

## Kloning fragmen gen penyandi $\beta$ -ketoacyl-ACP synthase II dari dua tipe kelapa sawit dengan kandungan asam oleat yang berbeda

*Cloning of gene fragment encoding  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthase II from two types of oil palm with different oleic acid content*

Asmini BUDIANI<sup>1)</sup> & Abdul Razak PURBA<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Jl. Taman Kencana No. 1, Bogor 16151, Indonesia

<sup>2)</sup> Pusat Penelitian Kelapa Sawit, Jl. Brigjen Katamsno No. 51, Medan 20158, Indonesia

Diterima tgl 24 Februari 2010/Disetujui tgl 26 Mei 2010

### Abstract

*In addition to increase productivity, oil palm breeding is also aimed to increase oil quality, one of which is oleic acid content. Conventionally, the increase of oleic acid is carried out by crossing between *Elaeis guineensis* which is high in oil content and *Elaeis oleifera* which contain high oleic acid. Genetic engineering to increase oleic acid might be done by over expressing gene encoding  $\beta$ -Ketoacyl-ACP Synthase II (KASII) in the mesocarp of oil palm. As a preliminary work of genetic engineering to increase oleic acid content, this research was aimed to clone DNA fragment of gene encoding KASII by using RT-PCR. Total RNA were isolated from the mesocarp of two different types of oil palms, namely Simalungun (*E. guineensis*) and Hibrida (*E. guineensis* x *E. oleifera*), and used for synthesis of first strand cDNA. Amplification of KASII DNA fragments was carried out using first strand cDNA as a template with specific primers. The RT-PCR product was verified by electrophoresis on agarose gel, isolated and purified from the gel, sequenced and then cloned into *E. coli* using pGEM-T Easy cloning vector. Analysis of the target DNA in transformed *E. coli* was done by colony PCR. Recombinant plasmid was isolated from recombinant *E. coli* followed by DNA sequencing and analysis. DNA sequences were analysed using BLASTn to test the homology with similar genes. The results show that DNA fragment of RT-PCR products from Simalungun and Hibrida types of oil palm have been cloned in *E. coli*, and the sequences have been confirmed as a fragment of KASII gene. Analysis of the two sequences indicated that there were differences of four nucleotides at position no of 91, 103, 115, and 148.*

[Keywords: KASII, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, oleic acid, oil palm].

### Abstrak

Selain meningkatkan produksi, pemuliaan kelapa sawit juga ditujukan untuk meningkatkan kualitas minyak sawit, salah satunya adalah meningkatkan kandungan oleat. Secara konvensional peningkatan kandungan oleat dilakukan melalui penyilangan antara *Elaeis guineensis* yang tinggi rendemen minyaknya dengan *Elaeis oleifera* yang tinggi kandungan oleatnya. Rekayasa genetika untuk peningkatan kandungan oleat dapat ditempuh antara lain dengan meningkatkan ekspresi gen penyandi  $\beta$ -Ketoacyl-ACP Synthase II (KASII) pada mesokarp buah sawit. Sebagai bagian dari upaya peningkatan kandungan oleat, penelitian ini bertujuan untuk mengklon fragmen gen penyandi KASII dengan pendekatan RT-PCR. RNA total diisolasi dari mesokarp dua tipe kelapa sawit yaitu Simalungun dan Hibrida (*E. guineensis* x *E. oleifera*), kemudian digunakan dalam sintesis utas pertama cDNA. Amplifikasi fragmen DNA penyandi KASII dilakukan menggunakan primer spesifik dan templat cDNA utas pertama hasil sintesis. Produk RT-PCR diverifikasi dengan elektroforesis pada gel agarosa, diisolasi dan dimurnikan dari gel, disekuen kemudian diklon dalam *E. coli* menggunakan vektor kloning pGEM-T Easy. Analisis adanya fragmen DNA target dalam sel *E. coli* transforman dilakukan dengan PCR koloni. Plasmid rekombinan diisolasi dari sel rekombinan dan diverifikasi pada gel agarose kemudian disekuen kembali untuk mengkonfirmasi bahwa fragmen DNA terklon adalah bagian dari gen penyandi KASII. Sekuen DNA dianalisis menggunakan BLASTn untuk mengetahui homologinya dengan gen yang sama. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fragmen DNA produk RT-PCR dari kelapa sawit tipe Simalungun dan Hibrida telah terklon dalam *E. coli* dan sekuen DNAny dikonfirmasi sebagai fragmen gen penyandi KASII. Hasil analisis sekuen DNA KASII dari tipe Simalungun dengan tipe Hibrida juga mengindikasikan adanya perbedaan pada empat nukleotida yaitu pada posisi ke-91, ke-103, ke-115, dan ke-148.

