dalam *E. coli*. Setelah dilakukan PCR koloni untuk menguji keberhasilan kloning, plasmid rekombinan yang mengandung cDNA lengkap dari BC diisolasi untuk analisis sekuen DNA. Dari penelitian ini fragmen cDNA 5'-BC (1367 pb) dan 3'- BC (1032 pb), serta cDNA lengkap penyandi BC berukuran 2182 pb telah diperoleh dan diklon dalam *E. coli*. Analisis sekuen DNA mengkonfirmasi bahwa cDNA terklon adalah benar gen penyandi ACCase subunit biotin carboxylase.

[Kata kunci: ACCase heteromerik, biosintesis minyak sawit, asam lemak, RACE-PCR]

### Pendahuluan

Acetyl-CoA carboxylase (ACCase) merupakan salah satu enzim yang berperan penting dalam biosintesis minyak. Enzim ini mengkatalisis pembentukan malonyl-CoA dari acetyl-CoA, tahapan kunci dalam sintesis asam lemak, senyawa yang sangat dibutuhkan oleh sel tanaman (Ke *et al.*, 2000). Selain sebagai komponen penyusun triasilgliserol atau minyak, asam lemak juga digunakan dalam pembentukan membran dan kutikula (Kunst & Samuels, 2003), serta berperan dalam biosintesis *signaling molecules* (Shah, 2005) seperti *jasmonic acid* (Liechti & Farmer, 2002) dan sphingolipid (Sperling & Heinz, 2003; Worrall *et al.*, 2003). Keterlibatan asam lemak dan enzim-enzim yang mengkatalisis metabolismenya dalam pertahanan tanaman diulas secara lengkap oleh Kachroo & Kachroo (2009).

\*) Penulis korespondensi: asminib@yahoo.com

Biosintesis asam lemak pada tanaman terjadi di dalam plastid dan sitosol. Proses tersebut terjadi melalui penambahan secara berulang dua unit karbon yang diperoleh dari malonyl-CoA ke acetyl-CoA. Malonyl-CoA dibentuk dari acetyl-CoA dengan katalisator ACCase. Di dalam plastid, acetyl-CoA mengalami serangkaian reaksi menghasilkan asam lemak dengan panjang rantai karbon hingga 18 (Ohlrogge & Browse, 1995), sedangkan dalam sitosol, C-18 acyl-CoA mengalami pemanjangan rantai hingga 36 carbon (Leonard *et al.*, 2004). Dua jenis ACCase yang berbeda secara struktural telah diidentifikasi pada tanaman yaitu ACCase multifungsional atau ACCase homomerik (hm-ACCase) dan ACCase multisubunit atau ACCase heteromerik (ht-ACCase) (Li & Cronan, 1992). Kecuali pada famili *Graminae*, yang hanya mengandung hm-ACCase, kedua jenis ACCase tersebut pada tanaman terdapat pada kompartemen yang berbeda, ht-ACCase dalam plastid sedangkan hm-ACCase dalam sitosol (Nikolau *et al.*, 2003).

Pada sebagian besar tanaman, ACCase heteromerik (ht-ACCase) terdiri dari empat polipeptida/subunit yang dapat dipisahkan yaitu biotin carboxylase (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 (Ke *et al.*, 2000). Sebagai protein tunggal multifungsi, hm-ACCase mengandung domain yang sama dengan BC, BCCP dan CT yang tidak dapat terdisosiasi. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa reaksi yang dikatalisis oleh ACCase merupakan tahapan pembatas kecepatan dalam biosintesis asam lemak. Francki *et al.* (2002) melaporkan adanya korelasi antara aktivitas ACCase dengan kecepatan sintesis asam lemak maupun dengan akumulasi minyak.

Dalam bidang kesehatan ACCase merupakan target yang menarik untuk pengembangan obat terhadap obesitas, diabetes, kanker dan beberapa penyakit akibat infeksi mikroba (Tong & Harwood Jr, 2006; Wright & Reynolds, 2007; Parsons & Rock, 2011). Enzim ini juga diketahui berperan penting untuk mempertahankan daya hidup sel-sel kanker payudara (Chajes *et al.*, 2006). Zhang *et al.* (2004) melaporkan struktur kristal dari kompleks antara domain CT dengan CP-640186, salah satu inhibitor ACCase, dan mengidentifikasi tiga daerah pengikatan obat pada situs aktif dari CT. Struktur, kontrol aktivitas serta mekanisme inhibitor enzim ini diulas cukup lengkap oleh Tong (2005). Studi genetik menunjukkan bahwa ACCase terbukti sangat diperlukan untuk pertumbuhan *in vitro* berbagai bakteri (Gerdes *et al.*, 2003; Sassetti *et al.*, 2003; Jacobs *et al.*, 2003; Salama *et al.*, 2004; Payne *et al.*, 2007). Di sisi lain, ACCase dari rumput (*grasses*) adalah target dari

herbisida yang telah lama dikomersilkan (Tong & Harwood Jr, 2006).

Perbedaan pola ekspresi ACCase sitosol dan plastid pada berbagai bagian tanaman gandum muda yang sedang berkembang dilaporkan oleh Podkowinski *et al.* (2003). Dari penelitiannya diidentifikasi bahwa mRNA ACCase sitosol terdiri dari dua jenis, dan masing-masing menunjukkan pola ekspresi yang berbeda, sehingga diduga kedua mRNA tersebut dikontrol oleh promoter yang berbeda. Sasaki & Nagano (2004) mengulas secara ringkas ACCase dari tanaman, mulai struktur, biosintesis, regulasi hingga manipulasi gen untuk pemuliaan tanaman.

