

Analisis sekuen DNA daerah 5'-EGAD1 dari buah kelapa sawit normal dan abnormal hasil kultur jaringan

Analysis of DNA sequences of the 5'-flanking EGAD1 from normal and abnormal fruit from tissue culture derived oil palm

Asmini BUDIANI¹⁾ & FEBRIMARSA²⁾

¹⁾ Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Jl. Taman Kencana No. 1, Bogor 16151, Indonesia

²⁾ Departemen Biokimia, Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor, Indonesia

Terima tgl 2 Pebruari 2010/Disetujui 3 Mei 2010

Abstract

Clonal propagation of oil palm through in vitro culture is a potential approach to fulfill the demand of oil palm elite planting materials. However, the incidence of floral abnormality known as "Mantled" from oil palm derived from in vitro culture which was around 5%-80%, hampered the commercialization of this clonal oil palm planting materials. EGAD1, a defensin gene detected in oil palm, was reported to be expressed in significantly higher in callus cultures initiated from mantled palms compared with those obtained from normally flowering individuals. As a part of research work to develop a molecular marker for early detection of abnormality in oil palm derived tissue culture, this research was aimed to isolate and analyze the sequences of the 5' flanking region of EGAD1 gene of the normal and mantled oil palm. The research was initiated by expression analysis of EGAD1 at the flower and fruit of normal and mantled phenotypes, followed by isolation of the 5' flanking region of the gene by genomic PCR. The sequences of PCR product were then aligned by ClustalW from BioEdit. The results showed that mantled phenotype of flower and fruit accumulated mRNA EGAD1 higher than that of normal phenotype. Differences between the two DNA sequences were detected at the bases of 141, 188 dan 198, which implied on the differences of the restriction map. These differences give a possibility to develop a molecular marker for detection of the abnormality on oil palm derived from tissue culture, based on the RFLP technique.

[Keywords: 5'-flanking EGAD1, mantled fruit, RT-PCR, molecular marker, *Elaeis guineensis*]

Abstrak

Perbanyakan kelapa sawit melalui kultur jaringan merupakan salah satu pendekatan yang sangat potensial untuk memenuhi permintaan bibit unggul kelapa sawit. Namun terjadinya abnormalitas pembungaan yang dikenal sebagai bunga *mantled* pada tanaman kelapa sawit hasil kultur jaringan, menjadi hambatan komersialisasi bibit tersebut. Gen *EGAD1*, yaitu gen defensin yang diidentifikasi merupakan salah satu gen pada kelapa sawit yang ekspresinya dilaporkan jauh lebih tinggi pada kalus yang diinduksi

dari tanaman kelapa sawit abnormal dibandingkan dengan pada kalus asal kelapa sawit normal. Sebagai bagian dari usaha pengembangan pelacak molekuler untuk deteksi dini abnormalitas kelapa sawit hasil kultur jaringan, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menganalisis perbedaan sekuen DNA daerah 5' flanking gen *EGAD1* dari buah normal dan buah *mantled*. Penelitian dimulai dengan analisis ekspresi *EGAD1* pada jaringan bunga dan buah normal dan *mantled* dengan RT-PCR, dilanjutkan dengan isolasi daerah 5' flanking *EGAD1* dengan PCR genomik. Sekuen produk PCR kemudian disejajarkan melalui ClustalW BioEdit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bunga dan buah *mantled* mengakumulasi mRNA *EGAD1* lebih tinggi dibandingkan dengan bunga dan buah normal. Terdapat perbedaan sekuen DNA pada daerah 5' flanking dari gen tersebut antara buah normal dengan buah mantel, yaitu pada basa ke-141, 188 dan 198, yang berimplikasi pada perbedaan peta restriksi kedua sekuen. Hal ini memberi peluang untuk pengembangan suatu pelacak deteksi abnormalitas pada tanaman kelapa sawit hasil kultur jaringan, yang berbasis pada teknik RFLP.

[Kata kunci: 5'-flanking *EGAD1*, buah mantel, RT-PCR, *Elaeis guineensis*, penanda molekuler]

Pendahuluan

Meskipun secara genetis potensi produksi kelapa sawit dapat mencapai 18 ton CPO/ha/th (Asmono, 2006), dan saat ini bahan tanaman kelapa sawit dengan potensi produksi mendekati dua digit telah dihasilkan oleh produsen benih dalam negeri, namun produksi CPO Indonesia rata-rata kurang dari 4 ton/ha. Lebarinya gap antara produktivitas aktual dengan potensinya disebabkan oleh berbagai faktor, salah satunya adalah penggunaan benih palsu. Laporan Jacquemard *et al.* (2006) menunjukkan bahwa kebun yang ditanami benih palsu hanya menghasilkan tandan buah segar (TBS) 3,9 ton/ha/th, jauh lebih rendah dibandingkan dengan kebun yang ditanami bibit DxP Socfindo yaitu sebesar 20,5 ton/ha/th. Luasnya penyebaran benih palsu antara lain disebabkan tidak terpenuhinya kebutuhan nasional akan bahan tanaman kelapa sawit Tenera hasil persilangan konvensional Dura dengan Pesifera.

