

KARAKTERISASI GEN β KETOACYL-ACP SYNTHASE II (KAS II) PADA *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, DAN HIBRIDA INTERSPESIFIK

CHARACTERIZATION OF GENE β KETOACYL-ACP SYNTHASE II (KAS II) ON *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, AND INTERSPECIFIC HYBRID

Heri Adriwan Siregar, Sri Wening, dan A. Razak Purba

Abstrak. Kelapa sawit (*Elaeis guineensis*) saat ini merupakan tanaman penghasil minyak tertinggi di dunia. *Elaeis oleifera* adalah spesies kelapa sawit lainnya yang kurang begitu dibudidayakan karena berproduksi lebih rendah. Komposisi minyak *E. guineensis* memiliki rasio asam lemak jenuh dan tak jenuh seimbang, sedangkan *E. oleifera* memiliki asam lemak tak jenuh yang lebih tinggi. Dalam aspek kesehatan, asam lemak jenuh rantai panjang diketahui lebih berbahaya dibandingkan asam lemak tak jenuh. Perbedaan komposisi asam lemak keduanya dipelajari melalui variasi genetik yang menyandikan enzim β -ketoacyl ACP synthase II (KAS II, EC 2.3.1.179) yang berperan penting dalam biosintesis asam lemak tak jenuh. Asam lemak dan gen KAS II diamati pada dua hibrida (*E. guineensis* x *E. oleifera*), varietas Lame, Langkat, dan CMR78 mewakili *E. guineensis* serta origin Suriname mewakili *E. oleifera*. Hasil penelitian menunjukkan *E. oleifera* Suriname memiliki konsentrasi asam lemak oleat yang paling tinggi, lalu diikuti oleh CMR78. Penjajaran sekuen gen KAS II menunjukkan beberapa variasi genetik pada sesama *E. guineensis* dan hibrida. Sedangkan, antara *E. guineensis* dengan *E. oleifera* ditemukan cukup banyak variasi yang diduga terkait perbedaan spesies.

Kata kunci: KAS II, oleat, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, asam lemak.

Penulis yang tidak disertai dengan catatan kaki instansi adalah peneliti pada Pusat Penelitian Kelapa Sawit

Heri Adriwan Siregar (✉)
Pusat Penelitian Kelapa Sawit
Jl. Brigjen Katamso No. 51 Medan, Indonesia
Email: heriadriwan@gmail.com

Abstract. Oil palm (*Elaeis guineensis*) is currently the highest edible oil-producing plant in the world. *E. oleifera* is another species of oil palm that is not widely cultivated due to lower productivity. Oil extracted from *E. guineensis* has a balance ratio of saturated to unsaturated fatty acids level, while *E. oleifera* has a higher unsaturated fatty acids. Long chain saturated fatty acids are more harmful for human health than unsaturated fatty acids. Gene encoding β -ketoacyl ACP synthase II (KAS II, EC 2.3.1.179) was studied, as this enzyme is responsible for biosynthesis of unsaturated fatty acids. Observation and analysis were conducted for KAS II gene and fatty acids content of *E. guineensis* represented by DxP Lame, DxP Langkat and CMR78 samples, *E. oleifera* represented by Suriname origin, and two hybrids (*E. guineensis* x *E. oleifera* (Brazil and Suriname)). The results showed *E. oleifera* Suriname had the highest concentration of oleic acid, followed by *E. guineensis* (CMR78). KAS II gene sequences alignment showed some genetic variation within *E. guineensis* and hybrids, while the high level of variation found between *E. guineensis* and *E. oleifera* was considered caused by species difference.

Keywords: KAS II, oleic, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, fatty acids.

PENDAHULUAN

Food and Agriculture Organization (FAO) mencatat produksi minyak sawit dunia pada tahun 2012 mencapai 52,1 juta ton atau 34 % dari produksi total minyak nabati dunia dan lebih dari 50% digunakan sebagai bahan pangan aditif pada tahun 2009 (FAO,

2016). Seperti minyak nabati lainnya, minyak sawit mempunyai nilai gizi tinggi dan kaya akan vitamin. Minyak sawit CPO saat ini umumnya mempunyai komposisi asam lemak jenuh (ALJ) lebih banyak dibanding asam lemak tak jenuh tunggal (ALTJT) dan asam lemak tak jenuh majemuk (ALTJM). Minyak sawit CPO mengandung ALJ palmitat (C16:0) sekitar 45 - 50%, ALTJT oleat (C18:1) sekitar 30 - 40% serta diikuti ALTJM linoleat (C18:1) sekitar 10% (Montoya *et al.*, 2013).

Berdasarkan jumlah atom karbonnya maka asam lemak dapat dibagi menjadi tiga yaitu, asam lemak rantai pendek dengan jumlah atom karbon 2 - 6, asam lemak rantai sedang dan panjang dengan jumlah atom karbon 8 - 12 dan 14 - 24 (Cifuentes, 2013). Jenis ALJ rantai panjang cenderung meningkatkan resiko serangan jantung dibanding ALJ rantai pendek dan sedang (Tuminah, 2009). Efek buruk ALJ palmitat dapat terjadi bila pangan mengandung kolesterol tinggi namun tidak berbahaya bila kandungannya rendah (Koshla, 2006). Namun, konsumsi yang berlebih ALJ palmitat dilaporkan bertanggung jawab terhadap penurunan permeabilitas plasma membran dan kematian sel melalui mekanisme yang mirip apoptosis (Titov *et al.*, 2011).

Secara umum, ALTJT berpengaruh menguntungkan terhadap kadar kolesterol dalam darah, terutama bila digunakan sebagai pengganti ALJ. Hasil studi subklinis dan klinik menunjukkan bahwa penggantian ALJ dengan ALTJ dalam diet berhasil menurunkan kadar kolesterol total dan kolesterol LDL tanpa menurunkan kolesterol HDL, sehingga dapat menurunkan risiko penyakit jantung koroner (Muller *et al.*, 2003; Ching, 2008). Asam lemak tak jenuh tunggal lebih efektif menurunkan kadar kolesterol darah daripada ALTJM, sehingga ALTJT oleat lebih populer dimanfaatkan untuk formulasi makanan olahan (Lopez-Huertas, 2010). Minyak zaitun yang banyak mengandung ALTJT oleat sangat baik untuk mencegah serangan jantung, obesitas, diabetes dan meningkatkan kadar HDL dibanding minyak biji matahari yang mengandung sedikit ALTJT oleat (Soriguer *et al.*, 2013; Samieri *et al.*, 2011).

Biosintesis asam lemak pada tanaman memerlukan serangkaian reaksi dan dikatalisasi oleh satu set enzim yang terdiri dari β -ketoacyl ACP synthase, stearyl ACP desaturase, acyl-ACP

thioesterase, fatty acid elongase, dan fatty acid desaturase. Lebih jauh diketahui bahwa dalam pathway biosintesis asam lemak, C16:0 berelokasi menjadi C18:0 oleh enzim β -ketoacyl ACP synthase II (KAS II, EC 2.3.1.179) kemudian C18:0 didesaturasi oleh enzim stearyl-ACP Δ 9 desaturase membentuk C18:1 (Vance dan Vance, 2002). Jika enzim KAS II cukup aktif maka konsentrasi C16:0 hanya tinggal sedikit, namun kenyataannya pada kebanyakan *E. guineensis* konsentrasi C16:0 \pm 50% (Parveez *et al.*, 2015).