Mesokarp kelapa sawit telah dikonfirmasi mengandung kedua jenis ACCase, namun dalam akumulasi minyak pada jaringan mesokarp, peran ht-ACCase lebih besar dibandingkan dengan peran hm-ACCase. Di samping itu, juga dideteksi adanya dua isoform BCCP pada mesokarp kelapa sawit, masing-masing dengan BM 37 dan 32 kDa (Budiani, 2005). Aktivitas ACCase pada mesokarp kelapa sawit meningkat mulai dari buah berumur 14 minggu hingga umur 20 minggu setelah antesis. Analisis pola protein dengan elektroforesis menggunakan gel poli-akrilamid 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). Publikasi tersebut juga melaporkan bahwa fragmen gen penyandi BC berukuran sekitar 500 pb telah diklon. Penelitian ini bertujuan untuk mengklon cDNA lengkap penyandi ACCase heteromerik subunit BC dari mesokarp kelapa sawit, sebagai bagian dari upaya rekayasa metabolisme untuk meningkatkan rendemen minyak pada mesokarp buah kelapa sawit

## Bahan dan Metode

Bahan yang digunakan sebagai sumber RNA adalah mesokarp buah kelapa sawit Tenera yang aktif mensintesis minyak (18 – 20 minggu setelah antesis) dengan kandungan minyak lebih kurang 20% berat basah. Setelah buah dicuci dan dikupas kulit luarnya, jaringan mesokarp diambil dan segera didinginkan dalam nitrogen cair sebelum digunakan. Galur bakteri yang digunakan untuk kloning DNA adalah *E. Coli* DH5 $\alpha$  dan *E. coli* XL-1-Blue. Sedangkan vektor yang digunakan untuk kloning adalah pGEM-T dan pCR2.1-TOPO.

### Isolasi RNA total mesokarp

RNA total diisolasi dari jaringan mesokarp buah sawit dengan metode Chang *et al.* (1993) dengan

beberapa modifikasi. Mesokarp buah sawit dipotong-potong kecil dan segera dibekukan dengan nitrogen cair. Setelah beku, contoh dihaluskan dalam lumpang porselin sambil sekali-sekali ditambahkan nitrogen cair. Jaringan yang telah dihaluskan tersebut dihomogenkan dengan bufer ekstraksi (1 : 5 w/v) yang telah dihangatkan pada suhu 65°C, dan divorteks. Komposisi bufer ekstraksi terdiri dari CTAB 2%, Tris-Cl 100 mM pH 8, NaCl 3 M, EDTA 25 mM, PVP 2% (w/v), spermidin 0,5 g/L,  $\beta$ -mercapto etanol 2%, asam aurin trikarboksilat 1 mM dan DTT 10 mM. Setelah itu dilakukan dua kali ekstraksi menggunakan campuran kloroform : isoamil alkohol (24 : 1) dengan volume yang sebanding dan disentrifus pada 14.000 rpm selama 20 menit.

Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke dalam tabung sentrifus baru, ditambah  $\frac{1}{4}$  x volume LiCl 10 M dan disimpan semalam pada suhu 4°C. RNA dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 20 menit. Pelet dilarutkan dalam bufer SSTE (NaCl 1,0 M, SDS 0,5%, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 dan EDTA 1 mM) kemudian diekstrak kembali dengan kloroform:isoamil alkohol. Ke dalam supernatan ditambahkan dua kali volume etanol dan diendapkan selama 30 menit pada suhu -70°C, dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 20 menit untuk mengendapkan RNA. Supernatan dibuang dan endapan dibilas dengan etanol dingin 70%. Setelah sisa etanol diuapkan, endapan dilarutkan dalam 0,5 – 1,0 mL aquades steril dalam tabung mikro.

Integritas RNA hasil isolasi dianalisis dengan elektroforesis pada gel agarosa 1%. Visualisasi RNA dilakukan dengan alat transiluminator UV. Kandungan dan kemurnian RNA dianalisis secara spektrofotometri pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 260 nm, 280 nm dan 230 nm. Kuantitas RNA dihitung berdasarkan serapannya pada  $\lambda$  260 nm, sedangkan kemurnian RNA dari protein ditunjukkan oleh nisbah  $A_{260}/A_{280}$ , dan kemurnian RNA dari polisakarida ditunjukkan oleh nisbah  $A_{260}/A_{230}$ .

#### Perancangan primer

Untuk mengamplifikasi daerah ujung 5' dan 3' gen penyandi BC, dirancang primer spesifik berdasarkan sekuen fragmen DNA gen penyandi daerah konservatif BC berukuran 469 pb terklon sebagaimana dilaporkan sebelumnya (Budiani *et al.*, 2008). Perancangan primer dilakukan menggunakan program Primer3 yang dapat diakses secara online (<http://www.biotechtools.umassmed.edu/>).

#### Amplifikasi dan kloning cDNA daerah ujung 5'- and 3'- BC

Amplifikasi daerah ujung 5' dan 3' gen penyandi BC dilakukan dengan teknik *Rapid Amplification of cDNA Ends - Polymerase Chain Reaction (RACE-PCR)* menggunakan kit *BD SMART™ RACE cDNA Amplification* (BD Biosciences Clontech). Sintesis cDNA utas pertama daerah ujung 5' dan 3' (*5'-RACE-READY cDNA* dan *3'-RACE-READY cDNA*) dilakukan dengan prosedur sebagaimana disarankan dalam *User Manual* yang tersedia dalam kit. Selanjutnya cDNA daerah ujung 5' dan 3'- BC diamplifikasi dengan primer spesifik (Tabel 1) menggunakan templat utas pertama cDNA daerah ujung 5'- dan 3'- BC yang telah disintesis. Reaksi amplifikasi dijalankan dengan program *touchdown PCR* sebagai berikut: lima siklus masing-masing 94°C 30 detik, 72°C 3 menit; lima siklus masing-masing 94 °C 30 detik, 70°C 30 detik dan 72 °C 3 menit; dilanjutkan 30 siklus masing-masing 94°C 30 detik, 68°C 30 detik dan 72°C 3 menit. Hasil amplifikasi diverifikasi pada gel agarosa 1,2%.

Fragmen cDNA daerah ujung 5'- dan 3'-BC dimurnikan dari gel menggunakan kit *QIAquick Gel Extraction* dan diklon dalam *E. coli* DH5 $\alpha$  menggunakan vektor pCR 2.1-TOPO. *E. coli* rekombinan diseleksi pada media LB padat yang mengandung 40 mg/L X-Gal dan 50 mg/L kanamisin. Adanya insert cDNA dalam koloni putih diverifikasi dengan PCR koloni menggunakan pasangan primer NUPM/ RC-BCR untuk koloni yang diprediksi mengandung produk 5'- BC, dan menggunakan pasangan primer NUPM/RC-BCF untuk koloni yang diprediksi mengandung produk 3'- BC. Susunan nukleotida primer yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 1.