[Kata kunci: KASII, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, asam oleat, minyak sawit].

## Pendahuluan

Pemuliaan kelapa sawit untuk menghasilkan bibit unggul berdaya hasil tinggi dengan kualitas minyak yang lebih baik secara konvensional dilakukan dengan menyilangkan tetua dari spesies *E. guineensis* (D x P) yang tinggi rendemen minyaknya, tetapi kandungan oleatnya relatif rendah dengan *E. oleifera* yang tinggi kandungan oleatnya namun rendemen minyaknya sangat rendah. Sampai saat ini belum diperoleh varietas komersial hasil persilangan tersebut yang rendemen minyaknya setinggi *E. guineensis* dan kandungan oleatnya setinggi *E. oleifera*, meskipun beberapa kemajuan telah diperoleh. Hal ini disebabkan lamanya siklus pemuliaan, keterbatasan *gene pool*, serta kebutuhan lahan yang sangat luas untuk pengujian. Oleh karena itu perlu dikembangkan cara alternatif sehingga bibit unggul demikian dapat dihasilkan. Salah satu cara yang dipandang merupakan terobosan adalah pendekatan melalui bioteknologi molekuler.

Saat ini hampir 90% dari kebutuhan minyak sawit digunakan untuk bahan makanan seperti minyak goreng, margarin, *shortening*, vanaspati dan lain sebagainya (Lin, 2002). Rendahnya kandungan *polyunsaturated fatty acid* (10-11 % asam linoleat) merupakan suatu kelebihan, karena dengan komposisi demikian minyak sawit bersifat stabil terhadap oksidasi maupun pemanasan tinggi. Namun, tingginya kandungan asam palmitat dalam minyak sawit (44-45 %), menjadi kendala dalam persaingan global dengan beberapa minyak nabati lain. Oleh karena itu untuk meningkatkan daya saingnya, selain penyediaan benih dengan potensi produksi yang tinggi, pemuliaan kelapa sawit juga diarahkan untuk pengembangan karakter lain, salah satunya adalah peningkatan kandungan asam oleat.

Menurut Madon *et al.* (2005), industri kelapa sawit diperkirakan akan menikmati nilai tambah sebesar US\$ 1.500/ha/tahun apabila kandungan asam oleatnya > 65%. Meskipun belum ada laporan hasil penelitian, kandungan oleat yang tinggi juga dipercaya akan meningkatkan kualitas biodiesel minyak sawit. Minyak biji kedelai hasil rekayasa genetika yang kandungan oleatnya 85%, terbukti menunjukkan performa biodiesel yang lebih baik (Asmono, 2006). Di samping itu, minyak sawit dengan oleat tinggi juga sangat tepat untuk bahan makanan karena dipercaya dapat menurunkan risiko penyakit jantung.

Peningkatan kandungan asam oleat telah berhasil dilakukan pada berbagai tanaman, di antaranya pada kedelai, kapuk, *Arabidopsis* dan *Brassica* (Thelen & Ohlrogge, 2002). Kinney (1996) berhasil meningkatkan kandungan asam oleat dalam kedelai hingga 86%, menurunkan kandungan asam linoleat dari 55% menjadi kurang dari 1% dan asam lemak jenuhnya diturunkan menjadi 10%, dengan cara menekan oleoyl-

$\Delta$ -12 desaturase. Melalui rekayasa genetika kandungan asam oleat pada kelapa sawit dapat ditingkatkan dengan beberapa pendekatan, diantaranya meningkatkan aktivitas enzim  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthase II (KASII) dan menekan aktivitas palmitoyl-ACP thioesterase (PAT) (Cheah *et al.*, 1995). Peningkatan aktivitas KASII dapat dilakukan dengan mengoverekspresikan gen tersebut dalam jaringan penghasil minyak (mesokarp), sedangkan aktivitas PAT dapat ditekan melalui mekanisme *gene silencing* (Singh *et al.*, 2000). Sebagai langkah awal dari usaha tersebut, penelitian ini bertujuan mengklon fragmen gen penyandi KASII dari mesokarp buah kelapa sawit yang berbeda rendemen minyaknya.