Kelapa sawit memiliki dua spesies yaitu *E. guineensis* dan *E. oleifera*. Kedua spesies ini memiliki karakter morfologi dan komposisi minyak yang berbeda (Montoya *et al.*, 2013). Minyak sawit CPO *E. oleifera* memiliki kandungan ALTJ oleat dan linoleat lebih tinggi namun ALJ palmitat serta asam lemak jenuh lainnya lebih rendah dibanding *E. guineensis*. Varietas-varietas yang dihasilkan oleh PPKS juga memiliki variasi komposisi asam lemak ALJ dan ALTJ yang memungkinkan untuk dipelajari dan menghasilkan varietas spesifik asam lemak.

Hibridisasi antar kedua spesies untuk tujuan mengintrogresikan karakter tertentu misalnya komposisi asam lemak tak jenuh asam oleat dan asam linoleat tinggi merupakan hal yang memungkinkan. Namun, pendekatan ini cukup memakan waktu 10 – 15 tahun dan sumber daya (Singh *et al.*, 2009). Pengembangan teknik marker-assisted selection (MAS) akan memfasilitasi dengan baik program pemuliaan hibrida sekaligus mempercepat pengembangan material tanaman. Dengan MAS, seleksi dapat dilakukan dengan lebih baik dan spesifik dengan memanfaatkan segregasi keturunan dari hibrida interspesifik dan silang baliknya (Singh *et al.*, 2009).

Berdasarkan profil komposisi asam lemak yang berbeda pada *E. oleifera* dan beberapa varietas PPKS, maka penelitian ini dilakukan untuk mempelajari dan membandingkan gen yang menyandikan enzim KAS II yang diduga bertanggung jawab terhadap konsentrasi palmitat yang tinggi (Bhore *et al.*, 2014). Karakterisasi gen tersebut dapat membuka peluang teridentifikasinya penanda DNA, yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi tanaman yang memiliki kandungan asam lemak yang diinginkan, yang dapat digunakan untuk mendukung penerapan MAS pada tanaman kelapa sawit.



BAHAN DAN METODE

Penelitian berlangsung pada tahun 2015 dan dilakukan di laboratorium Pusat Penelitian Kelapa Sawit Marihat dan Medan untuk mendapatkan sumber sampel DNA, analisis DNA dan minyak.

Pendekatan

Penelitian dimulai dengan menganalisis dan membandingkan profil asam lemak minyak sawit CPO pada beberapa populasi atau varietas kelapa sawit *E. guineensis*, *E. oleifera* dan hibridanya. Untuk mendapatkan urutan DNA lengkap gen penyandi enzim *KAS II*, metode bioinformatika dimanfaatkan dengan database *whole genome sequence* dan beberapa urutan mRNA lengkap tanaman lain yang sudah diketahui. Perbandingan kemudian dilakukan pada tingkat DNA dan protein untuk melihat keragaman yang berasosiasi dengan profil asam lemak.

Metode Pelaksanaan Penelitian

Bahan. Material genetik berasal dari tanaman kelapa sawit koleksi Pusat Penelitian Kelapa Sawit (PPKS), Medan, Sumatra Utara. DNA diisolasi dari 6 (enam) sampel genetik menggunakan jaringan daun muda sehat yaitu :

1. *E. guineensis* (Eg) varietas DxP La Me yang ditanam tahun 2002.
2. *E. guineensis* (Eg) varietas DxP Langkat yang ditanam tahun 2002.
3. *E. guineensis* (Eg) Kamerun aksesi DxP CMR 78 yang ditanam tahun 2010.
4. *E. oleifera* (Eo) Suriname tipe dura yang ditanam tahun 1952.
5. Hibrida *E. guineensis* x *E. oleifera* Brazil yang ditanam tahun 1979.
6. Hibrida *E. guineensis* x *E. oleifera* Suriname yang ditanam tahun 1979.

Analisis asam lemak. Komposisi asam lemak dianalisis menggunakan metode *Gas Chromatography* (GC) yang mengacu pada *AOCS Official Method Ce 1b-89* sebagai referensi. Sebanyak 3 tandan matang

panen diambil dari setiap pohon sampel kemudian dipilih secara acak 30 buah bagian tengah untuk diambil minyak. Sampel minyak ditimbang sebanyak 0.025 gr lalu dimasukkan ke dalam labu vial. Ditambahkan 0.5 mL *Na-methylate* 5 N, ditutup rapat dan divortex selama 2 menit. Ditambahkan *Iso-oktane* 1 mL dan divortex 1 menit. Disentrifus selama 10 menit lalu digunakan lapisan atas sebanyak 1 μ L sebagai sampel yang dimasukkan ke instrumen GC.

Kondisi GC adalah sebagai berikut, jenis kolom : DB 23 *J&W Scientific*, gas pembawa : hidrogen, suhu detektor : 260 °C, suhu injektor : 260 °C, suhu kolom 1 : 70 °C, *ramp rate* : 20 °C/menit, suhu kolom 2 : 180 °C, *iso time* : 1 °C/menit, suhu kolom 3 : 182 °C, *iso time* : 10 °C/menit, *Final temperature* kolom : 220 °C dan *hold time* : 2 menit.

Fenotipe yang diamati adalah kadar asam lemak laurat (C12:0), miristat, palmitat, palmitoleat (C16:1), stearat, oleat, linoleat, α -linolenat, arakidat, dan gadoleat.

Ekstraksi DNA. Total DNA diisolasi dan dipurifikasi menggunakan *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) sesuai protokol dari pabrikan yang sudah dioptimasi (Protokol ekstraksi DNA menggunakan *Qiagen DNeasy Plant Mini Kit* di PPKS). Dimasukkan daun yang sudah dibersihkan dengan ethanol 70% sebanyak 50 mg kedalam tube 2 ml berisi buffer AP1 dan *tungsten bead*. Dihancurkan dengan *TissueLyser*, 25 Hz, selama 1 menit 50 detik sebanyak dua kali, lalu ditambahkan 4 μ l RNase dan divortex. Kemudian dilakukan inkubasi pada 65 °C selama 10 menit lalu ditambah 130 μ l buffer P3 dan dibolak-balik, diinkubasi lagi selama 5 menit. Larutan disentrifus 13.000 rpm selama 5 menit lalu sebanyak 450 μ l *supernatant* dipindahkan ke *lilac column* dan disentrifus lagi 12.000 rpm selama 2 menit. Dipindahkan hasil saringan ke tube 1,5 ml berisi 675 μ l buffer AW1, dicampur, lalu ditambahkan 650 μ l hasil campuran tersebut ke *white column* dan disentrifus 8.000 rpm selama 1 menit. Hasil saringan dibuang lalu ditambahkan sisa larutan ke *white column* dan disentrifus 8.000 selama 1 menit. Hasil saringan dibuang lalu *column* dipindahkan ke *collection tube* dan ditambahkan buffer AW2 sebanyak 500 μ l. Kemudian disentrifus 8.000 rpm selama 1 menit lalu dibuang hasil saringan dan ditambahkan lagi buffer AW2. Disentrifus 12.000 rpm selama 2 menit lalu

dibuang hasil saringan dan disentrifus lagi 12.000 rpm 2 menit, dipindahkan *white column* ke tube 1,5 ml. Ditambah 50 µl buffer AE yang telah dipanaskan, diinkubasi suhu ruang selama 5 menit lalu disentrifus 8.000 rpm selama 1 menit. Langkah terakhir kemudian diulangi sekali lagi.