Kultur jaringan merupakan salah satu alternatif yang sangat potensial untuk memecahkan masalah tersebut. Selain untuk memenuhi kekurangan pasokan bibit, keunggulan klonal dari bibit yang dihasilkan berimplikasi meningkatkan produksi. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tanaman kelapa sawit asal kultur jaringan dapat menghasilkan TBS jauh lebih tinggi dibandingkan tanaman asal biji (Soh *et al.*, 2001; Latief *et al.*, 2003). Namun, terjadinya abnormalitas pembungaan yang disebut dengan *mantled* (Corley *et al.*, 1986) menghambat komersialisasinya. Fenotipe *mantled* terlihat dari modifikasi *stamen* dan *staminodes* dari bunga jantan dan betina yang berubah menjadi struktur daun buah semu. Keragaman ini juga memberi efek pada buah, beberapa kasus di antaranya menunjukkan sterilitas. Eeuwens *et al.* (2002) melaporkan bahwa persentase bunga *mantled* meningkat dari 5 % hingga 80 % selama tiga sampai empat tahun proses regenerasi kultur. Masalah ini dapat diatasi apabila penyebab terjadinya abnormalitas dapat diidentifikasi atau tersedia teknologi untuk mendeteksi dan menyeleksi bibit kelapa sawit abnormal.

Usaha untuk mempelajari penyebab terjadinya abnormalitas maupun untuk mendapatkan marka molekuler penanda bunga *mantled* telah banyak dilakukan (Matthes *et al.*, 2001; Jaligot *et al.*, 2002; Tregear *et al.*, 2002; Kubis *et al.*, 2003). Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa karakter *mantled* bersifat epigenetik (Rival *et al.*, 1998; Matthes *et al.*, 2001), dan fenomena bunga *mantled* berhubungan dengan metilasi DNA (Kaeppeler & Phillips, 1993; Jaligot *et al.*, 2000, 2002, 2004; Matthes *et al.*, 2001). Beberapa teknik seperti RAPD, RFLP, DDRT serta teknik MSAP (Methylation specific AFLP) untuk analisis metilasi sekuen spesifik pada DNA genom telah digunakan dalam usaha mengidentifikasi sekuen DNA yang bertanggung jawab terhadap abnormalitas pembungaan maupun sebagai upaya untuk mengembangkan marka molekuler (Rival *et al.*, 1998a; 1998b; Jaligot *et al.*, 2000, 2002, 2004; Matthes *et al.*, 2001). Namun sampai saat ini belum diperoleh suatu teknik yang dapat digunakan untuk seleksi bibit abnormal tersebut.

Salah satu gen yang ekspresinya dilaporkan sejalan dengan terjadinya bunga *mantled* pada kelapa sawit adalah *EGADI*, gen penyandi protein yang terkait dengan sistem ketahanan (defensin) (Tregear *et al.*, 2002). Hasil penelitian menunjukkan bahwa akumulasi transkrip *EGADI* pada infloresen abnormal jauh lebih kuat dibandingkan dengan pada infloresen yang normal. Perbedaan tersebut juga terjadi pada tingkat kalus. Kalus dan tunas pucuk yang dikulturkan dari tanaman abnormal hasil kultur jaringan mengakumulasi mRNA *EGADI* jauh lebih tinggi dibandingkan dengan kalus dan tunas pucuk yang ditumbuhkan dari tanaman asal biji maupun dari tanaman normal asal kultur jaringan. cDNA penyandi gen tersebut serta daerah 5' flanking telah diklon.

Berdasar pada hasil penelitian yang telah dilaporkan oleh Tregear *et al.* (2002) tersebut, pada penelitian ini dilakukan analisis untuk mendeteksi akumulasi transkrip mRNA *EGADI* pada bunga dan buah kelapa sawit normal dan abnormal asal kultur jaringan, serta analisis daerah 5' flanking *EGADI* dari buah normal dan *mantled*.

Bahan dan Metode

Bahan tanaman

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga dan buah kelapa sawit normal dan abnormal dari tanaman kelapa sawit asal kultur jaringan Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Bogor, yang berada di kebun koleksi Balai Penelitian Karet Sembawa, Sumatera Selatan.

Perancangan primer

Dua pasang primer dirancang untuk mempelajari akumulasi transkrip *EGADI* melalui RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction), dan dua pasang primer lainnya dirancang untuk mengamplifikasi daerah 5' flanking *EGADI* dengan PCR genomik. Perancangan primer dilakukan menggunakan program *Primer3* (<http://www.biotech.uconn.edu/>) dengan input sekuen cDNA *EGADI* dan sekuen DNA daerah 5' flanking *EGADI* dari kelapa sawit (Tregear *et al.*, 2002).

Isolasi RNA total dari jaringan bunga dan buah normal dan abnormal

RNA total diisolasi dari jaringan bunga dan buah (mesokarp) kelapa sawit normal dan abnormal dengan metode Chang *et al.* (1993) yang dimodifikasi. Jaringan dihaluskan dalam nitrogen cair, dihomogenkan dengan bufer ekstraksi (CTAB 2 %, PVP 2 %, Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 25 mM, NaCl 2,0 M, spermidin 0,5 g/L dan β -Merkapto etanol 2 %) pada 65°C dilanjutkan dengan dua kali ekstraksi menggunakan campuran kloroform: isoamil alkohol (24:1). Setelah ditambah ¼ volume LiCl 10M, RNA diendapkan semalam pada suhu 4°C, kemudian disentrifus 30 menit pada 11.000 rpm. Pelet dilarutkan dalam bufer SSTE (NaCl 1 %, SDS 0,5 %, Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) dan diekstrak kembali dengan kloroform: isoamil alkohol. Setelah diendapkan dalam dua kali volume etanol absolut pada suhu -20°C selama dua jam, RNA dilarutkan dalam *DEPC-treated water*. RNA hasil isolasi dimurnikan dari kontaminan DNA dengan cara berikut. Ke dalam RNA total ditambah kan 0,1 volume LiCl 8 M. Campuran diinkubasi di es selama dua jam, kemudian disentrifus 30 menit pada 13.000 rpm, pada suhu 4°C. Pelet dilarutkan dalam 200 μ L *DEPC* -

treated water, ditambah 0,1 volume Na asetat 3 M dan 2 volume etanol absolut, didinginkan pada suhu -20°C selama 30 menit. Setelah disentrifus, pellet dicuci dengan 70 % etanol dingin. RNA yang diperoleh diuji kualitas dan kuantitasnya dengan jalan elektroforesis pada gel agarose 1 % dan dengan mengukur absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm, 280 nm dan 230 nm.