## Bahan dan Metode

### Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mesokarp buah sawit dari dua tipe kelapa sawit yang berbeda rendemen minyak dan kandungan oleatnya, yaitu D x P Simalungun (*E. guineensis*) (S), dengan rendemen minyak (Pabrik) 26,5% dan kandungan oleat 38,5%, dan Hibrida (Simalungun x *E. oleifera*) (H) dengan rendemen minyak 11,4% dan kandungan oleat 45,3%. Setelah dipanen, mesokarp buah sawit dipisahkan dari kulit dan bijinya, dipotong kecil-kecil kemudian dibekukan dalam nitrogen cair dan disimpan dalam freezer bersuhu -40°C, sampai pada saatnya digunakan untuk isolasi RNA.

### Perancangan primer spesifik KASII

Primer spesifik untuk mengamplifikasi fragmen KASII dirancang berdasarkan informasi urutan nukleotida dari gen yang sama yang dapat diakses dari *GenBank*. Perancangan primer dilakukan menggunakan program Primer3 yang dapat diakses secara *on line* (<http://www.biotoools.umassmed.edu/>), dengan memperhatikan beberapa parameter seperti ukuran dan posisi fragmen DNA target, titik leleh ( $T_m$ ), komplementasi pada ujung 3' dan lain sebagainya.

### Isolasi RNA total dari mesokarp buah sawit

RNA total diisolasi dari jaringan mesokarp buah sawit yang sedang aktif mensintesis minyak dengan metode Chang *et al.* (1993) yang dimodifikasi. Sebanyak 1 gram jaringan mesokarp dihaluskan dalam nitrogen cair, dihomogenkan dengan 10 mL bufer ekstraksi (CTAB 2%, PVP 2%, Tris-HCl 100 mM pH 8,0; M EDTA 25 mM, NaCl 2,0 M, spermidin 0,5 g/L dan  $\beta$ -Merkaptoetanol 2%) pada suhu 65°C dilanjutkan dengan dua kali ekstraksi menggunakan campuran kloroform: isoamil alkohol (24:1). Setelah ditambah

$\frac{1}{4}$  x volume LiCl 10 M, RNA diendapkan semalam pada suhu 4°C, kemudian disentrifugasi selama 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 ditambahkan 0,1 x volume LiCl 8 M. Campuran diinkubasi di es selama dua jam, kemudian disentrifugasi 30 menit pada 13.000 rpm, dengan suhu 4°C. Pelet dilarutkan dalam 200  $\mu$ L DEPC– treated water, ditambah 0,1 volume 3 M Na asetat dan 2 volume etanol absolut, didinginkan pada suhu -20°C selama 30 menit. Setelah sentrifugasi, pelet dicuci dengan 70°C etanol dingin. RNA yang diperoleh diuji kualitas dan kuantitasnya dengan jalan elektroforesis pada gel agarose 1%.

#### *Amplifikasi fragmen DNA KASII dengan RT-PCR*

Sintesis utas pertama cDNA dilakukan menggunakan kit *Superscript First Strand cDNA Synthesis* dari Invitrogen dengan templat RNA total mesokarp. Selanjutnya cDNA utas pertama digunakan sebagai cetakan untuk amplifikasi fragmen gen penyandi daerah konservatif *KASII*, menggunakan primer spesifik hasil rancangan. Untuk mendapatkan hasil amplifikasi terbaik, PCR dilakukan pada suhu *annealing* (penempelan primer) 56°C dan 58°C, serta konsentrasi MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM dan 5,0 mM. Hasil amplifikasi dicek pada gel agarose.