Koloni yang dalam analisis PCR teruji positif mengandung sisipan DNA target diisolasi kembali plasmidnya. Plasmid yang diperoleh didigesti menggunakan enzim restriksi *EcoRI* dan dicek ukurannya pada gel agarosa. Untuk konfirmasi bahwa DNA terklon adalah ujung 5' dan 3' dari gen penyandi BC, dilakukan sekuensing DNA. Sekuen DNA yang diperoleh dianalisis homologinya dengan gen yang sama dari tanaman lain dengan BlastN. Sekuen DNA dari fragmen daerah ujung 5'- dan 3'- BC dianalisis peta situs restriksinya menggunakan program BioEdit, untuk mengidentifikasi enzim restriksi yang hanya memotong satu kali dan situs pemotongannya terletak pada daerah yang *overlap* antara kedua fragmen DNA tersebut. Informasi mengenai situs restriksi tersebut diperlukan dalam menentukan langkah berikutnya untuk mendapatkan cDNA lengkap penyandi BC.

Tabel 1. Primer yang digunakan dalam tahap-tahap penelitian untuk mengklon cDNA lengkap penyandi ACCase subunit BC.  
Table 1. Primers used for the research steps to clone full cDNA encoding ACCase subunit BC.

No.	Primer	Sekuen DNA (DNA Sequence)
1	UPM	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' dan 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
2	NUPM	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
3	RC-BCF	5 - TTGAAGCACCTTCTCCTGCCTTGACG-3'
4	RC-BCR	5'-TGTCAGCCTCTCTCCAAGAGCAACTCG-3'
5	NBCF	5'-CTGAGCTACGGAAAGCTATGGGTGATGC-3'
6	NBCR	5'-CAGGGTGCTCTACCTGAATCCTGGTGT-3'
7	3BCSeqF	5'-AAAAAGCGATTGAACGGATG-3'
8	3BCSeqR	5'-TCCTTCTCATGCTTCGGTATG-3'
9	5BCSeqF	5'-GAGCATGGAATCAACTTTATTGG-3'
10	5BCSeqR	5'-ATTTATCACCCATGACTCGAATG-3'
11	FLBC-F	5'-AGTACGCGGGGATCTCTTCT-3'
12	FLBC-R	5'-CCCAAATTGTTTCCAAGCAG-3'

### Konstruksi dan kloning cDNA lengkap penyandi BC

Untuk mengkonstruksi cDNA lengkap penyandi BC, plasmid rekombinan yang mengandung cDNA 5'-BC (pCR2.1-TOPO/5'-BC) dan yang mengandung 3'-BC (pCR2.1-TOPO/3'-BC) diisolasi kembali dari koloni rekombinan hasil transformasi produk 5'-RACE dan 3'-RACE yang telah terbukti mengandung cDNA 5'-BC dan 3'-BC. Isolasi dilakukan dengan *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche Diagnostic GmbH). Plasmid hasil isolasi dicek ukurannya dengan elektroforesis pada gel agarosa.

Fragmen cDNA 5'-BC kemudian diisolasi dari plasmid rekombinan pCR2.1-TOPO/5'-BC dengan dua cara yaitu, (1) digesti plasmid rekombinan dengan *EcoRI*, dan (2) PCR menggunakan primer NUPM (BD Bioscience) dan RC-BCR. Isolasi fragmen cDNA 3'-BC dari pCR-TOPO/3'-BC tidak dapat dilakukan dengan cara digesti pCR2.1-TOPO/3'-BC menggunakan *EcoRI* karena fragmen 3'-BC memiliki situs pemotongan *EcoRI*. Oleh karena itu isolasi 3'-BC dari pCR-TOPO/3'-BC hanya dilakukan dengan PCR menggunakan pasangan primer NUPM dan NBC-F dengan templat plasmid rekombinan pCR2.1-TOPO/3'-BC.

Untuk mendapatkan cDNA lengkap penyandi BC, fragmen cDNA daerah ujung 5'- dan 3'-BC hasil PCR didigesti dengan *KpnI*, kemudian kedua fragmen hasil digesti langsung diligasikan dengan vektor kloning pGEM-T. Hasil ligasi kemudian diklon ke dalam *E. coli*. Proses digesti dan ligasi DNA dengan vektor kloning pGEM-T, preparasi *E. coli* kompeten dan transformasinya dengan plasmid rekombinan dilakukan sesuai prosedur standar (Sambrook et al., 1989). Seleksi hasil transformasi dilakukan pada media agar LB padat yang mengandung ampisilin 100 mg/L.

Analisis koloni transforman yang mengandung DNA target dilakukan dengan PCR dari koloni putih yang tumbuh menggunakan primer FLBC-F dan

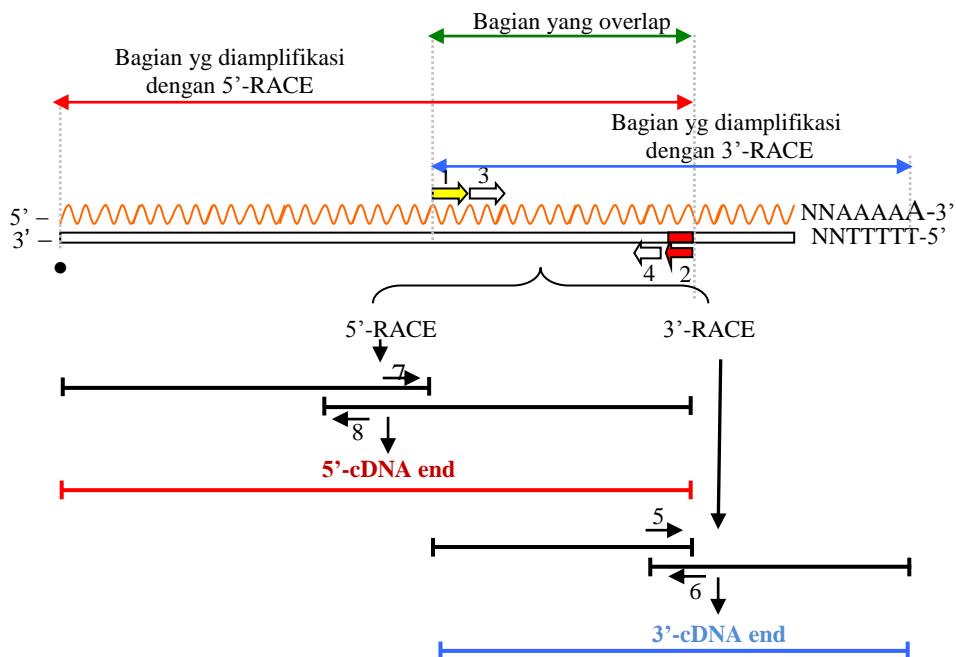
FLBC-R. Plasmid rekombinan diisolasi kembali dengan *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche Diagnostic GmbH) kemudian dicek ukurannya dengan elektroforesis pada gel agarosa dan diseku. Sekuensing dilakukan di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman menggunakan pasangan primer M13F/M13R dan pasangan primer FLBC-F/FLBC-R. Sekuen DNA yang diperoleh dianalisis menggunakan BlastN atau BlastX (<http://www.uk.ncbi.nlm.nih.gov>) untuk mengkonfirmasi homologinya dengan gen penyandi BC yang tersedia di *GenBank*. Tabel 1 menyajikan susunan nukleotida primer yang digunakan mulai dari amplifikasi cDNA daerah ujung 5'-BC dan 3'-BC hingga amplifikasi cDNA lengkap penyandi BC, sedangkan Gambar 1 menunjukkan posisi setiap primer terhadap cDNA target.