Disain Primer, Amplifikasi, dan Analisa Hasil Sequencing. Fragmen ekson gen *KAS II* kelapa sawit diamplifikasi menggunakan pasangan primer spesifik yang didisain dengan aplikasi *Primer3* (Koressaar, 2007). Pasangan primer didisain berdasarkan urutan DNA hasil BLASTN yaitu aksesori AF220453.2 (*E. guineensis*) dan FJ940767.1 (*E. oleifera*) sebagai kueri terhadap *public database wgs* dan kromosom kelapa sawit di situs NCBI (Tabel 1 dan 2). Kedua aksesori merupakan sekuen mRNA penyandi enzim *KAS II*

pada kelapa sawit spesies *E. guineensis* dan *E. oleifera*, berturut-turut.

Hasil isolasi DNA kemudian digunakan untuk proses standar amplifikasi PCR menggunakan *GoTaq Green Master Mix* (Promega). Internal kontrol gen *oil palm elongation factor* (OPEF) digunakan dengan proses amplifikasi berdasarkan tahap *initial denature* selama 3 menit pada suhu 95°C, kemudian diikuti 35 siklus selama 30 detik pada suhu 95°C, 30 detik pada suhu 58°C, 60 detik pada suhu 72°C dan tahap final extension selama 9 menit pada suhu 72°C (Krutkaew *et al.*, 2013). Hasil amplifikasi kemudian diverifikasi menggunakan *agarose gel elektroforesis 1%* kemudian disekuensing menggunakan ABI PRISM 3730xl *Genetic Analyzer develop by Applied Biosystems, USA*.

Tabel 1. Urutan primer spesifik.

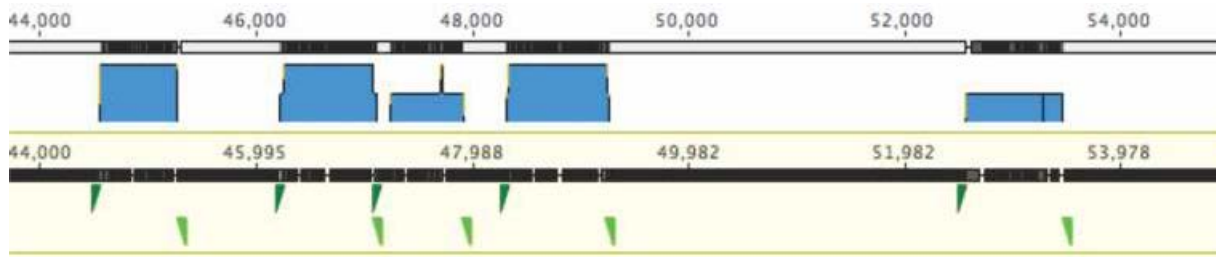
Table 1. Specific primer sequences.

	Primer untuk <i>E. guineensis</i>	PCR		Primer untuk <i>E. oleifera</i>	PCR
Eg1F	GCAATGGCAAGCTCCTTCTC-	689	Eo1F	CTTTCCATGTCTGGTGTGCC	796
Eg1R	ACTGGGGAAGATTCAAAAGC	689	Eo1R	ATCACTTCTGCAACAGATGACA	796
Eg2F	ACACCTGTGGAACAATGGCT	777	Eo2F	TGGTCCAATAGCATGCTGGG	907
Eg2R	ACAGAAGCCATCTCACCATCC	777	Eo2R	ACAGAAGCCATCTCACCATCC	907
Eg3F	TGAGATGGCTTCTGTCAAGGG	956	Eo3F	TGAGATGGCTTCTGTGAAGGG	849
Eg3R	TTCGCAAACAAGCAACTGCA	956	Eo3R	AACATGCAAGCCCCGAAAGAC	849
Eg4F	TCTGCATGCCAACAAGATGG	990	Eo4F	TCTGCATGCCAACAAGATGG	984
Eg4R	ACAGCATGGGAGATATCGCAG	990	Eo4R	ACAGCATGGGAGATATCGCAG	984
Eg5F	GCACTTGTTCCTTCTGAGC	934	Eo5F	TGCTGGCTTGTCTCAAAAAGG	980
Eg5R	CAGAAACCACGTCGATCAGC	934	Eo5R	CAGAAACCACGTCGATCAGC	980

Tabel 2. Primer spesifik yang digunakan per sampel.

Table 2. Specific primers were used for each sample.

No.	Sampel	Primer
1	Eg Lame	<i>E. guineensis</i>
2	Eg Langkat	<i>E. guineensis</i>
3	Eg CMR 78	<i>E. guineensis</i>
4	Eo Suriname	<i>E. oleifera</i>
5	OG Suriname	<i>E. guineensis</i>
6	OG Brazil	<i>E. oleifera</i>



Gambar 1. Posisi 5 pasang primer dan 5 buah amplicon pada template kromosom kelapa sawit. biru: amplicon; hijau muda dan tua: pasangan primer; hitam: DNA *template*.

Figure 1. Position of 5 primer pairs and 5 amplicons on chromosome template of oil palm. blue: amplicon; light and dark green: primer pairs; black: DNA *template*.

Analisa Comparative Genomic. Urutan DNA dari seluruh sampel yang hanya terdiri dari bagian exon (Gambar 1) dan hasil translasinya dibandingkan dengan *multiple sequence alignment* menggunakan MUSCLE pada aplikasi GENEIOUS 7.1.5 dan dianotasi berdasarkan database NCBI.

Pohon filogenetik dikonstruksi berdasarkan hasil penjajaran urutan *full-length* mRNA dari setiap sampel dan beberapa spesies tanaman penghasil minyak lainnya. Aplikasi yang digunakan adalah GENEIOUS TREE BUILDER dengan *genetic distance model* Tamura-Nei dan metode *neighbor-joining* (NJ) (Saitou dan Nei, 1987). Evaluasi diuji pada bootstrap 1000 ulangan.

Prediksi struktur 3D protein *KAS II* menggunakan aplikasi ModWeb web server (MODBASE, 2011) dan divisualisasi menggunakan aplikasi CHIMERA 1.9. (Pettersen *et al.*, 2004).

Analisa Statistik. Untuk menguji perbedaan antara *isoform* terhadap fenotipe asam lemak, digunakan analisa statistik *general linear model* dan dilanjutkan dengan uji LSD dengan tingkat *probability* 0,05. Analisis dilakukan menggunakan *software* SPSS 16.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data profil asam lemak dan urutan DNA yang menyandikan enzim *KAS II* pada *E. guineensis* DxP Lame, Langkat serta aksesori CMR 78, *E. oleifera* origin Suriname tipe dura serta hibrida *E. oleifera* origin Suriname dan hibrida *E. oleifera* origin Brazil telah