#### *Kloning dan analisis fragmen DNA hasil RT-PCR*

Hasil amplifikasi dimurnikan dari gel menggunakan kit *QIAquick Gel Extraction* dari QIAGEN dan diseku. Sekuen DNA yang diperoleh dianalisis menggunakan BLASTn untuk mengetahui homologinya dengan gen yang sama, kemudian diligasi pada vektor pGEM-T Easy (Promega). Hasil ligasi diintroduksi ke *E. coli* kompeten sesuai prosedur yang direkomendasikan dalam kit. Seleksi sel transforman dilakukan pada medium padat LB yang mengandung 50 mg/L kanamisin dan 40 mg/L X-Gal. Analisis adanya fragmen terklon pada koloni putih dilakukan dengan PCR menggunakan primer spesifik yang sama dengan yang digunakan dalam RT-PCR. Plasmid rekombinan diisolasi dari koloni positif menggunakan kit *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN), didigesti dengan enzim restriksi *EcoRI* dan diseku. Sekuen DNA dianalisis kembali homologinya dengan gen yang sama menggunakan BLASTn untuk mengkonfirmasi kembali bahwa fragmen DNA terklon adalah

bagian dari gen *KASII*. Analisis juga dilakukan untuk mendeteksi apakah terdapat perbedaan urutan basa pada sekuen DNA dari kedua tipe kelapa sawit.

### **Hasil dan Pembahasan**

#### *Susunan nukleotida dan posisi primer spesifik KASII*

Sekuen gen *KASII* dari kelapa sawit yang diperoleh dari *GenBank* dijadikan masukan sekuen untuk merancang primer spesifik dengan program Primer3. Luaran dari Primer3 yang menunjukkan posisi primer yang direkomendasikan disajikan pada Gambar 1. Berdasarkan luaran Primer3, susunan nukleotida primer yang digunakan adalah KASII-F: 5'ACTACGAGAAGGCAGCGAAG 3' dengan Tm (titik leleh) 59,78 °C untuk primer *forward*, dan KASII-R: 5'GCAAATGGAACACAA AATGG 3' dengan Tm 58,87°C untuk primer *reverse*. Pasangan primer tersebut selanjutnya digunakan dalam reaksi RT-PCR pada tahap berikutnya untuk mengamplifikasi fragmen gen *KASII*. Sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 1, ukuran ampikon yang diharapkan adalah 527 bp. Untuk memperoleh primer dengan spesifitas yang tinggi terhadap fragmen cDNA yang akan diampifikasi, dalam merancang primer telah dipertimbangkan beberapa hal yang merupakan ketentuan dalam perancangan primer yang baik di antaranya adalah panjang primer antara 18-28 nukleotida, kandungan basa guanin dan sitosin (G+C) berkisar antara 50-60%, dan kedua primer memiliki titik leleh yang sebanding.

#### *Amplifikasi fragmen gen penyandi KAS II dengan RT-PCR*

Elektroforesis pada gel agarose menunjukkan bahwa RNA total hasil isolasi bebas dari kontaminasi DNA (Gambar 2A), sedangkan hasil pengukuran absorpsi menggunakan spektrofotometer menunjukkan bahwa konsentrasi dan kemurnian kedua sampel cukup memadai untuk analisis akumulasi transkrip dengan RT-PCR. Konsentrasi dan kemurnian RNA yang diperoleh, masing-masing adalah sebesar 740 ng/ $\mu$ L dan 1,457, untuk sampel Hibrida, serta 1000 ng/ $\mu$ L dan 1,938 untuk sampel Simalungun.