### Hasil dan Pembahasan

#### Amplifikasi dan kloning cDNA daerah ujung 5'- dan 3'- BC

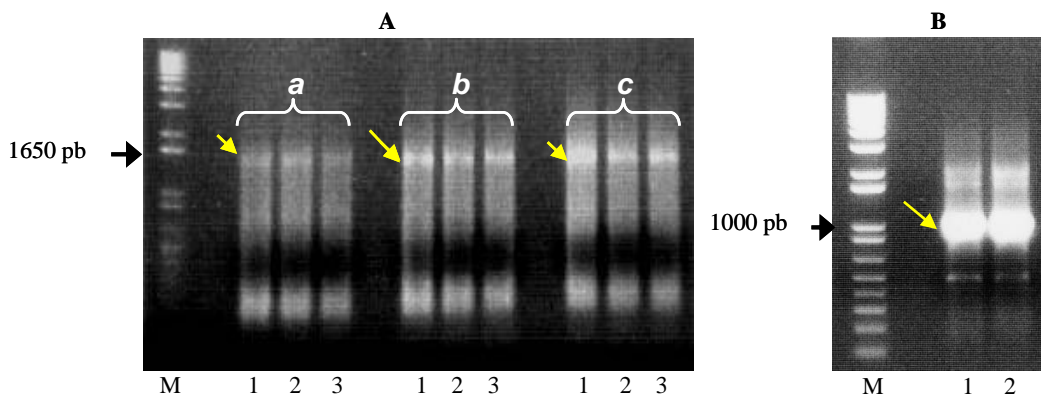
Hasil amplifikasi daerah ujung 5'-BC menggunakan pasangan primer *Universal Primer Mix* (UPM) yang tersedia dalam kit dengan primer spesifik RC-BCR disajikan pada Gambar 2A. Nampak bahwa berbagai variasi suhu *annealing* (67, 68 dan 69 °C) dan konsentrasi MgCl<sub>2</sub> (1, 1,25 dan 1,5 mM) yang dicoba pada reaksi PCR tidak mampu meningkatkan spesifisitas hasil amplifikasi, terbukti dengan adanya latar belakang berupa *smear* pada produk PCR. Meskipun demikian hasil amplifikasi berupa fragmen DNA berukuran sekitar 1500 pb sangat konsisten. Oleh karena itu fragmen hasil amplifikasi tersebut dipotong dan dimurnikan dari gel kemudian diklon ke dalam sel *E.coli* menggunakan vektor pCR2.1-TOPO.

Fragmen cDNA daerah ujung 3'-BC diperoleh melalui dua tahap amplifikasi yaitu pertama meng-



Gambar 1. Posisi primer spesifik terhadap cDNA target yang digunakan untuk isolasi 5'- dan 3'- BC dengan RACE-PCR. (1) RC-BCF, (2) RC-BCR, (3) NBCF, (4) NBCR, (5) 3BCSeqF, (6) 3BCSeqR, (7) 5BCSeqF dan (8) 5BCSeqR.

Figure 1. Position of the specific primers on target cDNA used for isolation of 5'- and 3'- BC using RACE-PCR. (1) RC-BCF, (2) RC-BCR, (3) NBCF, (4) NBCR, (5) 3BCSeqF, (6) 3BCSeqR, (7) 5BCSeqF dan (8) 5BCSeqR.



Gambar 2. (A) Hasil RACE untuk 5'-BC menggunakan primer UPM dan RC-BCR pada suhu annealing 57, 58 dan 59°C (lajur 1,2 dan 3) dengan konsentrasi  $MgCl_2$  1,5 mM, 2 mM dan 3 mM (a, b dan c); (B) Hasil RACE untuk 3'-BC menggunakan primer NUPM dan NBCF pada suhu annealing 68 °C. Tanda panah menunjukkan produk amplifikasi gen target. M: marker 1 Kb plus DNA ladder.

Figure 2. (A) RACE product for 5'-BC using UPM and RC-BCR primers at 57, 58 dan 59°C (lanes 1, 2 and 3) annealing temperatur with  $MgCl_2$  1,5 mM, 2 mM dan 3 mM (a, b and c); (B) RACE product for 3'-BC using NUPM and NBCF primers at 68°C annealing temperature. White arrows indicated amplification product of the targeted DNA. M: 1 Kb plus DNA ladder.

gunakan pasangan primer UPM dengan RC-BCF dilanjutkan dengan reamplifikasi menggunakan pasangan primer NUPM dan NBCF. Pendekatan ini ditempuh sebagai upaya untuk mendapatkan hasil amplifikasi yang spesifik. Dari Gambar 2B terlihat bahwa reamplifikasi pada suhu annealing 68°C dengan

konsentrasi  $MgCl_2$  1,5 mM menghasilkan fragmen DNA yang intensitasnya sangat tinggi dengan ukuran sekitar 1000 pb. Meskipun tidak dihasilkan fragmen DNA tunggal, namun hasil ini masih lebih baik dibandingkan dengan produk amplifikasi 5'-BC. DNA produk amplifikasi yang berukuran kurang lebih 1000

pb inilah yang dipilih untuk dimurnikan dari gel dan diklon dalam *E. coli*.