Isolasi DNA genom dari jaringan buah normal dan abnormal

Isolasi DNA genom dilakukan dengan metode Orozco-Castillo (1993) yang modifikasi. Sampel mesokarp buah kelapa sawit dihaluskan dalam mortar dengan bantuan N_2 cair serta PVP (BM 30000), kemudian dihomogenkan dengan bufer ekstraksi (10 mL CTAB 10 %, 2 mL EDTA 0,5 M pH 8,0; 5 mL tris-HCl 1M pH 8,0; 12,6 mL NaCl 5 M, 20,4 mL dH_2O) yang telah dipanaskan dengan suhu 65°C dan ditambahkan 50 μL β -merkapto-etanol, dengan perbandingan 1:5 (g/mL). Campuran dikocok dengan vorteks kemudian dipanaskan kembali pada suhu 65°C selama 30 menit. Suspensi ditambah larutan kloroform:isoamil alkohol (1x volume), dikocok dengan vorteks dan disentrifus dengan kecepatan 12.000 g selama 10 menit. Larutan DNA di lapisan paling atas dipindahkan ke tabung sentrifus yang baru. Perlakuan ini diulang satu kali lagi, kemudian larutan DNA dari lapisan paling atas dipindahkan ke tabung sentrifus baru dan ditambah isopropanol dingin (satu kali volume). Campuran dibolak-balik perlahan hingga homogen dan disimpan dalam kulkas dengan suhu 4°C selama 30 menit kemudian disentrifus kembali (12.000 g, 10 menit, 4°C). Pelet yang diperoleh dikeringkan, kemudian dilarutkan dengan 1 mL bufer TE (1mL Tris-HCl 1 M pH 8,0; 0,2 mL EDTA 0,5 M pH 8,0 dan 98,8 mL dH_2O), 1/10 volume NaCH_3COO 3 M pH 5,2 dan 2,5 mL etanol absolut.

Selanjutnya campuran disimpan dalam freezer dengan suhu -20°C selama 30 menit atau semalam. Homogenat disentrifus dengan kecepatan 13.000 g selama 10 menit dan suhu 4°C . Endapan dicuci dengan etanol 70 % kemudian DNA dikeringkan dengan *speed vacuum*. DNA dilarutkan dalam 100 μL ddH_2O . Kontaminan RNA dihilangkan dengan menambahkan RNase 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ke dalam larutan dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit.

Akumulasi transkrip EGAD1 pada bunga dan buah normal dan abnormal

Untuk mempelajari perbedaan akumulasi transkrip *EGAD1* pada buah/bunga normal dan abnormal, dilakukan RT-PCR dengan primer spesifik *EGAD1*. Sintesis utas pertama cDNA dilakukan menggunakan kit *Superscript First Strand cDNA Synthesis* dengan primer heksamer acak dari Invitrogen dengan templat

RNA total hasil isolasi. Selanjutnya cDNA utas pertama digunakan sebagai cetakan untuk amplifikasi fragmen gen *EGAD1*, menggunakan primer spesifik hasil rancangan. Hasil RT-PCR dicek dengan elektroforesis pada gel agarosa. Fragmen hasil RT-PCR kemudian diisolasi dari gel dan diseku untuk mengkonfirmasi kebenaran sekuennya sebagai fragmen gen *EGAD1*.

PCR genomik untuk amplifikasi daerah 5' flanking EGAD1

Untuk mempelajari apakah abnormalitas pembungaan terkait dengan perbedaan sekuen pada daerah 5' flanking dari gen *EGAD1*, dilakukan PCR genomik menggunakan primer spesifik. PCR dilakukan dengan program sebagai berikut: Satu siklus denaturasi awal pada suhu 94°C selama lima menit dilanjutkan dengan 35 siklus yang masing-masing terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C , selama 45 detik, *annealing* (penempelan) pada suhu 57°C , 4 detik dan pemanjangan DNA pada suhu 72°C , selama 1 menit 30 detik. Pada akhir reaksi ditambahkan satu siklus pada suhu 72°C , selama empat menit.

Fragmen hasil PCR diisolasi dan dimurnikan dari gel, kemudian diklon ke dalam *E. coli* menggunakan vektor kloning pCR2.1-TOPO. Koloni rekombinan dicek dengan PCR koloni, kemudian koloni yang teruji positif mengandung sisipan DNA diisolasi plasmidnya selanjutnya didigesti dengan enzim restriksi. Setelah itu, fragment terklon diseku dan dianalisis untuk mengetahui adanya sekuen atau motif DNA tertentu yang terkait dengan perannya sebagai protein defensin dan secara tidak langsung berperan dalam mengontrol akumulasi transkrip *EGAD1*. Hal tersebut dilakukan untuk melihat ada tidaknya perbedaan urutan basa DNA, yang mungkin berpengaruh terhadap tingkat ekspresi gen pada kedua fenotipe.

Hasil dan Pembahasan

Primer spesifik untuk amplifikasi fragmen EGAD1 dan daerah 5' flanking EGAD1

Dua pasang primer dirancang untuk mengamplifikasi fragmen DNA daerah 5' flanking *EGAD1*, yaitu 5EGD-11F/11R dan 5EGD8F/8R dan dua pasang primer lain dirancang untuk mempelajari akumulasi transkrip mRNA *EGAD1* dengan RT-PCR, yaitu EGD-F/R dan EGD-2F/2R. Perancangan primer untuk RT-PCR dilakukan menggunakan input DNA dari daerah penyandi gen *EGAD1* (Gambar 1 bagian bawah), sedangkan dalam perancangan primer untuk amplifikasi daerah 5' flanking *EGAD1* digunakan kedua jenis input DNA yang berbeda. Pada primer 5EGD-11F/11R, input yang digunakan hanya urutan basa daerah ujung 5' gen *EGAD1*, sedangkan untuk primer 5EGD8F/8R, input yang digunakan adalah

urutan basa daerah ujung 5' gen *EGAD1* ditambah sedikit urutan basa bagian awal dari gen *EGAD1*.

