Menara Perkebunan, 2006, 74(1), 33-43

Aktivitas ACCase mesokarp kelapa sawit dan kloning fragmen gen penyandi ACCase subunit biotin karboksilase

ACCase activity of oil palm mesocarp and cloning of gene fragment encoding biotin carboxylase subunit of ACCase

Asmini BUDIANI [1], Djoko SANTOSO[1], Hajrial ASWIDINNOOR[2] & Antonius SUWANTO[3]

[1] Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia
[2] Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia
[3]Jurusan Biologi - Fakultas MIPA, IPB, Indonesia

Summary

Genetic engineering to produce high yielding oil palm might be done by over expressing gene encoding key enzyme for oil biosynthesis in the oil palm mesocarp, one of which is ACCase. The objective of this research was to analyze ACCase activity of mesocarp from several developmental stages of fruit and to clone conserved region cDNA of gene encoding biotin carboxylase subunit of ACCase (BC-htACCase) from oil palm mesocarp. Activity of ACCase was analyzed by HPLC. Amplification of cDNA was done by means of reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) using degenerate heterologous primer on several annealing temperature and $MgCl_2$ *concentration. The cDNA fragment of RT-PCR product was cloned, sequenced and analyzed to confirm that the cloned cDNA was conserved region of BC-htACCase. The result showed that ACCase activity increased from the 14 week to the 20 week-old fruit, and then decreased. Using heterologous degenerate primers, cDNA fragments of BC-htACCase conserved region (469 bp) can be specifically amplified at 60* ^oC *annealing temperature with 2 mM* $MgCl_2$ *concentration. The result of BlastX analysis showed that the sequence of cloned cDNA fragment was highly homologous with the conserved region of BC-htACCase from* Glycine max, Arabidopsis thaliana, Nicotiana tabacum, *and* Brassica napus *with 243, 237, 236, 231 bit score, and* E. value *2e-63, 1e-61, 2e-61 and 5e-60, respectively.*

[*Keywords* **:** ACCase, biotin carboxylase, oil palm, RT-PCR].

Ringkasan

Rekayasa genetika untuk menghasilkan bibit kelapa sawit berdaya hasil tinggi dapat ditempuh dengan meningkatkan ekspresi gen penyandi enzim kunci biosintesis minyak pada kelapa sawit, salah satunya adalah ACCase. Tujuan penelitian ini adalah menguji aktivitas ACCase mesokarp beberapa tahap perkem-bangan buah sawit dan mengklon fragmen cDNA daerah konservatif gen penyandi ACCase heteromerik subunit biotin karbok-silase (BC-htACCase) dari mesokarp buah sawit. Aktivitas ACCase dianalisis dengan HPLC. Amplifikasi cDNA dilakukan dengan teknik RT-PCR menggunakan primer *degene-rate heterologus* pada berbagai suhu penempelan dan konsentrasi $MgCl_2$. Fragmen cDNA hasil RT-PCR diklon, disekuen dan dianalisis untuk mengkonfirmasi bahwa cDNA terklon adalah daerah konservatif BC-htACCase. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas ACCase meningkat dari buah berumur 14 minggu hingga buah berumur 20 minggu, kemudian menurun kembali Dengan primer *degenerate heterologus*, fragmen cDNA daerah konservatif BC-htACCase (469 pb) dapat diamplifikasi secara spesifik pada suhu penempelan 60 ^{o}C dan konsentrasi $MgCl_2$ 2 mM. Hasil analisis BlastX dari sekuen DNA fragmen terklon menunjukkan bahwa sekuen tersebut mempunyai homologi tinggi antara lain dengan gen penyandi BC-htACCase dari *Glycine max*, *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* dan *Brassica napus*, masing-masing dengan skor 243, 237, 236, 231 bit, dan *E. value* 2e-63, 1e-61, 2e-61 dan 5e-60.

Pendahuluan

Peningkatan produksi melalui penyediaan bibit unggul berdaya hasil tinggi merupakan salah satu upaya strategis yang terus dilakukan untuk memenuhi kebutuhan minyak sawit yang semakin meningkat dari tahun ke tahun (Asmono *et al*., 1999). Secara konvensional usaha tersebut terkendala sempitnya keragaman genetik dan lamanya siklus pemuliaan kelapa sawit. Salah satu pendekatan alternatif yang dapat ditempuh untuk membantu mengatasi masalah tersebut adalah rekayasa metabolisme biosintesis minyak melalui peningkatan ekspresi gen-gen kunci biosintesis minyak. Untuk tujuan tersebut diperlukan ketersediaan gen-gen yang terlibat dalam biosintesis minyak dan pemahaman mengenai regulasi ekspresinya.