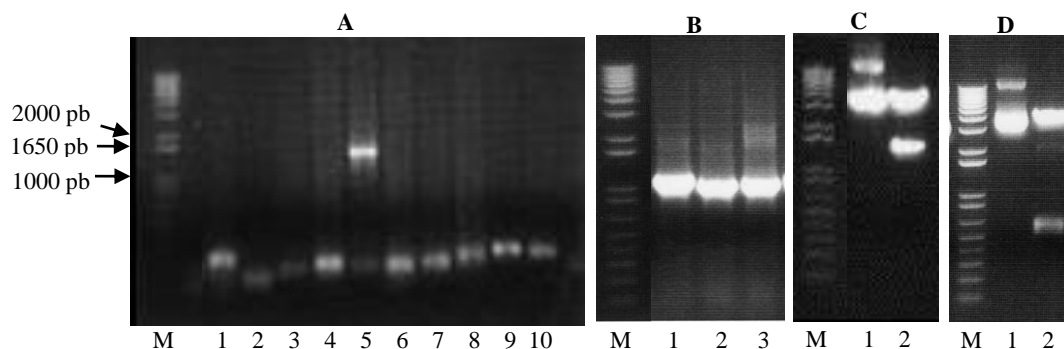
Hasil PCR koloni menunjukkan bahwa kedua fragmen DNA produk RACE tersebut telah terklon dalam *E. coli* (Gambar 3A dan 3B). Isolasi plasmid rekombinan dan digestinya dengan *EcoRI* menunjukkan bahwa produk terklon mempunyai ukuran yang sesuai dengan fragmen DNA 5'-BC (Gambar 3C). Sedangkan elektroforesis plasmid rekombinan dan digestinya menggunakan *EcoRI* dari koloni hasil transformasi menggunakan produk 3'RACE menghasilkan fragmen DNA yang berukuran lebih rendah (Gambar 3D) dibandingkan dengan hasil PCR koloni (Gambar 3B). Dari analisis situs restriksi ternyata hal tersebut disebabkan karena dalam fragmen DNA 3'-BC terdapat satu situs enzim restriksi *EcoRI*, sehingga digesti plasmid rekombinan dengan *EcoRI* akan menghasilkan dua fragmen DNA masing-masing dengan ukuran lebih pendek dari 1000 pb, yaitu sekitar 500-600 pb. Adanya satu fragmen DNA berukuran sekitar 500-600 pb dari hasil digesti plasmid rekombinan pada percobaan ini diduga karena kedua fragmen berukuran hampir sama.

Analisis sekuen DNA menunjukkan bahwa fragmen DNA 5'-BC terklon berukuran 1367 pb, sedangkan fragmen 3'-BC terklon berukuran 1032 pb dan mempunyai homologi yang tinggi dengan ht-ACCase subunit BC dari *Nicotiana tabacum*, *Glycine max*, *Brassica napus* dan *Arabidopsis thaliana* (data tidak ditampilkan). Konfirmasi urutan nukleotida dari 5'-BC ini juga dilakukan dengan jalan sekuensing kembali menggunakan pasangan primer 5BCSeqF dan

5BCSeqR, dan urutan nukleotida 3'-BC dilakukan dengan sekuensing menggunakan pasangan primer 3BCSeqF dan 3BCSeqR, sehingga kesalahan membaca oleh *DNA Sequencer* dapat dihindari. Posisi kedua pasang primer terhadap gen BC, 5'-BC dan 3'-BC dapat dilihat pada Gambar 1, sedangkan urutan nukleotidanya disajikan pada Tabel 1.

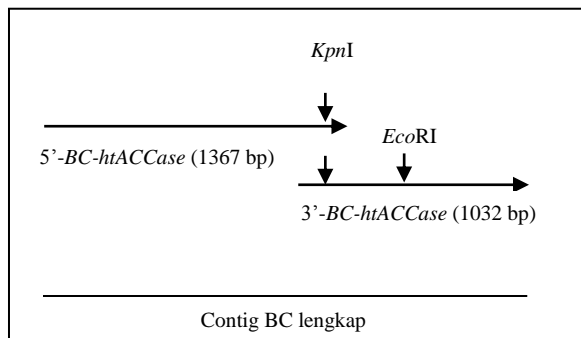
#### Konstruksi dan kloning cDNA lengkap penyandi BC

Hasil analisis situs restriksi fragmen 5'-BC dan 3'-BC menunjukkan bahwa enzim *KpnI* hanya memotong sekali dan situs pemotongannya terdapat pada daerah yang overlap antar kedua fragmen DNA, yaitu pada nukleotida ke-1265. Di samping itu informasi penting lain dari hasil analisis situs restriksi adalah adanya situs restriksi *EcoRI* pada nukleotida ke-1659 yang berarti terletak pada daerah ujung 3'. Oleh karena itu isolasi kembali fragmen DNA daerah ujung 3'-BC dari plasmid rekombinan tidak dapat dilakukan dengan digesti menggunakan *EcoRI*. Dalam hal ini isolasi kedua fragmen gen BC tersebut dilakukan dengan PCR. Selanjutnya agar dapat disambung dan menghasilkan gen lengkapnya, kedua fragmen DNA didigesti dengan *KpnI*, enzim restriksi yang hanya memotong satu kali pada daerah yang *overlap* (Gambar 4). Hasil isolasi kembali plasmid rekombinan pembawa fragmen 5'-BC (pCR2.1-TOPO/5'-BC) dan plasmid rekombinan yang mengandung fragmen 3'-BC (pCR2.1-TOPO/3'-BC) serta hasil digestinya dengan *KpnI* disajikan pada Gambar 5.



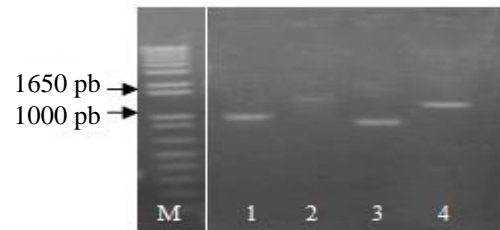
Gambar 3. (A) PCR koloni hasil transformasi 5'-BC; (B) PCR koloni hasil transformasi 3'-BC; (C) Hasil isolasi plasmid rekombinan pGEM/5BC dari koloni no 5 (lajur 1=tidak didigesti; lajur 2= didigesti dengan *EcoRI*); (D) Hasil isolasi plasmid rekombinan pGEM/3BC dari koloni no 1 (lajur 1 = tidak didigesti; lajur 2 = didigesti dengan *EcoRI*). M: Marker 1 Kb plus DNA ladder.