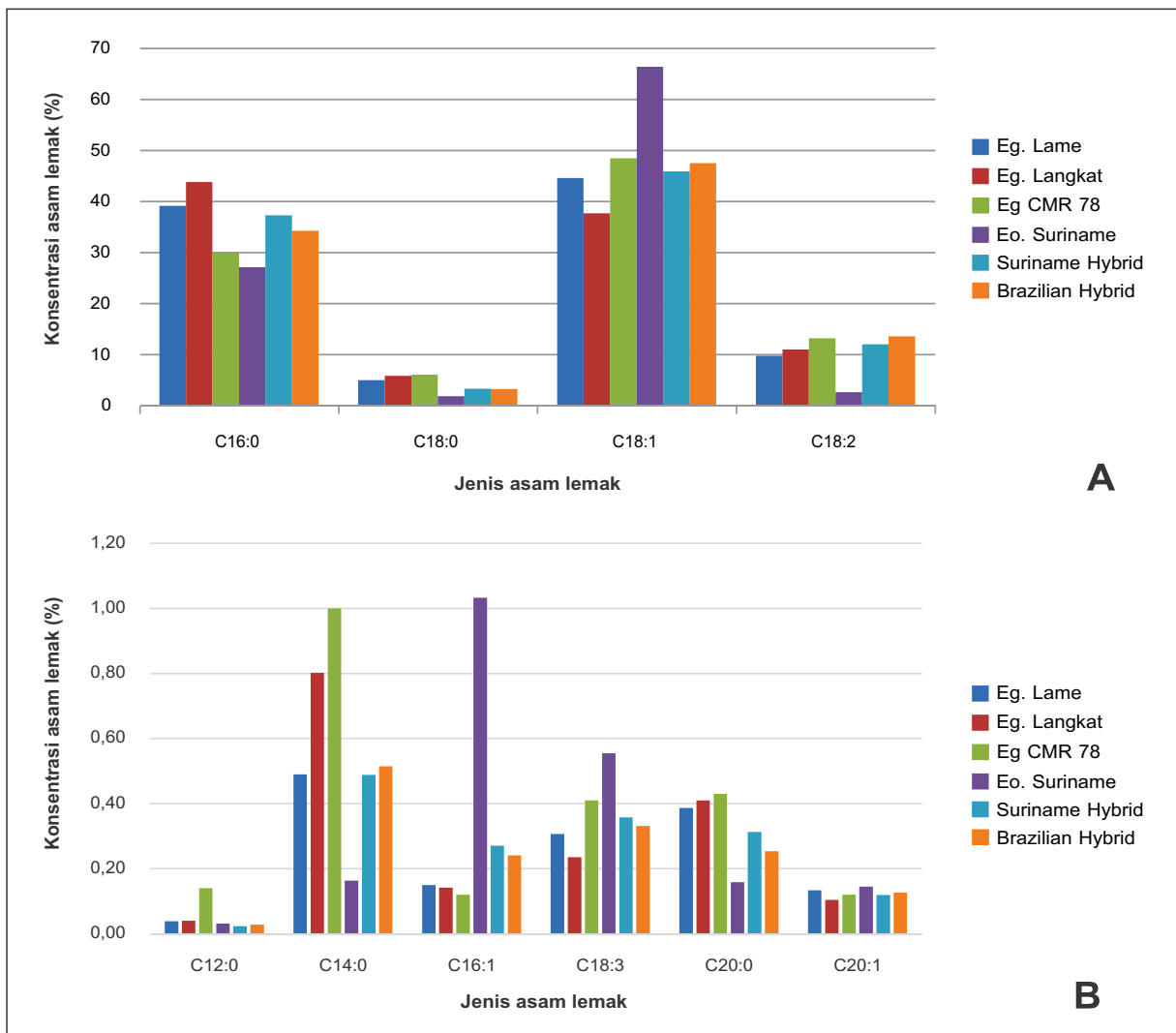
berhasil diperoleh. Algoritma BLASTN dan BLASTX digunakan terhadap *NCBI non-redundant (nr/nt) database* untuk mengidentifikasi *coding regions*, *open reading frame*, *ekson* dan *intron*, anotasi serta urutan asam amino. *Multiple sequence alignment* terhadap urutan mRNA dan asam amino dilakukan menggunakan aplikasi MUSCLE. Pohon filogenetik dikonstruksi menggunakan metode *neighbor-joining* untuk melihat hubungan kekerabatan antar sampel. *Polymorphism* dan indel yang diperoleh dari setiap urutan mRNA dan asam amino yang disejajarkan dirujuk terhadap anotasi oleh *NCBI* dan dikorelasikan dengan fenotipe asam lemak. Selanjutnya, *comparative (homology) modelling* dilakukan untuk mempelajari struktur tiga dimensi protein enzim *KAS II* menggunakan aplikasi ModWeb web service (MODBASE, 2011).

Fenotipe asam lemak. Semua fenotipe persentase asam lemak yang diamati berbeda nyata antar sampel. Asam lemak palmitat memiliki rata-rata persentase paling tinggi diantara semua fenotipe ALJ. Palmitat tertinggi terdapat pada EgLangkat hingga mencapai rata-rata 43.80 %, sedangkan paling rendah pada EoSuriname hanya 27.09 %. Sementara itu, asam lemak oleat memiliki rata-rata persentase paling tinggi di antara semua fenotipe ALTJT. Oleat tertinggi terobservasi ada pada EoSuriname hingga mencapai rata-rata 66.37 %, sedangkan paling rendah pada EgLangkat hanya 37.66 %. Untuk fenotipe ALTJM, linoleat terobservasi memiliki rata-rata persentase paling tinggi. Linoleat paling tinggi dimiliki Hibrida Brazil yang mencapai 13,54%, sedangkan EoSuriname paling rendah hanya 2,61% (Gambar 2A

dan 2B). Aksesori EgCMR 78 memiliki komposisi asam lemak yang menarik, walau belum sebagai varietas unggul. Aksesori ini berpotensi dikembangkan sebagai varietas dengan karakter spesifik, yaitu kandungan ALTJ oleat tinggi dan ALJ palmitat rendah baik melalui pendekatan pemuliaan RRS maupun *Backcross* (Gambar 2A).

Aktivitas suatu enzim dipengaruhi oleh konsentrasi substrat, pH, *ionic strength*, garam alami dan suhu (Scopes, 2002). Konsentrasi asam lemak palmitat pada

kelapa sawit dapat dikurangi melalui *gene silencing* PATE dan over ekspresi gen *KAS II* di dalam mesokarp (Bhore dan Shah, 2011). Pada penelitian ini aktifitas enzim *KAS II* diamati melalui konsentrasi substratnya yaitu, asam lemak palmitat. Penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi palmitat paling rendah menunjukkan oleat paling tinggi misalnya pada EoSuriname, sebaliknya konsentrasi palmitat paling tinggi menunjukkan oleat yang juga paling rendah misalnya terdapat pada EgLangkat. Diduga aktifitas enzim *KAS II* pada EoSuriname lebih tinggi dibanding sampel lainnya.



Gambar 2. Analisa asam lemak dengan metode GC terhadap beberapa jenis asam lemak yang berkonsentrasi (A) tinggi dan (B) rendah.

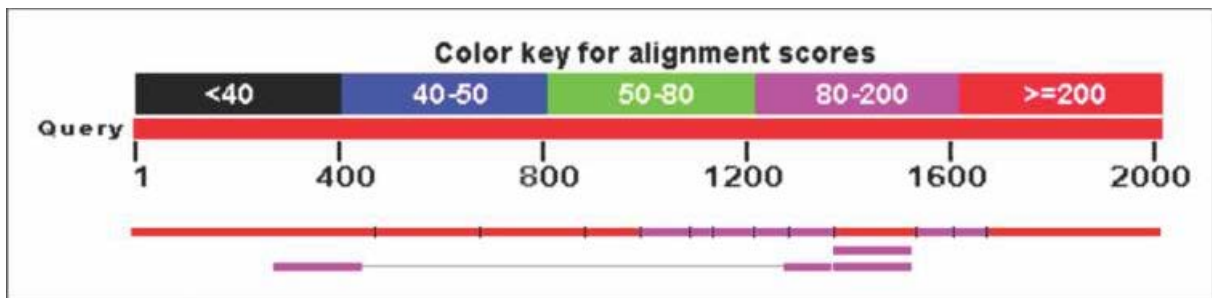
Figure 2. Analysis of fatty acids by GC method against some types of fatty acids concentrate (A) high and (B) is low.