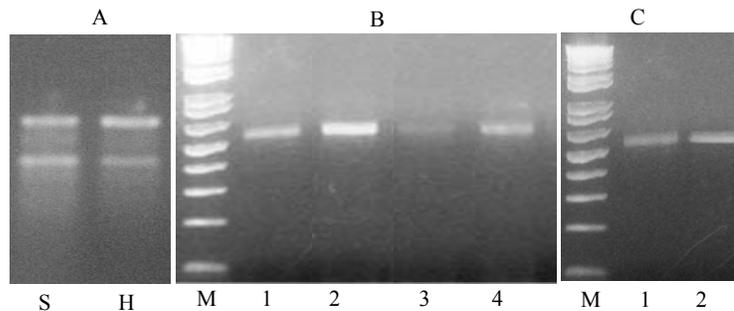
Gambar 2B menunjukkan hasil RT-PCR. Adanya satu fragmen DNA berukuran antara 500-600 bp sesuai dengan perkiraan produk amplifikasi menggunakan pasangan primer yang direkomendasikan dari luaran program primer3. Dari Gambar tersebut nampak bahwa suhu *annealing* dan konsentrasi MgCl<sub>2</sub> sangat berpengaruh terhadap intensitas hasil amplifikasi. Kondisi yang lebih baik diperoleh pada suhu *annealing* 58°C dengan konsentrasi MgCl<sub>2</sub> 2,5mM. Berdasarkan hasil tersebut, maka pada RT-PCR selanjutnya untuk amplifikasi fragmen *KASII* dari kedua tipe kelapa sawit, digunakan suhu *annealing* 58°C dan konsentrasi

```

301 gggatccagg ggctgatgag ctctgcctc gccttcgagc cctgcgcgga
    gttctacggc tctaagggcg cgtcggcttt cttcggagag agtggcttct
    ccctctttgg gacgtcgaag gcggagacta cgagaaggca gcaagggcc
    gcgcgcgcct cttgcgtctc gggcaaagca atggcagtag ctgtgcagcc
    tgctaaggaa attgcagaaa agaagagAAC ccatacaaaG aagaggagag
    tggctcgtgac agggatgggt gtggtgactc cactgggCGT tgatcctggT
    atcttttaca ataaccttct tgatgggtgc agtggTataa gtcaaattga
    aacatttgac tgtaccaact atccaacaag aattgcagga gaaattaaat
    ctttttcaac agatggattg gtggcaccta aattatctaa acgaatggac
    aaattcatgc tctatttact tattgctgga aagaaagcat tagccaatgg
    tggggttact gaagaggtca tgagtcagct tgacaaggca aaatgcggag
    tgctcatagg ctctgcgatg ggtggaatga aggtttttaa tgatgccatc
    gaagctttaa ggtctcata taagaagatg aatccatttt gtgtccatt
    tgcaacgaca
    
```

Gambar 1. Posisi primer yang paling direkomendasikan dari luaran program primer3 dan digunakan dalam RT-PCR (warna merah : primer KASII-F; warna biru: primer KASII-R)

Figure 1. Position of primers recommended by primer3 program and used in RT-PCR (Red:KASII-F primer; blue: KASII-R primer)



Gambar 2. (A) RNA total hasil isolasi dari mesokarp buah tipe Simalungun (S) dan Hibrida (H). (B) Hasil RT-PCR dari sampel Simalungun pada suhu *annealing* 58°C (lajur 1 dan 2) dan 56°C (3 dan 4) dengan konsentrasi MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM (1, 3) dan 5 mM (2,4); (C). Hasil RT-PCR pada suhu *annealing* 58°C dan konsentrasi MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM dari sampel Simalungun (lajur 1), dan sampel Hibrida (lajur 2). M: 1 kb plus DNA ladder

Figure 2. (A) Total RNA isolated from fruit mesocarp of Simalungun (S) and Hibrida (H). (B) RT-PCR product of Simalungun at *annealing* temperature 58°C (lanes 1 and 2) and 56 °C (lanes 3 and 4) with concentration of MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM (lanes 1 and 3) and 5.0 mM (lanes 2 and 4). (C) RT-PCR product at *annealing* temperature 58°C and MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM of Simalungun (lane 1) and Hibrida (lane 2). M: 1 kb plus DNA ladder.

MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM (Gambar 2C). Dari Gambar 2C nampak bahwa akumulasi transkrip *KASII* pada tipe Hibrida lebih tinggi dibandingkan dengan pada Simalungun. Perbedaan ini diduga terkait dengan perbedaan kandungan oleat pada kedua tipe kelapa sawit tersebut, yaitu pada Hibrida kandungan oleatnya 45,3%, lebih tinggi dibandingkan dengan pada Simalungun (38,5%).