Figure 3. (A) Colony PCR of transformation product using 5'-BC; (B) Colony PCR of transformation product using 3'-BC; (C) Recombinant plasmid of pGEM/5BC isolated from colony no 5 (lane 1 = undigested; lane 2= digested using *EcoRI*); (D) Recombinant plasmid of pGEM/3BC isolated from positive colony no 1 (lane 1 = undigested; lane 2 = digested using *EcoRI*). M: 1 Kb plus DNA ladder marker.



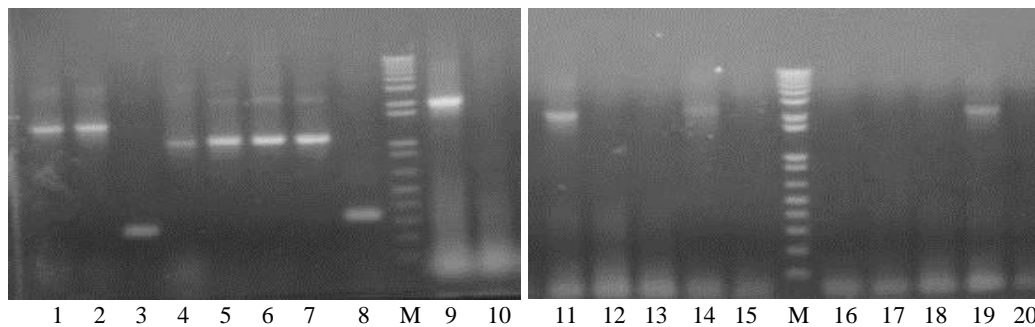
Gambar 4. Gambaran posisi situs restriksi *KpnI* dan *EcoRI* pada 5'- dan 3'- BC.

Figure 4. Position of restriction sites of *KpnI* and *EcoRI* on 5'- and 3'-BC.



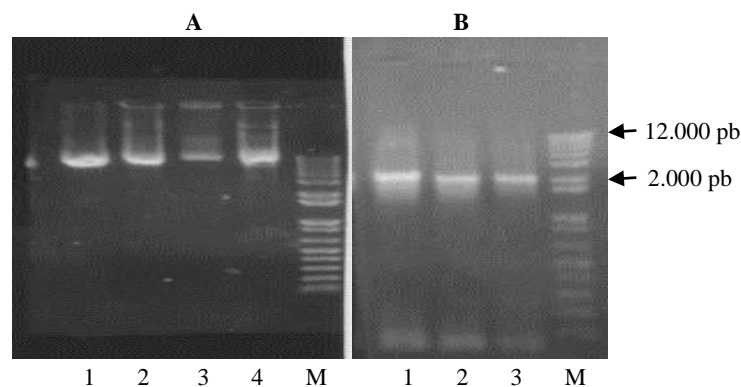
Gambar 5. Fragmen 3'-BC (1) dan fragmen 5'-BC (2) hasil isolasi dengan PCR dengan templat plasmid rekombinan; Hasil digesti fragmen 3'-BC (3) dan fragmen 5'-BC (4) dengan enzim restriksi *KpnI*. M : marker 1 Kb plus DNA ladder.

Figure 5. 3'-BC (1) and 5'-BC(2) isolated using PCR using DNA template of recombinant plasmid; Digestion product of 3'-BC (3) and 5'BC (4) using restriction enzyme of *KpnI*. M : 1 Kb plus DNA ladder marker.



Gambar 6. Profil elektroforesis hasil PCR dari koloni produk transformasi menggunakan pGEM-T/FLBC. Lajur 1-8 adalah hasil PCR dengan primer M13; lajur 9-20 adalah hasil PCR dengan primer FLBC-F/R; M adalah marker 1 Kb plus DNA Ladder.

Figure 6. Electrophoretic profile of PCR product of colonies produced from transformation using pGEM-T/FLBC. Lanes 1-8 are PCR products using M13 primer ; lanes 9-20 are PCR products using FLBC-F/R; M: 1 Kb plus DNA Ladder marker.



Gambar 7. Profil elektroforesis (A) plasmid rekombinan hasil isolasi kembali dari koloni no. 9 (lajur 1), koloni no. 21 (lajur 2), koloni no. 24 (lajur 3), dan koloni no. 29 (lajur 4) ; (B) Produk PCR menggunakan pasangan primer FLBC-F/R dari koloni no. 9 (lajur 1), koloni no. 21 (lajur 2), dan koloni no. 29 (lajur 3). M : Marker 1 Kb plus DNA ladder.