Susunan nukleotida dan titik leleh (T_m) dari keempat pasang primer tersebut disajikan pada Tabel 1, sedangkan posisi masing-masing primer dapat dilihat pada Gambar 1. Berdasarkan posisi primer tersebut, maka RT-PCR menggunakan pasangan primer EGD-F/R akan menghasilkan fragmen DNA berukuran 406 bp dan pasangan primer EGD-2F/2R menghasilkan fragmen DNA 381 bp. Amplifikasi DNA daerah 5'-fraking *EGAD1* menggunakan pasangan primer 5EGD-11F/11R akan menghasilkan fragmen DNA berukuran 845 bp, sedangkan pasangan primer 5EGD-8F/8R akan menghasilkan fragmen DNA berukuran 297 bp. Perancangan primer merupakan salah satu tahapan penting dalam amplifikasi suatu fragmen DNA baik dengan PCR yang menggunakan templat DNA genom maupun dengan RT-PCR menggunakan templat RNA. Selain spesifisitas primer yang menunjukkan tingkat komplementasi antara basa-basa dari primer dengan basa-basa dari kedua ujung fragmen DNA yang akan diamplifikasi, beberapa hal perlu diperhatikan dalam merancang primer, di antaranya adalah panjang primer, persen G+C, titik leleh (T_m), serta tingkat komplementasi antar basa dari kedua primer. Secara umum, suatu primer yang baik biasanya mempunyai panjang antara 18-28 nukleotida, tersusun oleh 50 – 60% G+C dan titik leleh pasangan primer sebanding (Innis & Gelfand 1990). Semakin besar peluang terjadinya komplementasi antar basa dari pasangan primer akan semakin rendah keberhasilan proses amplifikasi suatu fragmen DNA. Oleh karena itu dalam perancangan primer selalu diusahakan agar tidak ada komplementasi antar basa dari primer yang digunakan.

Kuantitas dan kualitas DNA dan RNA hasil isolasi

Gambar 2 menampilkan profil elektroforesis DNA dari buah normal dan buah abnormal (A), serta RNA hasil isolasi dari bunga dan buah normal dan abnormal

(B). Dari Gambar tersebut nampak bahwa baik DNA maupun RNA diisolasi dalam keadaan utuh. Selain itu RNA yang diperoleh bebas dari kontaminasi DNA. Data hasil pengukuran absorbansi menunjukkan bahwa konsentrasi DNA dan RNA yang diperoleh cukup tinggi, sedangkan kemurniannya menunjukkan hasil yang bervariasi, namun secara umum cukup memadai untuk digunakan dalam analisis lebih lanjut. (Tabel 2). Kualitas RNA merupakan salah satu faktor yang sangat menentukan keberhasilan reaksi RT-PCR. Selain utuh (tidak terdegradasi), RNA juga harus bebas dari kontaminan DNA dan senyawa lain seperti protein dan polisakarida. Adanya kontaminan DNA dapat menjadi target polimerase untuk amplifikasi sehingga hasil yang diperoleh menjadi tidak spesifik. Sedangkan kontaminasi protein dan polisakarida akan menghambat kerja polimerase yang dapat berakibat pada kegagalan proses amplifikasi. Oleh karena itu RNA yang terdegradasi oleh *RNase* atau terkontaminasi oleh komponen lain termasuk DNA menjadi salah satu indikator ketidakberhasilan isolasi RNA.

Isolasi RNA dari suatu jaringan, terutama dari tanaman berkayu seringkali menghadapi berbagai hambatan sehingga RNA yang dihasilkan dalam keadaan terdegradasi atau terkontaminasi oleh komponen lain termasuk DNA. Dalam penelitian ini beberapa tahapan telah dilakukan untuk menghilangkan kontaminasi DNA dan mengeliminir kontaminasi protein serta polisakarida, sehingga meskipun cukup bervariasi, kualitas RNA yang dihasilkan cukup memadai untuk digunakan sebagai templat dalam reaksi RT-PCR.

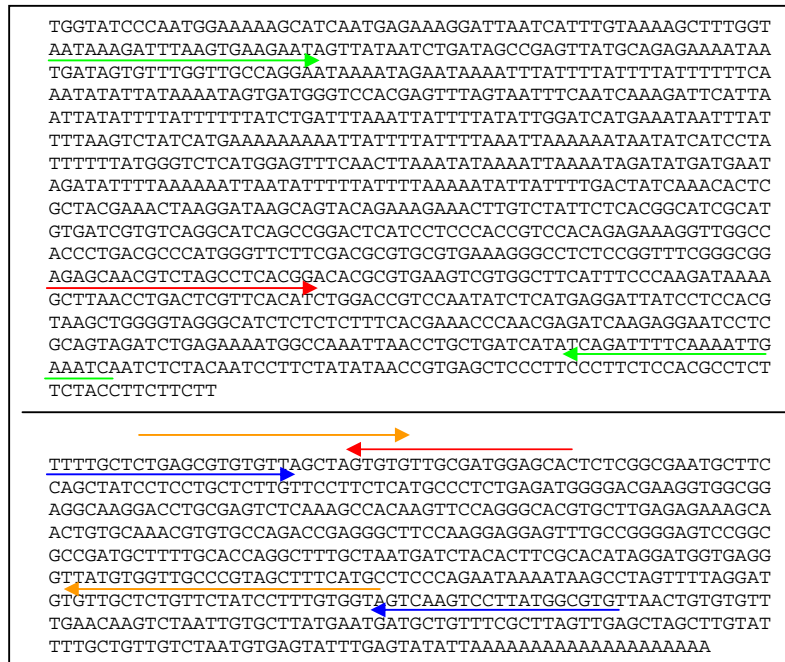
RT-PCR untuk analisis akumulasi mRNA EGAD1