#### Kloning produk RT-PCR

Hasil PCR koloni menunjukkan bahwa lima koloni dari 10 koloni hasil transformasi menggunakan produk RT-PCR dari tipe Simalungun mengandung sisipan DNA dengan ukuran yang lebih kurang sesuai dengan fragmen gen target. Demikian pula dengan PCR koloni hasil transformasi menggunakan produk RT-PCR dari tipe Hibrida (Gambar 3). Meskipun demikian terdapat variasi ukuran fragmen yang dihasilkan, misalnya

ukuran fragmen hasil PCR dari koloni nomor 6 sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan koloni nomor 7. Oleh karena itu untuk memastikan bahwa fragmen DNA terklon adalah fragmen gen *KASII*, perlu dilakukan analisis sekuen DNA. Untuk itu dilakukan isolasi plasmid rekombinan terhadap dua dari lima koloni yang teruji positif pada analisis PCR untuk masing-masing sampel. Gambar 4 menyajikan hasil isolasi plasmid dari sel-sel rekombinan yang mengandung fragmen hasil RT-PCR untuk Simalungun dan Hibrida, serta digestinya dengan enzim restriksi. Nampak bahwa digesti dengan *EcoRI* dari keempat plasmid rekombinan menghasilkan fragmen dengan ukuran yang sama dan sesuai dengan prediksi ukuran fragmen yang diinginkan. Berdasarkan ukuran fragmen produk PCR koloni maupun fragmen hasil digesti menggunakan *EcoRI*, maka hampir dapat dipastikan bahwa fragmen terklon adalah fragmen gen *KASII*.

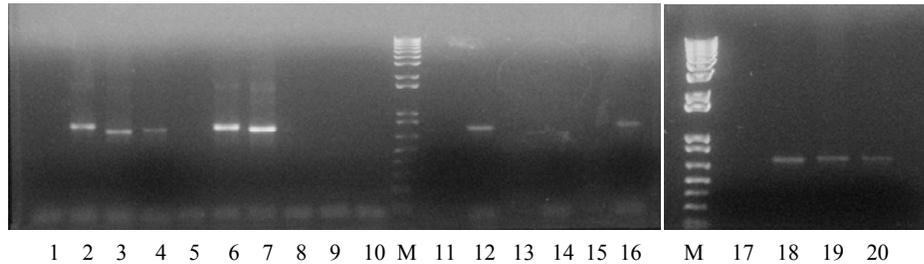
Konfirmasi untuk hal tersebut baru dapat diperoleh setelah sekuensing menggunakan templat plasmid rekombinan dilanjutkan dengan analisis sekuen DNANYa.

*Sekuensing dan analisis DNA fragmen terklon*

Sekuensing dua plasmid rekombinan yang diharapkan mengandung fragmen gen *KASII* asal Simalungun dan *KASII* asal Hibrida dilakukan dua arah, menggunakan primer M13F dan M13R. Hasil sekuensing kemudian dibersihkan dari kontaminan vektor menggunakan BLAST VecScreen. Penjajaran sekuen DNA hasil sekuensing menggunakan M13F dan M13R yang telah dibersihkan dari kontaminasi vektornya menghasilkan sekuen fragmen *KASII* sebagaimana disajikan pada Gambar 5 dan Gambar 7. Untuk memastikan bahwa fragmen DNA tersebut

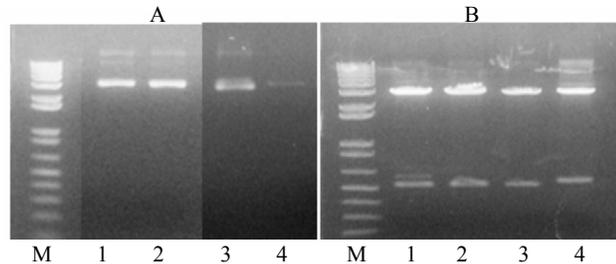
adalah fragmen gen *KASII* dilakukan analisis BLASTn. Hasil analisis BLASTn masing-masing sekuen mengkonfirmasi kembali bahwa fragmen produk RT-PCR dari Simalungun dan Hibrida yang telah diklon pada *E. coli* adalah fragmen gen *KASII* sebagaimana ditunjukkan oleh *E-value* dan *Max Score* untuk sekuen tersebut (Gambar 6 & 8).