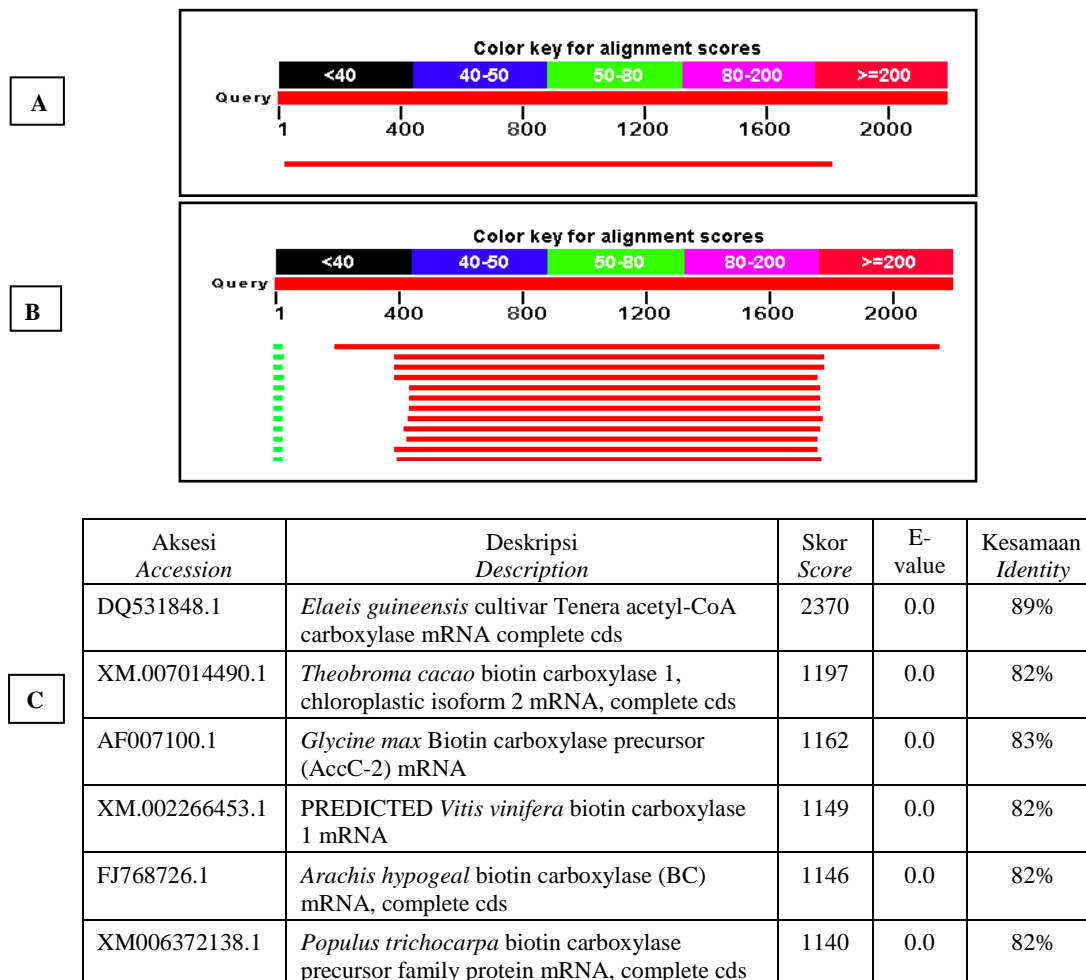
Figure 7. Electrophoretic profile of (A) recombinant plasmid isolated from colony no. 9 (lane 1), colony no. 21 (lane 2), colony no. 24 (lane 3), and colony no. 29 (lane 4) ; (B) PCR product using primer pair FLBC-F/R from colonies no. 9 (lane 1), colony no. 21 (lane 2), and colony no.29 (lane 3). M : 1 Kb plus DNA ladder marker.

Ligasi fragmen 5'-BC dan 3'-BC BC yang telah didigesti dengan *KpnI* secara bersama-sama pada vektor pGEM-T dan transformasinya ke dalam *E.coli* menghasilkan koloni yang tumbuh pada media seleksi. Elektroforesis hasil PCR terhadap beberapa koloni tersebut disajikan pada Gambar 6. Nampak bahwa hanya empat koloni yang memberikan hasil PCR dengan ukuran sebagaimana diharapkan sekitar 2 kb, yaitu koloni no. 9, 11, 14, dan 19. Keempat koloni tersebut kemudian diisolasi plasmidnya untuk diseku. Hasil isolasi plasmid rekombinan untuk keempat koloni tersebut dan hasil analisis PCR untuk memastikan ukurannya menggunakan primer FLBC-F/R disajikan pada Gambar 7A dan 7B. Nampak bahwa keempat koloni memiliki ukuran plasmid rekombinan yang sama. Ukuran fragmen yang diperoleh dari analisis PCR (sekitar 2 kb) sesuai dengan panjang cDNA lengkap penyandi BC. Meskipun demikian untuk mengkonfirmasi bahwa fragmen tersebut merupakan cDNA lengkap penyandi

BC, diperlukan analisis lebih lanjut, yaitu sekuensing DNA dan analisis sekuennya yang harus dilakukan secara bertahap mengingat ukurannya yang besar.

*Analisis sekuen DNA terklon*

Urutan nukleotida lengkap dari cDNA penyandi BC terklon (2182 bp) diperoleh dengan menggabungkan sekuen nukleotida hasil sekuensing secara bertahap. Analisis Blast *align two sequences* (BL2seq) dari sekuen DNA tersebut dengan sekuen gen yang sama dari kelapa sawit yang dilaporkan oleh Omar et al. (2008) menunjukkan tingkat kesamaan (*identity*) yang sangat tinggi yaitu 99% (Gambar 8A). Analisis tersebut dilakukan karena hasil analisis Blastn tidak mengakomodir sekuen DNA yang dilaporkan Omar et al. (2008) (Gambar 8B dan 8C). Dari Gambar 8B dan 8C nampak bahwa sekuan DNA terklon menunjukkan 89% *identity* dengan gen BC dari kelapa sawit Tenera Afrika (*African oil palm tenera*) sebagaimana yang



Gambar 8. (A). Hasil analisis Blast Align two sequences (bl2seq) antara sekuen BC terklon dengan sekuen BC referen yang dilaporkan oleh Omar et al. (2008); (B) Hasil analisis BlastN sekuen BC terklon; (C) Enam aksesii yang memiliki skor, E-value dan persen kesamaan tertinggi.

Figure 8. (A). Result of Blast Align two sequences (bl2seq) between the cloned BC DNA sequence and DNA sequence of BC as reported by Omar et al. (2008); (B). Result of BlastN analysis of the cloned BC DNA sequence; (C) Six accession which showed the highest score, E-value and identity percentage.





Gambar 9. Hasil penjarangan sekuen DNA BC terklon (O full BC/baris bawah) dengan sekuen BC yang dihasilkan oleh Omar *et al.* (2008) (E.g. Ref/baris atas). A : hijau; T : merah; G : hitam; C : biru.

Figure 9. Alignment of the cloned BC sequences (O full BC/bottom row) and BC sequences as reported by Omar *et al.* (2008) (E.g. Ref/top row). A : green; T : red; G : black; C : blue.

didepositkan di *GenBank* dengan no akses (accession no) DG531848.1. Hasil ini sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan tingkat kesamaannya (% identity) dengan gen BC dari tanaman lain seperti *Theobroma cacao* (82%) dan *Glycine max* (83%) (Gambar 8C).