Analisis ekspresi *EGAD1* pada bunga dan buah normal dan abnormal dilakukan untuk mengkonfirmasi kembali bahwa gen tersebut terekspresi pada level yang berbeda antara fenotipe normal dan abnormal, sebelum dilakukan analisis sekuen DNA daerah 5'. Dua pasang primer yaitu EGD-F/R dan

Tabel 1. Susunan nukleotida primer yang digunakan untuk PCR daerah 5'flanking *EGAD1* dan RT-PCR fragmen gen *EGAD1*

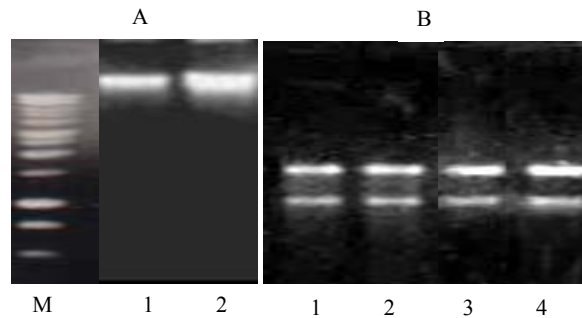
Table 1. Nucleotide sequence of the primers used for PCR of 5'flanking *EGAD1* and RT-PCR of *EGAD1* gene fragment.

Kode (Code)	Susunan nukleotida (Nucleotide sequence)	T_m (°C)	Fungsi (Function)
5EGD-11F	5'-GATAGTGTTTTGGTTGCCAGGA-3'	63,7	PCR 5' -flanking <i>EGAD1</i>
5EGD-11R	5'-TAGAAGAGGCGTGGAGAAGG-3'	63,7	PCR 5' flanking <i>EGAD1</i>
5EGD-8F	5'-GCTTAACCTGACTCGTTCACATC'-3'	63,7	PCR 5' flanking <i>EGAD1</i>
5EGD-8R	5'-TGCTCCATCGCAACACAC-3'	64,9	PCR 5' flanking <i>EGAD1</i>
EGD-F	5'-AGCTATCCTCTGCTCTTGT-3'	59,6	RT-PCR <i>EGAD1</i>
EGD-R	5'-CAACTAAGCGAAACAGCATC-3'	60,0	RT-PCR <i>EGAD1</i>
EGD-2F	5'-CTGAGCGTGTGTTAGCTAGTGTGTT-3'	65,4	RT-PCR <i>EGAD1</i>
EGD-2R	5'-TACCACAAAGGATAGAACAGAGCAAC-3'	65,1	RT-PCR <i>EGAD1</i>



Gambar 1. Sekuen DNA daerah 5' flanking *EGAD1* (atas) dan bagian awal daerah penyandi *EGAD1* (bawah), serta posisi primer (tanda panah hijau : 5EGD-11F/R, merah : 5EGD-8F/R, biru : EGD-F/R, oranye: EGD2-F/R)

Figure 1. DNA sequence of 5' flanking *EGAD1* (top) and part of *EGAD1* coding sequence (bottom), and the primer position (green arrow : 5EGD-11F/R, Red arrow : 5EGD-8F/R, blue arrow : EGD-F/R, and orange arrow: EGD2-F/R)



Gambar 2. (A) Profil elektroforesis DNA hasil isolasi (lajur 1 : buah normal, lajur 2 : buah abnormal); (B) RNA hasil isolasi (lajur 1 : bunga normal, lajur 2 : bunga abnormal, lajur 3 : buah normal, lajur 4 : buah abnormal). M: 1kb DNA ladder.

Figure 2. (A) Electrophoretic profile of the isolated DNA (lane 1: normal fruit, lane 2: abnormal fruit); (B) Isolated RNA (lane 1: normal flower, lane 2: abnormal flower, lane 3: normal fruit, lane 4: abnormal fruit). M: 1 kb DNA ladder.

EGD-2F/R (Tabel 1) digunakan untuk mempelajari akumulasi mRNA *EGAD1*, tetapi hanya pasangan primer EGD-F/R yang dapat menghasilkan fragmen DNA. Sekuensing DNA yang dilanjutkan dengan analisis Blast dari produk RT-PCR tersebut mengkonfirmasi kebenaran fragmen tersebut sebagai gen penyandi *EGAD1* (data tidak ditampilkan). Hasil analisis akumulasi transkrip mRNA *EGAD1* menunjukkan bahwa pada bunga dan buah abnormal ekspresi *EGAD1* lebih tinggi dibandingkan dengan

pada bunga dan buah normal. Hasil tersebut mendukung hasil penelitian Tregear *et al.* (2002), yang menunjukkan bahwa *EGAD1* terekspresi lebih tinggi pada infloresen abnormal, dan kalus serta tunas pucuk yang diinduksi dari tanaman abnormal asal kultur jaringan, dibandingkan dengan pada infloresen normal dan kalus serta tunas pucuk yang diinduksi dari tanaman asal biji maupun tanaman normal asal kultur jaringan.

Tabel 2. Konsentrasi dan kemurnian DNA dan RNA hasil isolasi.

Table 2. Concentration and purity of the isolated DNA and RNA.