Karakterisasi Gen *KAS II*. Aksesori AF220453.2 untuk *E. guineensis* dan FJ940767.1 untuk *E. oleifera* menyandikan enzim *KAS II* pada *database* NCBI. Kedua aksesori merupakan urutan mRNA dengan ukuran 2.011 bp untuk *E. guineensis* dan 2.138 bp untuk *E. oleifera*. Kedua aksesori tersebut digunakan dalam rangka mendisain *primer specific* untuk mengamplifikasi urutan DNA gen *KAS II* pada semua sampel termasuk hibrida, yaitu aksesori AF220453.2 untuk hibrida Suriname dan aksesori FJ940767.1 untuk hibrida Brazil. Dari hasil BLASTN terhadap *database* kelapa sawit di NCBI diketahui bahwa kedua aksesori terdiri dari 13 *exon* (Gambar 3 dan 4). Ke tiga belas *exon* berhasil diamplifikasi dengan menggunakan 5 pasang *primer specific* yang didisain (Gambar 5). Untuk *E. guineensis*, gen berada di kromosom 10 (NC_026002) sebesar 8.734 bp dengan nilai identik dan *query cover* 99% dan 100%, sedangkan untuk *E. oleifera* gen berada di scaffold o8_sc00006_36 (ASIR01002139) sebesar 8.800 bp dengan nilai identik dan *query cover* 99%. Hasil penjabaran urutan semua

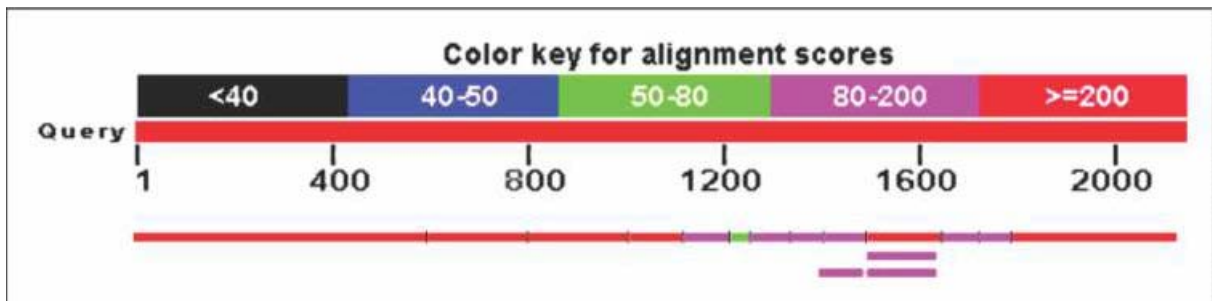
sampel DNA terhadap kedua aksesori menghasilkan nilai identik 96,3% - 99,8% untuk *E. guineensis* dan hibrida Suriname, serta 99,2% untuk *E. oleifera* dan hibrida Brazil.

Penjabaran mRNA antar sesama *E. guineensis* menunjukkan tiga polimorfisme dan dua ambiguitas (Gambar 6). Polimorfisme menjadi perhatian yang menarik pada EgCMR 78 dan Eg Langkat karena memiliki persentase oleat tinggi dan rendah secara berurutan (Gambar 2A). Hasil translasi polimorfisme tersebut menunjukkan mutasi *missense* yaitu dengan merubah asam amino Glutamine menjadi Lysine dan Valine menjadi Leucine pada posisi 1.807 dan 1.937. Potensi kedua polimorfisme ini sebagai marka membutuhkan verifikasi, artinya lebih banyak sampel dibutuhkan untuk dianalisis. Tampaknya enzim *KAS II* pada EgCMR 78 lebih aktif dibanding sampel *E. guineensis* yang lain, karena memiliki persentase palmitat yang lebih sedikit. Konsentrasi oleat yang mirip menegaskan besarnya aktifitas yang mirip pula pada enzim *SAD* (Gambar 2A). Satu mutasi terakhir



Gambar 3. Skema struktur DNA gen *KAS II* pada *E. guineensis* yang terdiri dari 13 *exon*.

Figure 3. Schematic structure of DNA *KAS II* gene in *E. guineensis* consisting of 13 exons.



Gambar 4. Skema struktur DNA gen *KAS II* pada *E. oleifera* yang terdiri dari 13 *exon*.

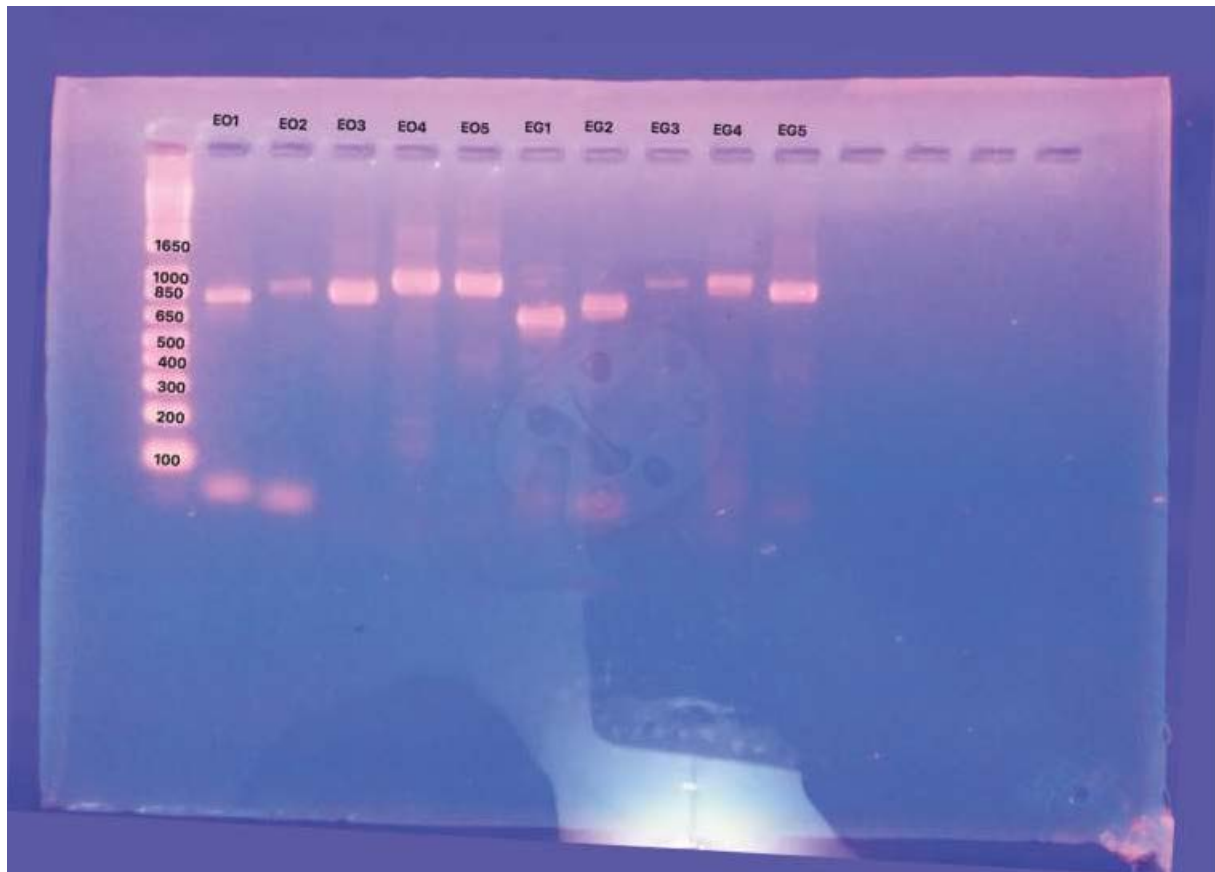
Figure 4. Schematic structure of DNA *KAS II* gene in *E. oleifera* consisting of 13 exons.

ada pada EgLame terhadap EgLangkat dan EgCMR 78 yang juga merupakan mutasi *missense*.