Biosintesis minyak/triasilgliserol merupakan proses multikompartemen yang secara garis besar dibagi ke dalam tiga tahapan, yaitu (1) biosintesis malonil-CoA dari asetil-CoA, (2) biosintesis asam lemak menggunakan asetil-CoA dan malonil-CoA sebagai prekursor, dan (3) biosintesis triasilgliserol melalui lintasan Kennedy. Biosintesis malonil-CoA dari asetil-CoA dikatalisis oleh enzim asetil-CoA karboksilase (ACCase). Pada tanaman reaksi tersebut dijumpai baik pada plastid maupun pada sitosol. Malonil-CoA pada plastid diperlukan untuk pembentukan asam lemak, sedangkan malonil-CoA dalam sitosol digunakan untuk pemanjangan rantai karbon asam lemak dan untuk sintesis senyawa lain seperti flavonoid (Choi *et al*., 1995).

Dua bentuk ACCase yang berbeda secara fisik telah diidentifikasi pada tanaman, yaitu ACCase homomerik (hm-ACCase) dan ACCase heteromerik (ht-AC Case) (Li & Cronan 1992; Sasaki *et al.,* 1993, 1995; Alban *et al*., 1994; Shorrosh *et al*., 1994, 1995). Ketiga domain (BCCP, BC dan CT) dari ht-ACCase merupakan protein yang dapat dipisahkan, sedangkan pada hm-ACCase ketiga domain terdapat dalam satu polipeptida. Ht-ACCase juga ditemukan pada bakteri (Li & Cronan, 1992), sedangkan hm-ACCase juga terdapat pada sitosol fungi (Haβlacher *et al*., 1993) dan hewan (Takai *et al*., 1988).

Berbagai hasil penelitian menunjukkan adanya korelasi antara aktivitas ACCase dengan kecepatan sintesis asam lemak maupun dengan akumulasi minyak (Jin *et al*., 1998; Francki *et al*., 2002). Pada tanaman *barley*, jagung dan tembakau, ACCase terbukti merupakan enzim pengendali utama arus metabolit pada alur biosintesis lemak (Page *et al*., 1994; Shintani & Ohlrogge 1995). Gen penyandi BC, BCCP dan CT dari ht-ACCase juga telah diklon dari berbagai tanaman, di antaranya dari *Arabidopsis thaliana* (Choi *et al*., 1995), *B. napus* (Schulte *et al.,* 1994, 1997), jagung (Ashton *et al*., 1994) dan tembakau (Shorrosh *et al*., 1995). Demikian juga gen penyandi hm-ACCase (Egli *et al.,* 1993, Shorrosh *et al.* 1994, Anderson *et al*., 1995). Namun sejauh ini belum ada publikasi mengenai ACCase dari kelapa sawit. Studi mengenai ACCase dan kloning gen penyandinya dari kelapa sawit diharapkan akan dapat membantu usaha peningkatan rendemen dan kualitas minyak sawit. Sebagai langkah awal dari usaha rekayasa metabolisme untuk meningkatkan rendemen minyak, penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pola aktivitas ACCase pada mesokarp berbagai umur buah sawit dan mengklon fragmen gen penyandi ht-ACCase subunit BC dari mesokarp kelapa sawit.

Bahan dan Metode

Mesokarp buah sawit

Mesokarp buah sawit yang digunakan diambil dari buah sawit tipe Tenera. Buah sawit dikupas kulitnya kemudian mesokarp dipotong-potong dan disimpan pada suhu -80 ^{o}C sampai digunakan.

Analisis aktivitas ACCase dari mesokarp berbagai tahapan perkembangan buah

Untuk analisis aktivitas ACCase, digunakan mesokarp dari berbagai tingkat perkembangan buah, yaitu mulai dari buah muda berumur 14 minggu yang kandungan minyaknya 0,23% hingga buah masak berumur 24 minggu dengan kandungan minyak 56,62 %. Mesokarp dari setiap tahap perkembangan buah dianalisis minyak dan proteinnya dengan cara seperti yang telah dilaporkan sebelumnya (Budiani *et al.*, 2002).

Aktivitas ACCase dari ekstrak protein mesokarp buah sawit ditentukan menggunakan HPLC (*High Performance liquid Chromatography*) dengan mengukur kecepatan penurunan konsentrasi asetil-CoA dan peningkatan malonil-CoA (Levert *et al.,* 2002). Satu unit aktivitas ACCase (U) didefinisikan sebagai peningkatan konsentrasi malonil CoA per menit oleh penambahan 1 µL ekstrak enzim. Ekstrak protein dipreinkubasi pada suhu 25 ^{0}C selama 30 menit dengan 2 mg/L bovin serum albumin dan 10 mM potassium sitrat. Reaksi dimulai dengan mentransfer 50 µL ekstrak yang telah diinkubasi ke dalam campuran reaksi (50 µM Tris, pH 7,5, 6 µM asetil-CoA, 2 mM ATP, 7 mM $KHCO_3$, 8 mM $MgCl_2$, 1 mM ditiotreitol dan 1 mg/mL bovin serum albumin) hingga volume total 200 µL, kemudian diinkubasi selama 5-20 menit pada suhu 25^{0}C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 50 µL 10% asam perklorat, kemudian disentrifus pada 10.000 g selama tiga menit. Supernatan digunakan untuk analisis HPLC. Fase mobil yang digunakan adalah 10 mM KH_2PO_4, pH 6,7 (solven A) dan MeOH (solven B). Untuk mendapatkan kondisi pemisahan asetil-CoA dari malonil-CoA dilakukan optimasi kondisi HPLC yang meliputi kecepatan alir (*flow rate*) dan gradien fase mobil.