Untuk mendeteksi ada tidaknya perbedaan sekuen antara Simalungun dan Hibrida, sekuen DNA kedua tipe kelapa sawit dijajarkan dan dianalisis menggunakan program *BLAST2seq alignment*. Hasil analisis menunjukkan adanya perbedaan antara kedua sekuen pada empat nukleotida. Pada Simalungun nukleotida ke-91 adalah 'G', ke-103 adalah 'C', ke-115 adalah 'A' dan nukleotida ke-148 adalah 'C', sedangkan pada Hibrida masing-masing berturut-turut adalah 'A', 'G', 'G' dan 'T' (Gambar 9).



Gambar 3. Profil elektroforesis hasil PCR koloni rekombinan hasil transformasi *E. coli* menggunakan konstruk pGEM-T/*KASII*. (1-10 : Simalungun; 11-20 : Hibrida) menggunakan primer M13.

Figure 3. Electrophoretic profile of PCR using M13 primer pair of recombinant colonies produced from *E. coli* transformed with pGEM-T/*KASII* construct. (1-10 : Simalungun; 11-20 : Hibrida)



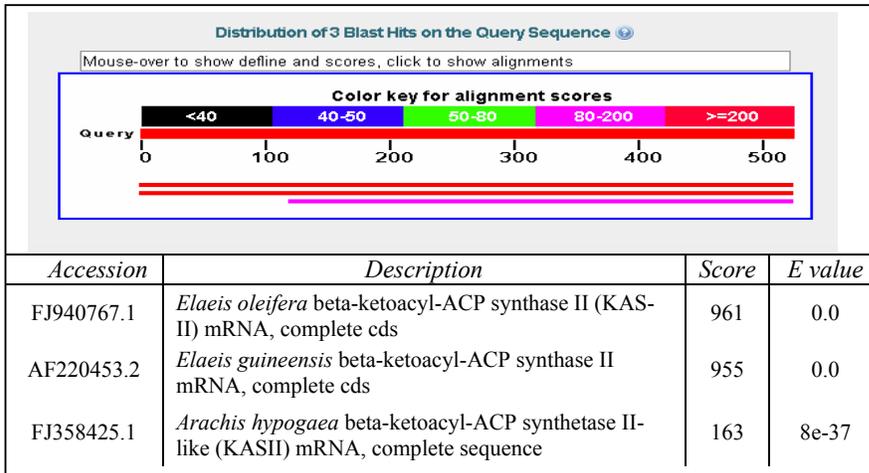
Gambar 4. (A) Profil elektroforesis hasil isolasi plasmid rekombinan, dan (B) digestinya dengan *EcoRI* (lajur 1 & 2 : Simalungun; lajur 3 & 4 : Hibrida)

Figure 4. (A) Electrophoretic profile of isolated recombinant plasmid, and (B) its digestion using *EcoRI* (lanes 1 & 2: Simalungun; lanes 3 & 4: Hibrida)

```

CTACGAGAAGGCAGCGAAGGGCCGCGCGCCTCTTGCCTCTCGGGCAAAGCAATGGCAG
TAGCTGTGCAGCCTGCTAAGGAAATTGCAGGAAAGAAGAGAACCATACAAAGAAGAGGA
GAGTGGTTCGTGACAGGGATGGGTGTGGCGACTCCACTGGGCGTTGATCCTGATATCTTCT
ACAATAACCTTCTTGATGGTGTGAGTGGTATAAGTCAAATTGAAACATTTGACTGTACCA
ACTATCCAACAAGAATTGCAGGAGAAATTAATCTTTTCAACAGATGGATTGGTGGCAC
CTAAATTATCTAAACGAATGGACAAATTCATGCTCTATTTACTTATTGCTGGAAAGAAAG
CATTAGCCAATGGTGGGGTTACTGAAGAGGTCATGAGTCAGCTTGACAAGGCAAAATGCG
GAGTGCTCATAGGCTCTGCGATGGGTGGAATGAAGGTTTTTAATGATGCCATCGAAGCTT
TAAGGGTCTCATATAAGAAGATGAATCCATTTTGTGTTCCATTTGC
    
```