No.	Jenis Sampel <i>Sample type</i>	A260 (nm)	Konsentrasi <i>Concentration</i> (ug/uL)	Kemurnian (<i>Purity</i>)	
				A260/A280	A260/A230
1	DNA buah normal	0,385	1,380	1.577	1.255
2	DNA buah abnormal	0,190	0,760	1.640	1.750
3	RNA bunga normal	0,385	1,380	1.725	1.215
4	RNA bunga abnormal	0,190	0,760	1.626	1.469
5	RNA buah normal	0,105	0,420	1.944	1.908
6	RNA buah abnormal	0,209	0,836	1.909	1.873

Perbedaan ekspresi suatu gen dapat disebabkan oleh beberapa faktor, salah satunya adalah perbedaan urutan basa pada daerah regulator, yang pada umumnya berada pada daerah 5'-*flanking* dari gen tersebut. Oleh karena itu untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan sekuen DNA pada daerah regulator *EGAD1* antara buah normal dan abnormal yang mungkin berkaitan dengan tingkat ekspresi dan abnormalitas, maka dilakukan PCR untuk mengamplifikasi daerah 5'-*flanking EGAD1*, dilanjutkan dengan analisis DNA daerah tersebut (Gambar 3).

PCR genomik untuk amplifikasi fragmen daerah 5' flanking EGAD1

PCR genomik untuk mengamplifikasi sekuen DNA daerah 5' flanking dari buah normal dan abnormal, pada awalnya dilakukan dengan menggunakan pasangan primer 5EGD-11F/R. Pasangan primer tersebut diharapkan akan mengamplifikasi DNA dengan ukuran sekitar 800 bp di daerah 5'-*flanking* dari gen *EGAD1*. Elektroforesis hasil PCR genomik daerah 5' flanking *EGAD1* kedua sampel menggunakan pasangan primer 5EGD-11F/R menghasilkan fragmen DNA yang sama ukurannya sekitar 800 bp sebagaimana diharapkan (Gambar 4A). Namun hasil analisis BlastN ternyata menunjukkan tingkat homologi yang rendah antara sekuen fragmen yang dihasilkan dari kedua sampel tersebut dengan sekuen daerah 5' flanking *EGAD1* dari kelapa sawit. Untuk itu dicoba pasangan primer lainnya, yaitu 5EGD-8F/R.

Hasil PCR menggunakan pasangan primer tersebut disajikan pada Gambar 4B. Fragmen DNA berukuran sekitar 300 bp yang dihasilkan dimurnikan dan diklon ke dalam *E. coli*. Koloni rekombinan dianalisis dengan PCR koloni untuk memastikan adanya sisipan DNA target, kemudian diisolasi plasmidnya dan disekuen. Hasil PCR koloni dan plasmid hasil isolasi sebelum dan setelah didigesti dengan *EcoRI* mengkonfirmasi keberadaan fragmen DNA dengan ukuran sesuai fragmen DNA target (Gambar 5). Uji Blast dari sekuen fragmen DNA tersebut menunjukkan bahwa sekuen DNA fragmen hasil PCR dari buah normal mempunyai homologi tinggi dengan fragmen daerah 5' flanking *EGAD1* dengan *score* 137 bit dan *E-value* 3e-29,

demikian pula dengan sekuen dari buah abnormal, dengan *score* 378 bit dan *E-value* 7e-102 (Hasil sekuen yang dan analisis Blast tidak disajikan).

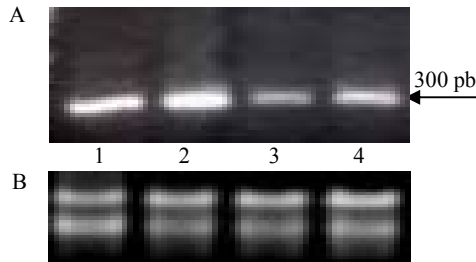
Selain suhu *annealing* (penempelan) dan konsentrasi ion Mg, spesifisitas primer merupakan salah satu faktor penting dalam amplifikasi suatu fragmen DNA dengan mesin PCR. Pada percobaan ini digunakan primer yang cara perancangannya didasarkan pada sekuen gen yang sama yang berasal dari kalus kelapa sawit, sehingga diharapkan mempunyai spesifisitas yang tinggi. Di sisi lain, pedoman umum untuk suhu penempelan adalah 5°C di bawah titik leleh (Tm) primer (Innis & Gelfand, 1990). Meskipun demikian untuk mendapatkan hasil yang baik, optimasi kondisi amplifikasi seringkali perlu dilakukan dengan mencoba berbagai suhu penempelan.

Analisis perbedaan sekuen DNA daerah 5' flanking dari kedua fenotipe buah

Sekuen DNA buah normal dan abnormal dianalisis lebih lanjut untuk mengidentifikasi adanya perbedaan urutan DNA melalui peninjauan kedua sekuen dengan program *ClustalW* - BioEdit yang tersedia secara online. Hasil peninjauan menunjukkan adanya tiga perbedaan. Pada buah abnormal, nampak adanya tambahan satu basa 'G' setelah basa ke 140. Dua perbedaan lainnya terdapat pada basa ke-188 dan basa ke-198, yaitu pada buah normal masing-masing adalah basa 'T' dan 'C', sedangkan pada buah abnormal adalah 'C' dan 'A'.