Hasil penjarangan sekuen BC terklon dengan sekuen BC referen yang dilaporkan oleh Omar *et al.* (2008) menggunakan ClustalW program BioEdit dapat dilihat pada Gambar 9. Nampak bahwa *start codon*

(asam amino metionin/M) terletak pada nukleotida ke 224-226 dari sekuen BC terklon yang sejajar dengan basa ke 297-299 dari sekuen BC referensi (Omar *et al.*, 2008). Perbedaan nukleotida dari *start codon* hingga nukleotida ke 1800 antara lain adalah substitusi A pada nukleotida ke 418 dari sekuen referen oleh T pada nukleotida ke 343 dari sekuen BC terklon (C,418/T,343); (C, 436/G,361); (G, 448/ A, 373); (T, 793/A, 720); (C, 829/ T, 756); (C,851/ A, 778); dan

(A,862/ G,786). Di samping itu juga dideteksi adanya insersi atau penyisipan satu nukleotida pada posisi setelah nukleotida ke 751 dari sekuen BC terklon yang sejajar dengan nukleotida ke 789 dari sekuen BC referen. Perbedaan sekuen yang cukup tinggi dideteksi setelah nukleotida ke 1800 dari BC terklon. Keseluruhan perbedaan tersebut menarik untuk dikaji lebih jauh, apakah berkaitan dengan perbedaan karakter yang dimiliki, seperti rendemen minyak, komposisi asam lemak dan lain sebagainya.

Kloning gen ACCase dari berbagai tanaman telah banyak dilaporkan. Pada tanaman kelapa sawit, kloning gen penyandi ACCase subunit beta (*accD*) dilaporkan oleh Nugkaew (2005) dan Nakkaew *et al.* (2008), sedangkan kloning gen ACCase subunit biotin karboksilase disampaikan oleh Nakkaew *et al.* (2008) dan Omar *et al.* (2008). Pendekatan awal yang dilakukan oleh Omar *et al.* (2008) dalam mengisolasi gen BC sama dengan yang dilakukan pada penelitian ini, yaitu RACE PCR untuk amplifikasi fragmen 5'-cDNA dan 3'-cDNA. Namun cara dalam mendapatkan cDNA lengkapnya berbeda, yaitu menggunakan teknik *end to end* PCR. Upaya mengisolasi dan mengklon gen ACCase merupakan tahapan penting yang diperlukan untuk berbagai tujuan seperti rekayasa metabolisme. Peran kunci gen tersebut dalam biosintesis asam lemak dan akumulasi kandungan minyak, memberikan peluang dilakukannya rekayasa genetika untuk meningkatkan rendemen minyak melalui mekanisme *up regulation* untuk mengover-ekspresikan gen tersebut. Di sisi lain, Omar *et al.* (2008) menggunakan gen ACCase terklon untuk memproduksi bioplastik (PHB dan PHBV). Melalui mekanisme *down regulation*, aktivitas biosintesis asam lemak ditekan dan asetil CoA diarahkan untuk produksi PHB dan PHBV.

### Kesimpulan

cDNA lengkap penyandi ACCase subunit biotin carboxylase telah diperoleh dan diklon pada *E. coli*. Dengan pendekatan yang sama, gen-gen penyandi subunit lainnya dari ACCase juga dapat diklon, sehingga aplikasinya untuk peningkatan rendemen minyak dapat lebih optimal. Melalui rekayasa genetika, cDNA penyandi ACCase subunit BC yang berhasil diklon dalam penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan untuk perbaikan sifat tanaman, terutama peningkatan rendemen minyak atau lemak, baik pada tanaman kelapa sawit, maupun pada tanaman lain seperti kakao, jarak pagar dan jagung.

### Daftar Pustaka

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.). 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 Agricul* 1(1), 44-50.

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.

Chang S, J Puryear & J Cairney (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep* 11, 98-100.

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.). *Functional & Integrative Genomics* 26, 292-300.

Gerdes SY, MD Scholle, JW Campbell, G Balazsi, E Ravasz, MD Daugherty, AL Somera, NC Kyrpides, I Anderson, MS Gelfand, A Bhattacharya, V Kapatral, M D'Souza, MV Baev, Y Grechkin, F Msee, MY Fonstein, R Overbeek, AL Barabasi, ZN Oltvai & AL Osterman (2003). Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. *J Bacteriol* 185, 5673-5684.

Jacobs MA, A Alwood, I Thaipisuttikul, D Spencer, E Haugen, S Ernst, O Will, R Kaul, C Raymond, R Levy, L Chun-Rong, D Guenther, D Bovee, MV Olson & C Manoil (2003). Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 14339-14344.

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.

Leonard, A.E., S.L. Pereira, H. Sprecher & Y.S. Huang (2004). Elongation of long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* 43: 36 - 54.

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.

Liechti R & EE Farmer (2002). The jasmonate pathway. *Sci* 296, 1649-1650.

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 of Biochem & 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](http://agris.fao.org/records/th2005002332). [2005]
- Ohlrogge J & J Browse (1995). Lipid biosynthesis. *Plant Cell* 7, 957-970.
- Omar WSW, LB Willis, Chokyun RHA, 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- MIT Biotechnology Partnership Programme Vol 2 Oil Palm Metabolic Engineering* p. 97 – 107.
- 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.
- Podkowinski J, J Jelenska, A Sirikhachornkit, E Zuther, R Haselkorn & P Gornicki (2003). Expression of cytosolic and plastid acetyl-CoA carboxylase genes in young wheat plants. *Plant Physiol* 131, 763-772.
- Salama NR, B Shepherd & S Falkow (2004). Global transposon mutagenesis and essential gene analysis of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 186, 7926–7935.
- Sambrook J, EF Fritsch & T Maniatis (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Book 1 and 2, 2<sup>nd</sup> ed.. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sasaki Y & Y Nagano (2004). Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. *Biosci Biotechnol Biochem* 68, 1175-1184.
- Sasseti CM, DH Boyd & EJ Rubin (2003) Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol* 48, 77–84.
- Shah J (2005). Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant diseases resistance. *Ann Rev Phytopathol* 43, 229-260.
- Sperling P & E Heinz (2003). Plant spingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim Biophys Acta* 1632, 1-15.
- 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 Cell Biochem* 99, 1476–1488.
- Worrall D, CK Ng & AM Hetherington (2003). Spingolipids, new plyers in plant signaling. *Trends Plant Sci* 8, 317-320.
- 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.