Penjajaran mRNA antar Eg dan EoSuriname menghasilkan 12 polimorfisme, dua ambigu dan 24 indels. Penjajaran antar sesama hibrida menghasilkan empat polimorfisme, tiga ambigu serta 24 indels, sementara itu penjajaran antara Eo Suriname dengan hibrida Suriname menghasilkan lima polimorfisme, satu ambigu dan 23 indels. Banyaknya jumlah indels yang diperoleh pada ketiga hasil persejajaran tersebut disebabkan perbedaan urutan mRNA antara Eg dan Eo itu sendiri serta penggunaan primer yang berbeda (Tabel 2). Hasil ini menegaskan bahwa urutan DNA yang dihasilkan akan berbeda ketika diamplifikasi

menggunakan dua macam primer. Walaupun primer dibuat dari *template* gen dengan fungsi yang homolog, dalam hal ini adalah *KAS II* pada *E. guineensis* dan *E. oleifera*.

Hasil penjajaran yang meliputi seluruh sampel disajikan pada Gambar 7 dan Tabel 3 untuk nilai identik. Nilai identik dapat dibagi dalam dua grup, yaitu grup 1: EgCMR 78, EgLame, EgLangkat dan OG EoSuriname; grup 2: OG EoBrazil dan Eo Suriname. Pengelompokan nilai identik terjadi dalam hal ini disebabkan penggunaan dua macam primer spesifik yang didisain berdasarkan kedua spesies kelapa sawit, yaitu *E. guineensis* dan *E. oleifera* (Tabel 2).



Gambar 5. Hasil amplifikasi PCR. EO: *E. oleifera*; EG: *E. guineensis*.

Figure 5. PCR amplification of KAS II gene. EO: *E. oleifera*; EG: *E. guineensis*.



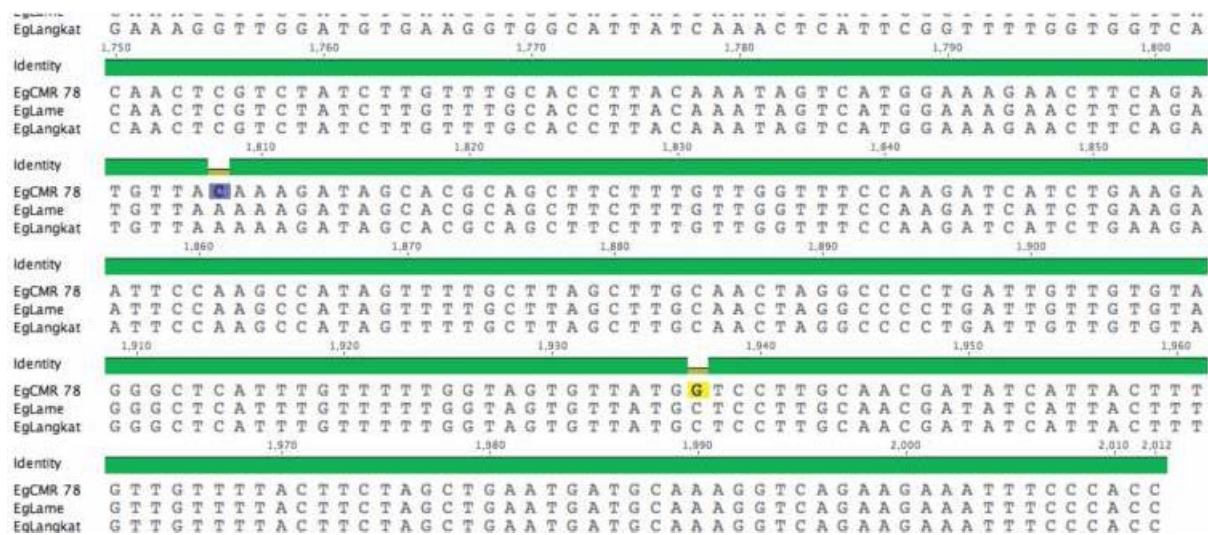
Tabel 3. Nilai identik hasil penjajaran antar sampel.

Table 3. Percentage of multiple sequence alignment identity.

	EgCMR 78	EgLame	EgLangkat	OG EoSURiname	OG EoBrazil	Eo Suriname
EgCMR 78		99.80%	99.88%	99.70%	99.18%	99.03%
EgLame	99.80%		99.93%	99.75%	99.23%	99.08%
EgLangkat	99.88%	99.93%		99.83%	99.30%	99.16%
OG EoSURiname	99.70%	99.75%	99.83%		99.30%	99.33%
OG EoBrazil	99.18%	99.23%	99.30%	99.30%		99.58%
Eo Suriname	99.03%	99.08%	99.16%	99.33%	99.58%	

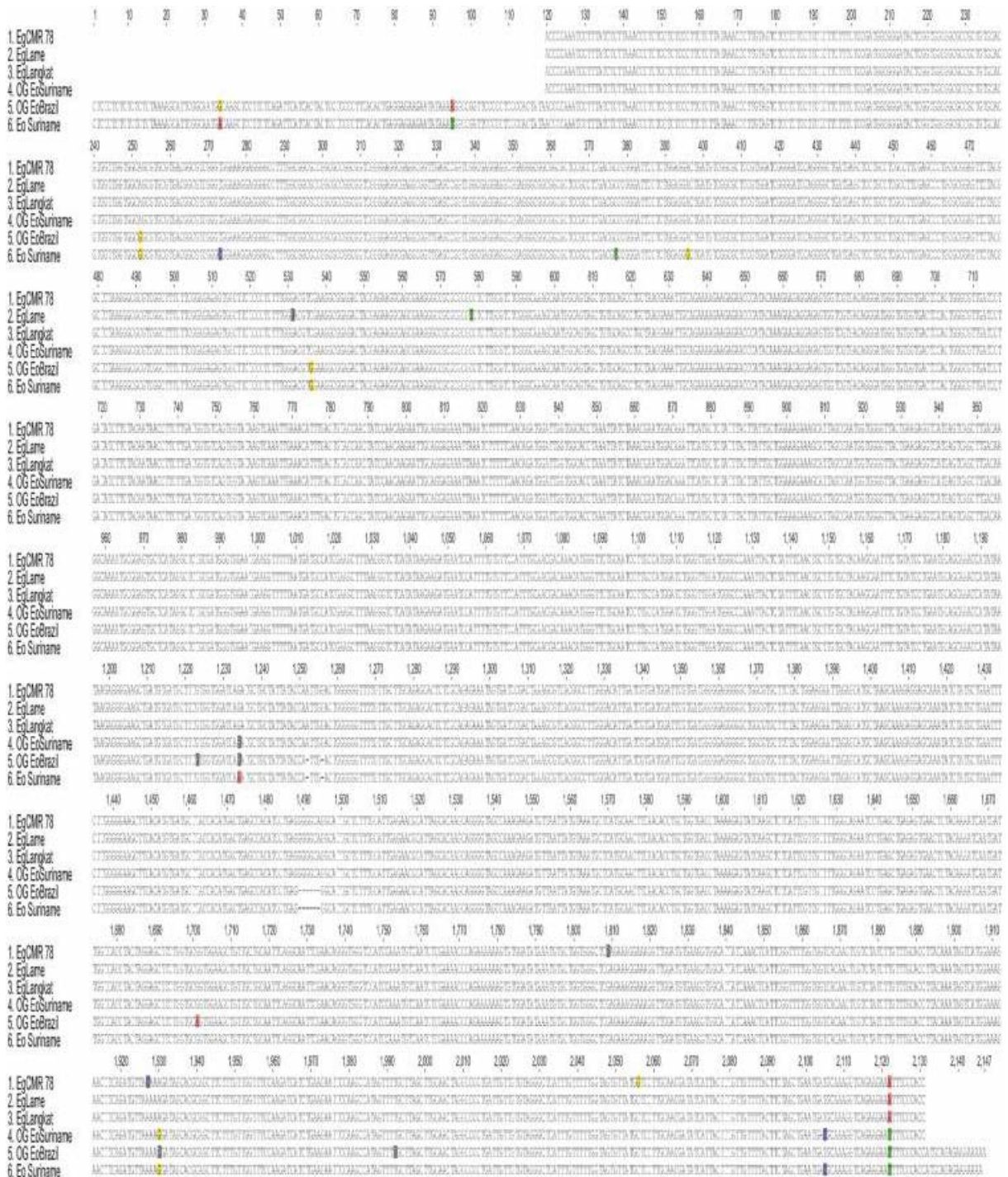
Hasil translasi *in silico* mRNA menjadi urutan asam amino mempunyai ukuran 573 bp untuk *E. guineensis* dan 562 bp untuk *E. oleifera*, serta identik terhadap aksesori AAF26738 (Eg) dan ACQ41833 (Eo) sebesar 91,7% dan 73,7% berturut-turut. Sementara itu kadar homologi antar sample pada tingkat asam amino cukup rendah dibanding tingkat DNA dengan nilai identik berkisar 60,1%. Hal ini disebabkan banyaknya pasang basa DNA yang tidak ikut ditranslasi menjadi protein KAS II berdasarkan aksesori tersebut. Anotasi