Isolasi RNA dari mesokarp buah sawit

RNA total diisolasi dari jaringan mesokarp dengan metode Chang *et al.,* (1993) yang dimodifikasi, menggunakan bufer yang mengandung CTAB sebagaimana dilaporkan sebelumnya (Budiani *et al.*, 2004). Pada tahap akhir isolasi, RNA dimurnikan dari kontaminan DNA dengan menambahkan 0,1 volume LiCl 8M ke dalam RNA total, kemudian campuran diinkubasi di es selama dua jam, dilanjutkan sentrifugasi 30 menit pada 13.000 rpm, dengan suhu 4^{o}C. Pelet dilarutkan dalam 200 µL *DEPC – treated water,* ditambah 0,1 volume Na-asetat 3M dan 2 volume etanol absolut, kemudian didinginkan pada suhu –20 ^{o}C selama 30 menit. Setelah sentrifugasi, pelet 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 dan 280 nm.

Amplifikasi cDNA daerah konservatif BC-htACCase *dengan RT-PCR*

Untuk mengamplifikasi fragmen cDNA daerah konservatif *BC-htACCase*, dirancang primer *heterologus degenerate* berdasarkan hasil translasi balik polipeptida yang memiliki homologi dengan *BC-htACCase* (Budiani *et al.*, 2002) dikombinasikan dengan hasil penjajaran sekuen gen yang sama dari tanaman lain. Perancangan primer dilakukan menggunakan program Primer3 (http://www.bio tools.umassmed.edu/). Sebagai input sekuen digunakan gen yang sama dari tanaman *B. napus.* Output primer yang diperoleh kemudian dicocokkan kembali dengan hasil penjajaran sekuen gen yang sama dari berbagai tanaman lain, sehingga diperoleh pasangan primer *degenerate* BC-F (5'-GAAGCACCWTCYCCTGCM YT-3') dan BC-R (5'-CKHGTTGGRGC CCAYACRAT-3'). Amplifikasi daerah konservatif *BC-htACCase* dilakukan dengan *Reverse Transcryptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Sintesis utas pertama cDNA dilakukan menggunakan kit *Superscript First Strand cDNA Synthesis* dengan primer heksamer acak (Invitrogen) dan templat RNA total. Selanjutnya cDNA utas pertama digunakan sebagai cetakan untuk amplifikasi fragmen daerah konservatif *BC-htACCase*, menggunakan pasangan primer BC-F dan BC-R. Reaksi PCR dilakukan dengan program sebagai berikut: satu siklus denaturasi awal pada suhu 94^{o}C selama dua menit, 35 siklus masing-masing terdiri dari denaturasi pada suhu 94^{o}C selama 15 detik, penempelan primer pada suhu 50^{o}C – 60^{o}C selama 45 detik, dan ekstensi pada suhu 70^{o}C selama dua menit. Selanjutnya reaksi diakhiri dengan ekstensi pada suhu 70^{o}C selama empat menit. Untuk mendapatkan hasil amplifikasi yang terbaik, selain variasi suhu penempelan, PCR juga dilakukan pada beberapa konsentrasi $MgCl_2$, yaitu 1,5, 2,0, dan 3,0 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 diligasikan pada vektor pCR2.1-TOPO (Invitrogen) kemudian diklon ke dalam *E. coli* kompeten sesuai prosedur yang tersedia dalam buku petunjuk. 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 BC-F dan BC-R. Plasmid rekombinan diisolasi dari koloni positif menggunakan kit *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN), didigesti dengan enzim restriksi *Eco*RI dan disekuen. Sekuen DNA yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan Blast (http:// www.ncbi.nlm.nih.gov) untuk mengetahui homologinya dengan *BC-htACCase*.