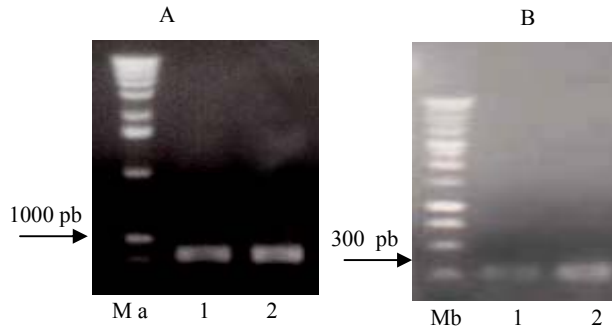
Analisis peta restriksi dari kedua sekuen tersebut juga menghasilkan perbedaan situs restriksi. Pada buah normal terdapat situs restriksi untuk enzim *EaeI* pada posisi basa ke-140 dan satu situs restriksi untuk enzim *MscI* pada basa ke-142, yang keduanya tidak dijumpai pada buah normal. Perbedaan lainnya adalah pada buah normal terdapat lima situs restriksi *MnII*, sedangkan pada buah abnormal dijumpai adanya enam situs enzim tersebut (Tabel 3).

Adanya perbedaan peta restriksi antara sekuen DNA daerah 5'*EGAD1* dari buah normal dan buah mantled dapat menjadi dasar pengembangan marka molekuler pembeda fenotipe normal dan abnormal (*mantled*). Dalam hal ini tahapan yang dilakukan



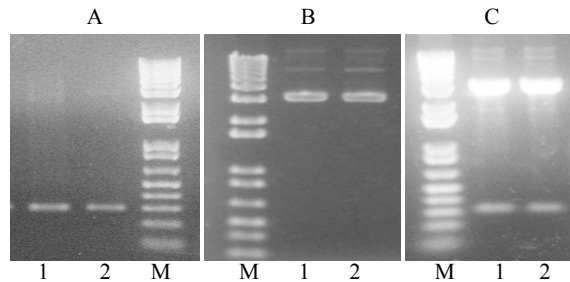
Gambar 3. (A) Ekspresi *EGAD1* pada bunga normal (1), bunga abnormal (2), buah normal (3), buah abnormal (4); (B) RNA dari sampel yang sama.

Figure 3. (A) Expression of *EGAD1* in normal flower (1), abnormal flower (2), normal fruit (3), abnormal fruit (4); (B) RNA of the same samples.



Gambar 4. Profil elektroforesis hasil PCR daerah 5'flanking *EGAD1* (A) dengan pasangan primer 5EGD-11F/11R; (B) dengan pasangan primer 5EGD-8F/8R (lajur 1: buah normal, lajur 2: buah abnormal, Ma: 1 kb DNA ladder, Mb: 1 kb plus DNA ladder).

Figure 4 Electrophoretic profile of the PCR product for 5'flanking *EGAD1*(A) using primer pair 5EGD-11F/11R; (B) using primer pair 5EGD-8F/8R (lane 1: normal fruit, lane 2: abnormal fruit, Ma: 1 kb DNA ladder, Mb: 1 kb plus DNA ladder)



Gambar 5. Profil elektroforesis produk PCR koloni (A); hasil isolasi plasmid rekombinan (B); dan digesti plasmid rekombinan dengan *Eco* RI. (Lajur 1: hasil transformasi dengan fragmen produk PCR dari buah normal, lajur 2: hasil transformasi dengan fragmen produk PCR dari buah abnormal).

Figure 5. Electrophoretic profile of colony PCR product (A); recombinant plasmid isolation (B); and digested recombinant plasmid using *Eco*RI. (Lane 1: product of transformation using PCR product of normal fruit, lane 2: product of transformation using PCR product of abnormal fruit.

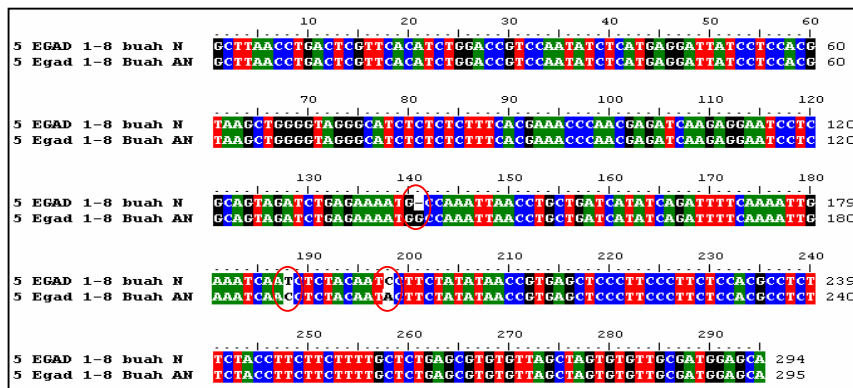
adalah amplifikasi fragmen daerah 5' *EGAD1* dengan primer spesifik dilanjutkan dengan digesti fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan enzim restriksi yang hanya memotong DNA dari salah satu fenotipe, yaitu *Eae*I dan *Mse*I. Hasil digesti dicek pada gel agarosa. Apabila pada amplifikasi digunakan pasangan primer 5'EGD-8F/8R maka tanaman kelapa sawit normal akan menghasilkan 1 pita DNA berukuran

sekitar 300 bp, sedangkan tanaman abnormal menghasilkan 2 pita DNA berukuran sekitar 140 dan 160 bp. Namun karena DNA berukuran 140 dan 160 bp pada umumnya sulit dipisahkan dari gel, maka elektroforesis hasil digesti dari tanaman abnormal kemungkinan akan menghasilkan 1 pita DNA berukuran sekitar 150 bp.

Tabel 3. Enzim restriksi yang mempunyai situs pemotongan pada sekuen DNA daerah 5' flanking EGAD1 dari buah normal dan abnormal.