urutan asam amino terhadap aksesori referensi tersebut menghasilkan beberapa informasi diantaranya situs *transit peptide*, *polypeptide bindings*, *substrat binding pockets* dan *ion bindings* (Lampiran 1). Tiga *active site* yaitu Cys, His, dan His (Bhore *et al.*, 2011) terdeteksi dan terkonservasi pada seluruh sampel, namun posisinya berbeda antara *E. guineensis* dan *E.oleifera* serta bergantung dari primer yang digunakan pada hibridanya. Perbedaan posisi situs aktif pada kedua spesies juga dilaporkan oleh Bhore *et. al.* (2014).



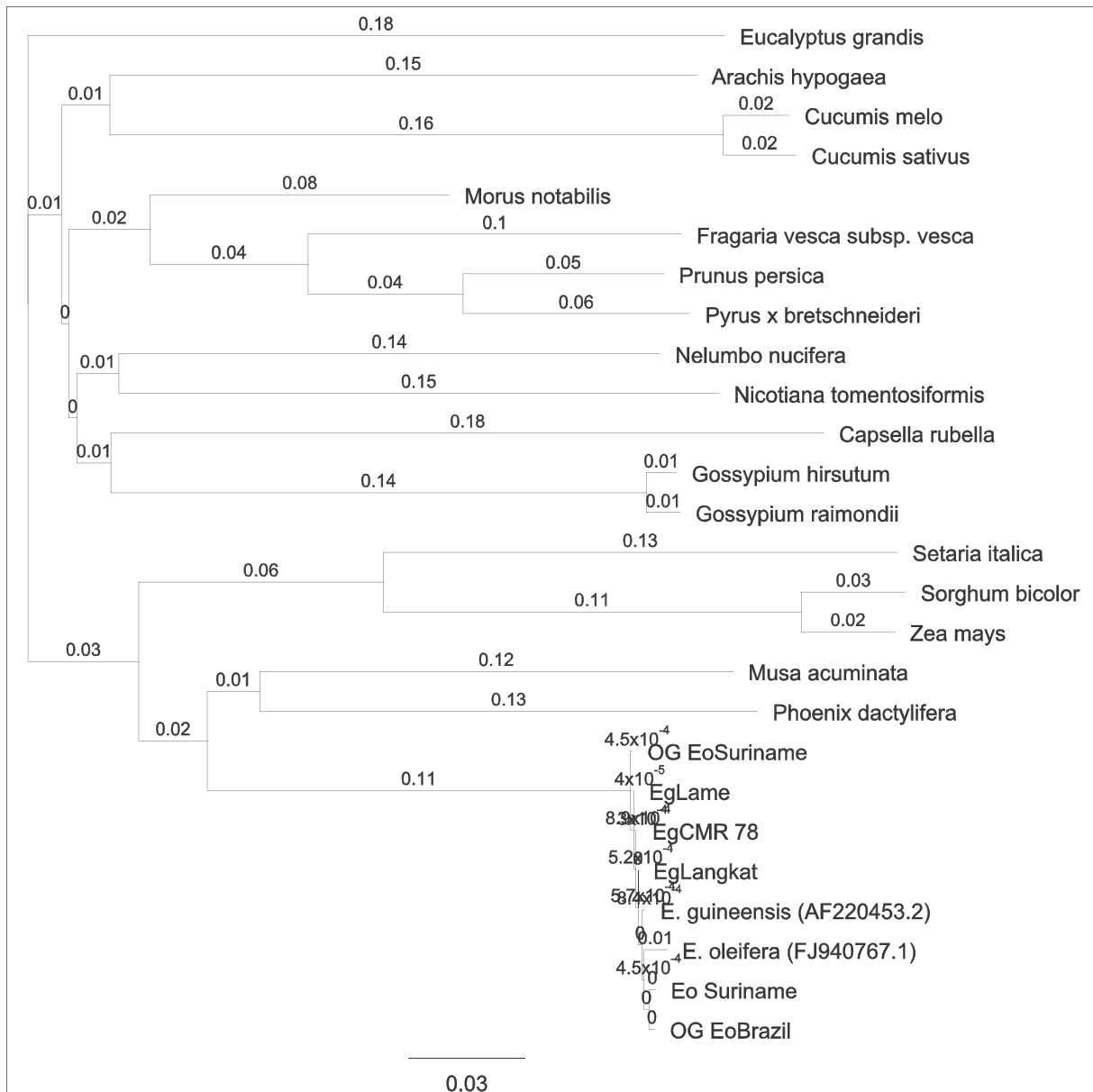
Gambar 6. Penjajaran sebagian sekuen mRNA KAS II antar sesama *E. guineensis*. Huruf berwarna biru dan kuning menunjukkan variasi antar EgCMR78 dengan EgLangkat.

Figure 6. A portion of mRNA KAS II gene sequence alignment between *E. guineensis*. The blue and yellow letters show the variation between EgCMR78 with EgLangkat.



Gambar 7. Penjajaran sekuen mRNA gen *KAS II* antara semua sampel. Huruf berwarna menunjukkan adanya variasi antar sampel.

Figure 7. mRNA *KAS II* gene sequence alignment of all sample. Colored letters show the variation between samples.