Hasil dan Pembahasan

Aktivitas ACCase mesokarp berbagai tahap perkembangan buah

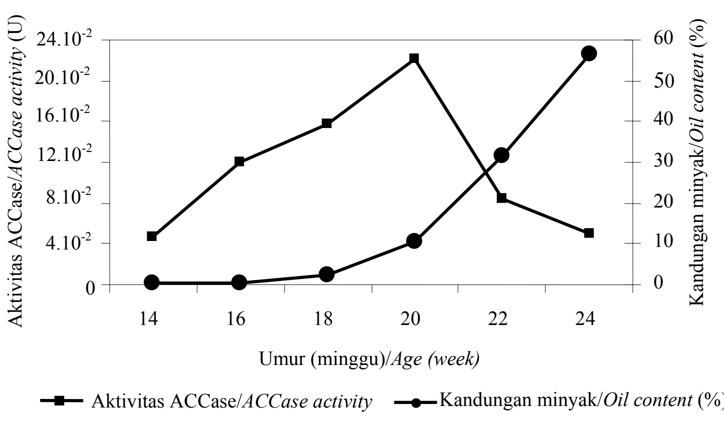
Aktivitas ACCase meningkat mulai buah berumur 14 minggu hingga 20 minggu, yaitu dari 4,7 x 10^{-2} unit hingga 22 x 10^{-2} unit, kemudian menurun kembali pada buah berumur 22 minggu dan 24 minggu, meskipun rendemen minyak pada tahap tersebut masih terus meningkat (Gambar 1). Aktivitas ACCase tertinggi terjadi pada awal fase logaritmik dari pola peningkatan rendemen minyak. Hal ini menunjukkan tingginya kebutuhan akan ACCase untuk sintesis asam lemak yang digunakan baik dalam sintesis minyak maupun untuk membran.

Adanya korelasi antara kecepatan akumulasi minyak dengan aktivitas ACCase telah dilaporkan pada biji kedelai (Jin *et al*., 1998) dan spesies Lupin (Francki *et al*., 2002). Hasil penelitian Jin *et al.* (1998) menunjukkan adanya hubungan yang sangat dekat antara kecepatan akumulasi minyak dan aktivitas ACCase pada biji kedelai yang sedang berkembang dari berbagai varietas dengan kandungan minyak yang berbeda. Sejalan dengan hasil penelitian tersebut, *Lupinus mutabilis* yang kandungan minyaknya 16% ternyata mempunyai aktivitas ACCase dua kali lebih tinggi dibandingkan dengan *L. angustifolius* (Francki *et al.,* 2002). Dengan demikian ACCase merupakan target yang baik untuk rekayasa genetika dalam pengembangan varietas dengan kandungan minyak tinggi.

Sebagian besar asam lemak digunakan untuk sintesis membran sel dan lemak/minyak tersimpan. Oleh karena itu pola aktivitas ACCase untuk suatu tanaman bersifat spesifik, tergantung kebutuhan asam lemaknya. Pola aktivitas ACCase yang dihasilkan pada penelitian ini menunjukkan bahwa pada mesokarp buah sawit, ACCase mempunyai peran kunci dalam regulasi akumulasi triasilgliserol atau minyak. Oleh karena itu langkah berikutnya yang perlu dilakukan adalah mempelajari regulasi ekspresi dan mengklon gen-gen yang menyandinya.

Amplifikasi DNA daerah konservatif BC-htACCase *dengan RT-PCR*

Gambar 2 menunjukkan hasil RT-PCR untuk amplifikasi fragmen *BC-htACCase* menggunakan pasangan primer BC-F dan BC-R pada berbagai suhu penempelan dan konsentrasi $MgCl_2$.

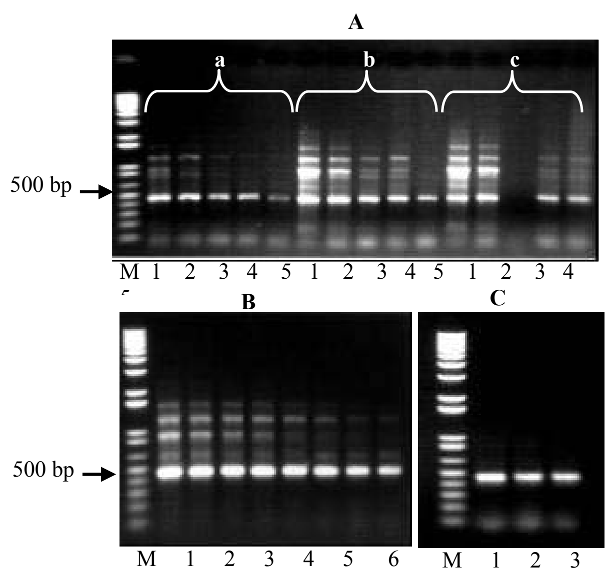


Gambar 1. Pola aktivitas ACCase dan rendemen minyak mesokarp berbagai umur buah sawit.

Figure 1. Pattern of ACCase activity and oil content of several oil palm fruit ages.

Nampak bahwa suhu penempelan maupun konsentrasi $MgCl_2$ sangat berpengaruh terhadap intensitas dan spesifisitas hasil amplifikasi. Pada konsentrasi Mg Cl_2 yang sama, semakin tinggi suhu penempelan, intensitas fragmen DNA yang dihasilkan semakin rendah namun semakin spesifik. Sebaliknya pada suhu penempelan yang sama, semakin tinggi konsentrasi Mg semakin tinggi intensitas fragmen DNA hasil PCR, tetapi spesifisitasnya semakin rendah. Kondisi amplifikasi yang spesifik untuk fragmen daerah konservatif *BC-htACCase* berukuran sekitar 500 pb diperoleh pada suhu penempelan 60 ^{o}C dengan konsentrasi $MgCl_2$ 1,5 - 2 mM.