Table 3. Restriction enzymes which has restriction site at the DNA sequence of 5' flanking EGAD1 from normal and abnormal fruits

Enzim restriksi Restriction enzyme	Buah Normal (Normal fruit)		Buah abnormal (Abnormal fruit)	
	Frekuensi Frequency	Posisi (Position)	Frekuensi Frequency	Posisi (Position)
BanII	1	219	1	219
BclII	1	157	1	157
BglIII	1	127	1	127
BpII	2	102, 134	2	102, 134
BsaAI	1	60	1	60
BseMII	2	122, 252	2	122, 252
BseYI	1	65	1	65
BsiHKA1	1	219	1	219
Bsp1286I	1	219	1	219
BspCNI	2	123, 253	2	123, 253
BspHI	1	41	1	41
BspMI	1	160	1	160
BstYI	1	127	1	127
EaeI	0	-	1	140
EarI	1	244	1	244
EcoICRI	1	217	1	217
Hpy8I	1	18	1	18
Hpy188III	4	24, 42, 90, 108	4	24, 42, 90, 108
MboII	2	231, 241	2	231, 241
MlyI	1	5	1	5
MnII	5	38, 64, 104, 128, 247	6	38, 64, 104, 128, 199, 247
MscI	0	-	1	142
PleI	1	5	1	5
SacI	1	219	1	219
SfaNI	1	85	1	85



Gambar 6. Hasil penjaran sekuen DNA daerah 5' flanking EGAD1 dari buah normal (5 EGAD 1-8 buah N) dan buah abnormal (5 EGAD 1-8 buah AN).

Figure 6. Alignment of DNA sequences of the 5' flanking EGAD1 from normal (5 EGAD 1-8 fruits N) and abnormal (5 EGAD 1-8 fruits AN).

Kesimpulan

Terdapat perbedaan akumulasi transkrip *EGADI* antara bunga/buah normal dengan pada bunga/buah abnormal. Bunga abnormal mengekspresikan *EGADI* lebih tinggi dibandingkan dengan yang normal. Sekuen DNA daerah 5' flanking *EGADI* dari buah normal berbeda dengan yang dari buah abnormal pada tiga basa, yaitu basa ke-141, basa ke-188 dan basa ke-198, yang mengakibatkan perbedaan pada peta restriksi kedua sekuen. Hal ini memberi peluang kemungkinan dirakitnya suatu penanda abnormalitas pada kelapa sawit melalui teknik RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

Daftar Pustaka

- Asmono D (2006). Penelitian dan Pengembangan teknologi genomik dan rekayasa genetika kelapa sawit: Status saat ini dan permasalahannya. *Dalam: Focus Group Discussion Agenda Riset Penguatan Industri Hulu Kelapa Sawit*, MAKSI. PPS-IPB Bogor, 20 April 2006.
- 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.
- Corley RHV, CH Lee, LH Law & CY Wong (1986). Abnormal development in oil palm clones. *The Planter*, 62, 233-240.
- Euweens CJ, S Lord, CR Donough, V Rao, G Vallejo & Nelson (2002). Effects of tissue culture conditions during embryo multiplication on the incidence of "mantled" flowering in clonally propagated oil palm. *Plant Cell Tiss & Org Cult*, 70, 311-323.
- Innis MA & DH Gelfand (1990). Optimization of PCR. *In: MA Innis et al. (eds) PCR Protocols a Guide to Methods and Application*. London, Academic Press p. 3-11.
- Jaligot E, T Beule, S Dussert & J-LVerdeil (2000). Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. *Plant Cell Rep*, 7, 684-690.
- Jaligot E, T Beule & A Rival (2002). Methylation-sensitive RFLPs: characterisation of two oil palm markers showing somaclonal variation-associated polymorphism. *Theor Appl Genet*, 104, 1263-1269.
- Jaligot E, T Beulé, F.-C Baurens, N Billotte & A Rival (2004). Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms associated with the "mantled" variant phenotype in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Genome*, 47, 224-228.
- Jacquemard J Ch, H Zaelani & E Dermawan (2006). Peranan bahan tanaman kelapa sawit dalam pengelolaan perkebunan yang berkelanjutan/berkesinambungan. *Dalam: Focus Group Discussion, Penyusunan Agenda Riset Penguatan Industri Hulu Kelapa Sawit*, MAKSI. Bogor, 20 April 2006.
- Kaepler SM & RL Phillips (1993). Tissue cultured-induced DNA methylation variation in maize. *In: Proc of National Academy of Sciences, USA*. 90, 8773-8776.
- Kubis SE, AMMF Castilho, AV Vershinin & JHH Seymour (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.
- Latief S, G Ginting, Fatmawati & D Asmono (2003). The oil palm clones performance in the northern part of Sumatera: Recovery of mantled fruit and the productivity. *In: ISOPB/IOPRI International Seminar on the Progress of Oil Palm Breeding and Selection*, Medan, Indonesia, 6-9 October 2003
- 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.
- Orosco-Castillo, K T Chalmerna, B Wough & W Powell (1994). Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD Marker. *Theor Appl Genet*, 87, 934-935.
- Rival A, L Bertrand, TBeule, MC Combes, P Trouslot & P Lashermes (1998a). Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Breed*, 117, 73-76.
- Rival A, J Tregear, JLVerdeil, F Richaud, T Beule, Y Duval, C Hartman & A Rode (1998b). Molecular search for mRNA and genomic marker of the oil palm "mantled" somaclonal variation. *Acta Horticult*, 461, 16.
- Soh AC, G Wong, CC Tan, PS Chew, TY Hor, SP Chong & K Gopal (2001). Recent advances toward commercial production of elite oil palm clones. *In: Proc of the PIPOC 2001 International Palm Oil Congress. Agriculture Conference Malaysia*. p. 33-44
- Tregear JW, F Morcillo, F Richaud, A Berger, R Singh, Cheah S-C, C Hartmann, A Rival & Y Duval (2002). Characterization of a defensin gene expressed in oil palm inflorescences: induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variation events. *J Exp Bot*, 53, 1387-1396.