Gambar 5. Susunan DNA produk RT-PCR dari tipe Simalungun (S) terklon  
 Figure 5. DNA sequence of the cloned RT-PCR product of Simalungun (S)



Gambar 6. Hasil analisis BLASTn dari sekuen DNA produk RT-PCR terklon asal Simalungun.  
 Figure 6. Result of BLASTn analysis of the DNA sequence of cloned RT-PCR product from Simalungun.

```

CTACGAGAAGGCAGCGAAGGGCCGCGCGCCTCTTGCCTCTCGGGCAAAGCAATGGCAG
TAGCTGTGCAGCCTGCTAAGGAAATTGCAGAAAAGAAGAGAAGCCATACAAAGAGGAGGA
GAGTGGTTCGTGACAGGGATGGGTGTGGTACTCCACTGGGCGTTGATCCTGATATCTTCT
ACAATAACCTTCTTGATGGTGTGAGTGGTATAAGTCAAATTGAAACATTTGACTGTACCA
ACTATCCAACAAGAATTGCAGGAGAAATTAATCTTTTCAACAGATGGATTGGTGGCAC
CTAAATTATCTAAACGAATGGACAAATTCATGCTCTATTTACTTATTGCTGGAAAGAAAG
CATTAGCCAATGGTGGGGTTACTGAAGAGGTCATGAGTCAGCTTGACAAGGCAAAATGCG
GAGTGCTCATAGGCTCTGCGATGGGTGGAATGAAGGTTTTTAATGATGCCATCGAAGCTT
TAAGGGTCTCATATAAGAAGATGAATCCATTTTGTGTTCCATTTGC
    
```

Gambar 7. Susunan DNA produk RT-PCR dari tipe Hibrida (H) terklon  
 Figure 7. DNA sequence of the cloned RT-PCR product of Hibrida (H)



### Kesimpulan dan Saran

Pasangan primer spesifik untuk *KASII* telah dirancang dan digunakan untuk amplifikasi fragmen gen *KASII*. Dengan pendekatan RT-PCR, fragmen DNA *KAS II* telah berhasil diisolasi dari mesokarp kelapa sawit tipe Simalungun dan Hibrida dan telah diklon dalam *E.coli* serta terkonfirmasi sekuennya sebagai bagian dari daerah penyandi *KASII*. Terdapat perbedaan antara kedua sekuen DNA dari kedua tipe kelapa sawit tersebut, yaitu pada posisi nukleotida ke-91, ke-103, ke-115, dan ke-148.

### Daftar Pustaka

- Asmono D (2006). Penelitian dan pengembangan teknologi genomik dan rekayasa genetika kelapa sawit: status saat ini dan permasalahannya. *Dalam: Penyusunan Agenda Riset Penguatan Industri Hulu Kelapa Sawit Bogor*, 20 April 2006. Kementerian Negara Riset dan Teknologi RI dan Masyarakat Perkelapasawitan Indonesia. p. 7.
- 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.
- Cheah S C, R Sambanthamurthi, A Siti Nor Akmar, O Abrizah, MAA Manaf, R Umi Salamah & G K A Parveez (1995). Toward genetic engineering of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) *In: JC Kader & P Mazliak (eds.). Plant Lipid Metabolism*. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. p.570-572.
- Kinney A J (1996). Development of genetically engineered soybean oils for food applications. *J Food Lipids* 3, 273-292.
- Lin S W (2002). Palm oil. *In:FD Gunstone (ed.) Vegetable Oils in Food Technology Composition, Properties and Uses*. USA, CRC Press p. 81.
- Madon M, I Maizura, R Singh & GKA Parveez (2005) Oil Palm improvement : MPOB's experience. *In: Proc. PIPOC 2005*. Petaling Jaya, 25-29 Sept. 2005.
- Singh S, A Green, P Stoutjesdijk & Q Liu (2000). Inverted repeat DNA: a new gene silencing tool for seed lipid modification. *Biochem Soc Trans* 28, 925-927.
- Thelen J J & Ohlrogge (2002). Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants. *Metabolic Engin* 4, 12-21.