Amplifikasi suatu fragmen DNA dengan mesin PCR dipengaruhi oleh beberapa faktor, di antaranya adalah jumlah siklus amplifikasi, suhu penempelan, spesifisitas primer dan konsentrasi ion Mg. Tingginya spesifisitas primer yang berarti basa-basa dari primer saling komplemen dengan basa-basa dari kedua ujung fragmen DNA yang akan diamplifikasi merupakan penentu dapat tidaknya fragmen DNA target diamplifikasi. Dalam



Gambar 2. Hasil RT-PCR untuk fragmen BC-htACCase pada (A) berbagai suhu penempelan dan konsentrasi $MgCl_2$ (lajur 1-5 berturut-turut pada suhu 55, 57, 58, 59 dan 60 ^{0}C; a, b, c berturut-turut pada konsentrasi $MgCl_2$ 1,5; 2,0 dan 3,0 mM), (B) berbagai suhu penempelan (lajur 1-8 berturut-turut 50 – 58 ^{0}C) dengan konsentrasi $MgCl_2$ 1,5 mM dan (C) pada suhu 60 ^{0}C dengan konsentrasi $MgCl_2$ 2 mM. M = 1 kb plus DNA-ladder

Figure 2. RT-PCR product of BC-htACCase fragment (A) at several annealing temperatures and $MgCl_2$ concentrations (lanes 1-5 = 55, 57, 58, 59, and 60 ^{o}C respectively; a, b, c = 1.5; 2.0 and 3.0 mM *$MgCl_2$), (B), at different annealing temperatures (lanes 1-8 = 50 – 58 ^{0}C respectively);* (C) *at temperature 60 ^{o}C and Mg Cl_2 2.0 mM. M = 1 kb plus DNA-ladder*

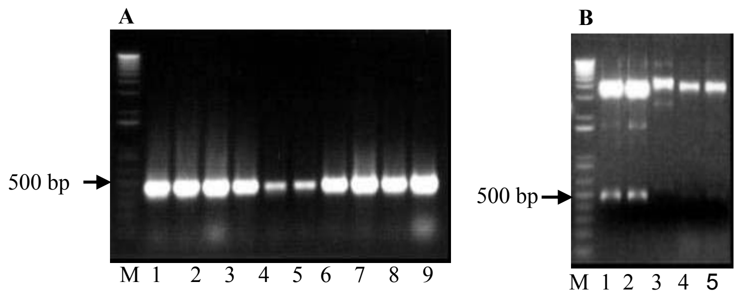
merancang primer terdapat beberapa ketentuan umum, di antaranya adalah panjang primer antara 18-28 nukleotida, tersusun oleh 50 – 60% G+C dan kedua primer mempunyai titik leleh yang sebanding (Innis & Gelfand, 1990). Pada percobaan ini digunakan primer *degenerate*, yang cara perancangannya didasarkan pada hasil penjajaran daerah konservatif gen penyandi BC-htACCase dari berbagai tanaman digabung dengan informasi polipeptida hasil sekuensing protein mesokarp buah sawit yang menunjukkan homologi dengan BC-htACCase. Dengan pendekatan ini, diharapkan dari beberapa oligonukleotida dalam primer yang digunakan (*degenerate*), ada oligonukleotida yang benar-benar komplemen dengan DNA target.

Proses penempelan primer dengan templat DNA atau RNA juga sangat dipengaruhi oleh suhu. Pedoman umum untuk suhu penempelan adalah 5^0C di bawah titik leleh (Tm) primer (Innis & Gelfand, 1990). Pada penggunaan primer *degenerate* optimasi suhu penempelan menjadi semakin penting, karena primer yang digunakan merupakan campuran beberapa oligonukleotida yang mempunyai susunan basa yang berbeda sehingga Tm-nya juga berbeda-beda. Oleh karenanya optimasi kondisi amplifikasi sangat diperlukan dengan mencoba berbagai suhu pada proses penempelan primer.

Hasil seleksi koloni transforman menunjukkan efisiensi transformasi yang tinggi sebagaimana ditunjukkan oleh banyaknya jumlah koloni putih yang tumbuh pada media seleksi (data tidak ditampilkan). Analisis PCR dari koloni putih hasil transformasi fragmen *BC-htACCase* yang telah dimurnikan dari gel menunjukkan bahwa kesepuluh koloni yang dianalisis mengandung sisipan DNA dengan ukuran seperti yang diinginkan (Gambar 3A). Hasil ini dikonfirmasi kembali melalui isolasi plasmid rekombinan dan digestinya dengan *Eco*RI. Elektroforesis hasil digesti plasmid rekombinan mengkonfirmasi hasil tersebut. Empat dari lima plasmid rekombinan (lajur 1, 2, 4 dan 5) yang diisolasi mengandung sisipan DNA yang sesuai ukurannya (Gambar 3B).

Hasil sekuensing DNA fragmen *BC-htACCase* terklon yang telah dimurnikan dari gel menunjukkan bahwa ukuran fragmen tersebut adalah 469 pb (Gambar 4). Baik hasil analisis BlastX maupun BlastN dari sekuen DNA membuktikan kebenaran fragmen terklon sebagai fragmen dari *BC-htACCase*. Hal ini ditunjukkan oleh tingginya homologi antara sekuen asam amino yang merupakan hasil translasi DNA terklon dengan sekuen asam amino subunit biotin karboksilase ACCase heteromerik dari beberapa tanaman lain, di antaranya adalah *G. max*, *A thaliana, N. tabacum*, dan *B. napus* masing-masing dengan skor 243, 237, 236, 231 bit, dan *E. value* 2e-63, 1e-61, 2e-61 dan 5e-60. (Tabel 1).

Hasil analisis BlastN juga menunjukkan homologi yang tinggi antara sekuen DNA terklon dengan gen BC-htACCase dari *G. max*, *B. napus*, *A. thaliana*, *N. tabacum, M. truncatula*, dan *R.. communis* masing-masing dengan skor 306, 191, 131, 127, 103 dan 70, serta *E-value* 3e-80, 1e-45, 1e-27, 2e-26, 3e-19 dan 5e-09 (data lengkap tidak disajikan). Suatu sikuen DNA dinilai memiliki homologi tinggi apabila memiliki *E-value* (nilai peluang) maksimal e-4 atau mencapai skor minimal 50 bits (Claverie & Notredame, 2003). Makin rendah *E-value* dan makin tinggi skor, makin signifikan dan makin tinggi homologi protein atau sekuen nukleotida yang dianalisis.



Gambar 3. (A) PCR koloni hasil transformasi fragmen DNA daerah konservatif gen BC-htACCase; (B) Hasil digesti plasmid rekombinan yang diisolasi dari koloni putih dengan *Eco*RI.

Figure 3. (A) Colony PCR of transformation product of conserved region BC-htACCase DNA fragment; (B) Digestion product of recombinant plasmid isolated from white colonies using EcoRI.

Tabel 1. Protein dan spesies tanaman asalnya hasil analisis BlastXyang menunjukkan homologi dengan fragmen DNA hasil RT-PCR terklon.

Table 1. Protein and plant species origin from BlastX analysis output showing homology with the cloned DNA fragment of RT-PCR result.

No. aksesi bank gen	Protein homolog	Spesies	Skor (bit)	*E-value*
gi|3219361|gb|AAC23573.1|	Biotin karboksilase prekursor	*Glycine max*	243	2e-63
gi |10178099| dbj |BAB11486.1|	Asetil-CoA karboksilase, subunit biotin karboksilase	*Arabidopsis thaliana*	237	1e-61
gi | 7438127 | pir | T02431|	Asetil-CoA Karboksilase, subunit biotin karboksilase	*Nicotiana tabacum*	236	2e-61
gi|14388188|gb|AAK60339. 1|	Biotin karboksilase	*Brassica napus*	231	5e-60
gi|67923410|ref|ZP00516889.1|	Asetil-CoA karboksilase, biotin karboksilase	*Crocosphaera watsonii WH8501*	187	8e-47
gi|16331500|ref|NP_442228. 1|	Biotin karboksilase	*Synechocystis sp. PCC 6803*	185	5e-46
gi|33635438|emb|CAE21763.1 |	Asetil-CoA karboksilase, subunit biotin karboksilase	*Prochlorococcus marinus* str. MIT 313	182	3e-45
gi|22299351|ref|NP_682598.1|	Biotin karboksilase	*Thermosynechococcus elongatus* BP-1	175	4e-43
gi|53764313|ref|ZP_00160077.2 |	Biotin karboksilase	*Anabaena variabilis*	174	7e-43
gi|71674004|ref|ZP_00671752.1 |	Asetil-CoA karboksilase, biotin karboksilase	*Trichodesmium erythraeum*	173	2e-42

GAAGCACCTTCTCCTGCCTTGACGCCTGAGCTACGGAAAGCTATGGGTGATGC
AGCTGTAGCTGCTGCTGCATCTATAGGTTACATTGGTGTTGGAACTGTGGAAT
TTCTCTTGGATGAAAGAGGTACCTTCTACTTCATGGAGATGAACACCAGGATT
CAGGTAGAGCACCCTGTCACTGAAATGATTTCTTCAACCGACTTGATTGAAGA
ACAAATTCGAGTTGCTCTTGGAGAGAGGCTGACATACAAGCAGGAAGACATT
GTTCTGAGAGGACATTCAATTGAATGCCGGATTAATGCAGAAGATGCCTTCAA
AGGATTTCGTCCAGGGCCTGGAAAGATYACATCATACTTGCCATCTGGAGGTC
CATTTGTGAGAATGGATAGTaCATGTTTATCCAGGCTATGTGGTTCCCCCAAGC
TATGACTCCTTGYTAGGAAAGCtTTATCGTATGGGCCCCAACAAG

Gambar 4. Susunan nukleotida fragmen BC-htACCase terklon (Kedua anak panah menunjukkan posisi primer BC-F dan BC-R).

Figure 4. Nucleotide sequence of the cloned BC-htACCase fragment (the two arrows indicated BC-F and BC-R primers position).

Keberhasilan rekayasa metabolisme minyak yang telah dilaporkan sampai saat ini lebih banyak ditujukan untuk mengubah kualitas minyak, seperti meningkatkan kandungan stearat, oleat, γ-linolenat, laurat dan lain sebagainya, dengan enzim target rekayasa antara lain stearoil-ACP Δ-9 desaturase, oleoil-Δ-12 dan Δ-6 desaturase, dan asil-ACP tioesterase (Thelen & Ohlrogge, 2002). Sedangkan laporan mengenai manipulasi genetik untuk peningkatan produksi minyak masih sangat terbatas. Kenaikan kandungan minyak dalam biji *B. Napus* sebesar 5% diperoleh setelah ditransformasi dengan suatu konstruk yang mengandung gen penyandi hm-ACCase, promoter napin dan gen transit peptida. Transfer konstruk tersebut memungkinkan import hm-ACCase ke dalam plastid sehingga aktivitas ACCase plastid meningkat (Roesler *et al*., 1997). Usaha meningkatkan level ACCase juga berhasil dilakukan hanya dengan mengover-ekspresikan *accD*, gen penyandi subunit β-CT pada tanaman tembakau. Promoter dari *accD* diganti dengan promoter NEP (*nuclear-encoded RNA polymerase*) dan promoter PEP (*plastid-encoded RNA polymerase*). Level ACCase plastid dan kandungan asam lemak dalam daun meningkat, tetapi kandungan asam lemak biji tidak berbeda dengan tipe liarnya. Di samping itu, transforman ternyata memproduksi biji dua kali lebih banyak, sehingga jumlah minyak biji yang dihasilkan pertanaman meningkat (Sasaki & Nagano, 2004).

Kesimpulan dan Saran

ACCase merupakan salah satu enzim kunci dalam akumulasi minyak pada mesokarp kelapa sawit. Fragmen DNA berukuran 469 pb telah diklon dari mesokarp buah kelapa sawit dan terkonfirmasi sekuennya sebagai bagian dari gen penyandi salah satu subunit heteromerik ACCase, yaitu biotin karboksilase. Berdasarkan sekuen tersebut disarankan untuk mengklon gen lengkapnya. Dengan telah diklonnya fragmen *BC-htACCase* dan diketahui sekuennya, peluang untuk melakukan penelitian berikutnya semakin terbuka. Selain untuk mendisain primer yang akan digunakan untuk meng-amplifikasi gen lengkap, informasi sekuen yang diperoleh dapat digunakan dalam studi regulasi ekspresi gen tersebut yang akan berguna dalam upaya perakitan bibit sawit berdaya hasil tinggi.

Daftar Pustaka

Alban, C., P. Baldet & R. Douce (1994). Localization and characterization of two structurally different forms of acetyl-CoA carboxylase in young pea leaves, of which one is sensitive to aryloxy-phenoxypro-prionate herbicides. *Biochem. J.,* **30**, 557-565.

Anderson, J.V., S.M. Lutz, B.G. Gengenbach & J.W. Gronwald (1995). Genomic sequence for a nuclear gene encoding acetyl- Coenzyme A carboxylase (Accession no. L42814) in soybean. *Plant Physiol.,* **109**, 338-340.

Ashton A.R., C.L. Jenkins & P.R. Whitfeld (1994). Molecular cloning of two different cDNAs for maize acetyl-CoA carboxy-lase. *Plant Mol. Biol.,* **24**, 35-49.

Asmono D., M. Ikhwan, E. Suprianto & K. Pamin (1999). Oil palm breeding in Indonesia toward 21st century: Achievement and prospect. *In. Proc. Seminar Towards Sustainable Agriculture in Humid Tropics Facing 21st Century* :. Bandar Lampung Indonesia, Sept 1999. p. 125 – 132.

Budiani, A., D. Santoso, H. Aswidinnoor, A. Suwanto & S. Sudiatso (2002). Isolation and characterization of protein differentially expressed during oil palm mesocarp development. *Menara Perkebunan*, **70**(1), 1-11.

Budiani, A., D. Santoso, H. Aswidinnoor, A. Suwanto & S. Sudiatso (2004). Kloning parsial gen penyandi enoil-ACP reduktase dari mesokarp buah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Menara Perkebunan*, **72**(1), 28-37.

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.

Choi, J-K, F. Yu, E.S. Wurtele & B.J. Nikolau (1995). Molecular cloning and charac-terrization of the cDNA coding for the biotin-containing subunit of the chloro-plastic acetyl-CoA carboxylase. *Plant Physiol* ., **109,** 619-626.

Claveri, J. & C. Notredame (2003). *Bioinfor-matics for Dummies*. New York, Wiley Publishing. p. 215-238.

Egli, M.A., B.G. Gengenbach, J.W. Gronwald, D.A. Somers & D.L. Wyse (1993). Characterization of maize acetyl-coenzyme A carboxylase. *Plant Physiol.,* **101,** 499-506.

Francki, M.G., P. Whitaker, P.M. Smith & C.A. Atkins (2002). Differential expression of a novel gene during seed triacylglycerol accumulation in lupin species (*Lupinus angustifolius* L. and *L. mutabilis* L.). *Functional & Intregative Genomics,* **26,** 292-300.

Haβlacher M., A.S. Ivessa, F. Paltauf & S.D. Kohlwein (1993). Acetyl-CoA Carboxylase from yeast is essential enzyme and is regulated by factors that control phospholipid metabolism. *J. Biol. Chem*., 268, 10946 –10952.

Innis, M. A. & D. H. Gelfand (1990). Optimization of PCR. *In* Innis, MA, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White. (eds) *PCR Protocols a Guide to Methods and Application*. London, Academic Press, Inc. p. 3-11

Jin, E.S., J.H. Orf & J.W. Gronwald (1998). *Oil accumulation and acetyl-CoA carboxylase activity in developing soybean seed.* TEKTRAN US Dept of Agriculture, Agricultural Research Service.

Levert K L, Grover L Waldrop & Jacqueline M Stephens (2002). A biotin analog inhibits acetyl-CoA carboxylase activity and adipogenesis. *J. Biol. Chem.,* **277**, 16347-16350.

Li, S-J & Je. Jr. Cronan (1992). The gene encoding the biotin carboxylase subunit of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.,* **267**, 855-863.

Page, R.A., S. Okada & J.L. Harwood (1994). Acetyl-CoA carboxylase exerts strong flux control over lipid synthesis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta,* **1210,** 369-372.

Roesler, K., D. Shintani, L. Savage, S. Boddupali & J. Ohlrogge (1997). Targeting of the *Arabidopsis* homomeric acetyl-coenzyme A carboxylase to plastid of rapeseed. *Plant Physiol.,* **113,** 75-81.

Sasaki, Y., K. Hakamada, Y. Suama, Y. Nagano, I. Furusawa & R.Matsuno (1993). Chloroplast-encoded protein as a subunit of acetyl-CoA carboxylase in pea plant. *J. Biol. Chem.,* **268,** 25118-25123.

Sasaki, Y., T. Konishi & Y. Nagano (1995). The compartementation of acetyl-coenzyme A carboxylase in plants. *Plant Physiol.,* **108,** 445-449.

Sasaki, Y., & Y. Nagano (2004). Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* **68,** 1175-1184.

Schulte, W., J. Schell & R. Topfer (1994). A gene encoding acetyl-coenzyme A carboxylase from *Brassica napus. Plant Physiol.,* **106,** 793-794.

Schulte, W., R. Topfer, R. Srracke, J. Schell & N. Martini (1997). Multi-fuctional acetyl-CoA carboxylase from *Brassica napus* is encoded by multi-gene family : indication for plastidic localization of at least one isoform. *In Proc. Natl. acad Sci.,* **94,** 3465-3470.

Shintani, D.K. & J.B. Ohlrogge (1995). Feedback inhibition of fatty acid synthesis in tobacco suspension cells. *Plant J,.* **7,** 577-578.

Shorrosh, B.S., R.A. Dixon & J.B. Ohlrogge (1994). Molecular cloning, characterization and elicitation of acetyl-CoA carboxylase from alfalfa. *In Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91,** 4323-4327.

Shorrosh, B.S., K.R. Roesler, D. Shintani, F.J. van de Loo & J.B. Ohlrogge (1995). Structural analysis, plastid localization and expression of the biotin carboxylase subunit of acetyl-coenzyme A carboxylase from tobacco. *Plant Physiol.,* **108,** 805 – 812.

Takai, T., C. Yokoyama, K. Wada & T. Tanabe (1988). Primary structure of chicken liver acetyl-CoA carboxylase deduced from cDNA sequence. *J. Biol. Chem.,* **263**, 2651 – 2657.

Thelen, J.J. & JB Ohlrogge (2002). Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants. *Metabolic Engin.,* **4,** 12-21.