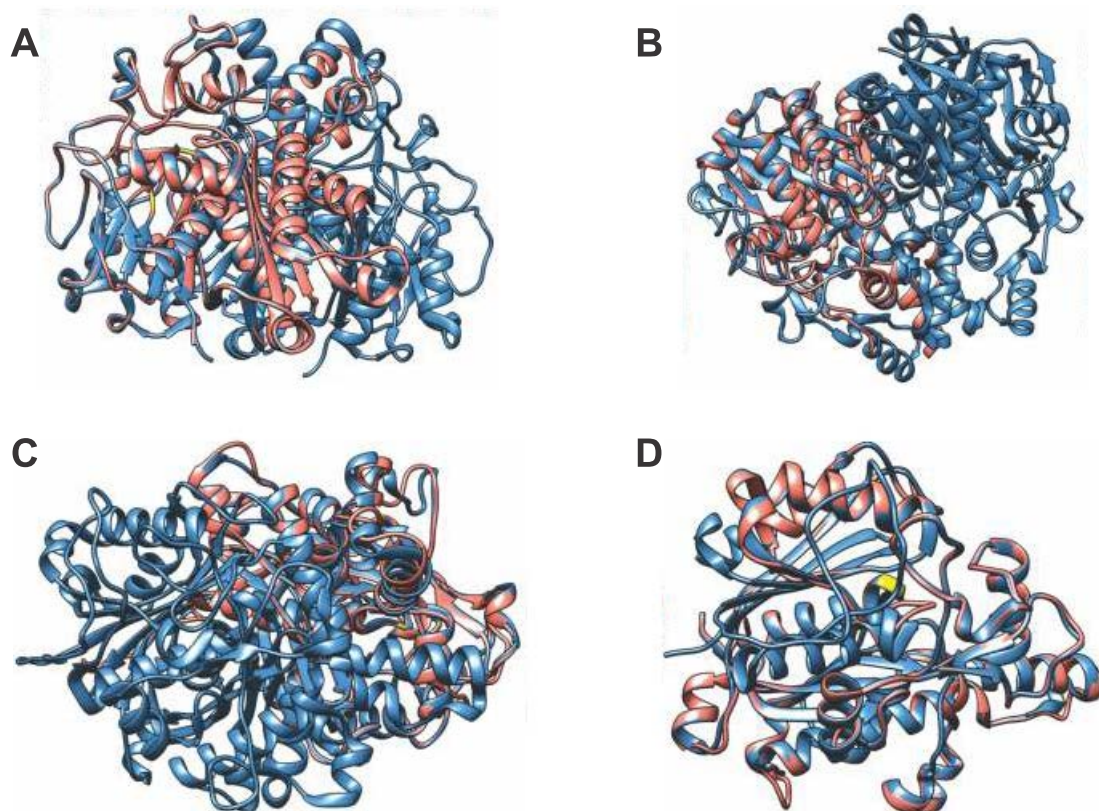
Gambar 8. Pohon filogenetik urutan mRNA enzim *KAS II* semua sampel ditambah beberapa tanaman dari kelas monokotil dan dikotil. *Eucalyptus grandis* (XM_010051066), *Setaria italica* (XM_012844089), *Sorghum bicolor* (XM_002463136), *Zea mays* (AY103998), *Musa acuminata* (XM_009381745), *Phoenix dactylifera* (XM_008784739), *E. guineensis* (AF220453), *E. oleifera* (FJ940767), *Arachis hypogaea* (FJ358425), *Cucumis melo* (XM_008452741), *Cucumis sativus* (XM_004144004), *Capsella rubella* (XM_006300375), *Nelumbo nucifera* (XM_010263444), *Nicotiana tomentosiformis* (XM_009626882), *Gossypium hirsutum* (HM236494), *Gossypium raimondii* (XM_012608356), *Morus notabilis* (XM_010091364), *Fragaria vesca* subsp. *vesca* (XM_011462673), *Prunus persica* (XM_007204133), dan *Pyrus x bretschneideri* (XM_009338897).

Figure 8. Phylogenetic tree of *KAS II* enzyme mRNA sequence from the samples plus some plants of the class monocots and dicots.

Pohon filogenetik. Variasi dan hubungan mRNA gen *KAS II* antar sampel serta beberapa tanaman lain diuji dan digambarkan melalui pohon filogenetik (Gambar 8). Filogenetik dengan metode NJ menyusun semua sampel termasuk kedua aksesori dari NCBI berada pada sebuah *clade* yang sama dan terpisah dengan contoh tanaman lainnya. Spesies *E. guineensis* tampak terpisah dengan *E. oleifera*, namun sampel OG EoSuriname (hibrida) tampak lebih dekat ke *E. guineensis* karena diamplifikasi menggunakan primer yang sama. Tanaman lain yang telah diketahui memiliki kekerabatan dekat dengan kelapa sawit seperti tanaman kurma dan pisang tampak berada pada sebuah *clade* yang sama dan berdekatan dengan *clade* sampel. *Eucalyptus grandis* terindikasi menjadi tanaman yang memiliki hubungan paling jauh

dengan kelapa sawit, ditunjukkan dengan posisinya pada pohon filogenetik.

Prediksi Struktur 3D Protein. Aplikasi ModWeb *web server* (MODBASE, 2011) digunakan untuk memprediksi struktur tiga dimensi protein *KAS II*. ModWeb *web server* merekomendasikan nomor aksesori 1e5mA (*beta ketoacyl acyl carrier protein synthase ii (kasii) from synechocystis sp.*) untuk Eo Suriname dan Hibrida Eo Suriname dengan nilai identik 26% dan 45% secara berturut-turut, serta aksesori 2iwzA (*human mitochondrial beta-ketoacyl acp synthase complexed with hexanoic acid*) untuk Eg Lame dan Eg LAngkat dengan nilai identik masing-masing sebesar 41%. Untuk sampel CMR 78 dan hibrida Eo Brazil Mod web server merekomendasikan



Gambar 9. Struktur 3D protein hasil prediksi menggunakan MODWEB Server. A: 3e60A; B: 2ix4A; C: 2iwzA dan D: 1e5mA. Biru: *template*; merah: *KAS II* dan kuning: situs aktif.

Figure 9. 3D protein structure prediction results using the MOD WEB Server. A: 3e60A; B: 2ix4A; C: 2iwzA; and D: 1e5mA. Blue: *template*; red: *KAS II* and yellow: active sites.



nomor aksesinya 2ix4 (*Arabidopsis thaliana* mitochondrial beta-ketoacyl acyl synthase hexanoic acid complex) dan 3e60a (*Crystal structure of 3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase II from Bartonella henselae*) sebagai template dengan nilai identik 43% dan 21%, berturut-turut. Bentuk 3D dari masing-masing aksesinya yang digunakan sebagai template terdapat pada Gambar 9a, 9b, 9c, dan 9d. Wang *et al.* (2013) melaporkan bahwa prediksi dengan metode *homology modelling* menghasilkan protein EgKASII and EoKASII identik 78% dan 74% terhadap *Streptococcus pneumoniae* KASII dan *Brucella melitensis* KASII, berturut-turut.

Asosiasi allelik gen KAS II dengan fenotipe asam lemak. Enzim KAS II bertanggung jawab dalam proses kondensasi palmitat menjadi stearat, sehingga berfungsi juga sebagai pengontrol rasio produk 16C/18C. Biasanya enzim ini mempunyai berat molekul sebesar 88 kDa dan mempunyai tiga situs aktif yaitu cys-his-his. Sensitif terhadap arsenite, namun tidak begitu dihambat oleh cerulenin (Harwood, 2010). Dari profil asam lemak yang diamati pada sampel diketahui bahwa sulit melihat perbandingan 16C/18C, karena stearat langsung dikonversi oleh enzim *Stearoyl ACP 9 Desaturase* menjadi oleat (Gambar 2A). Umumnya aktifitas enzim SAD tidak berbeda nyata pada kelapa sawit (Siregar *et al.*, 2016), sehingga rasio 16C/18C bisa dilihat secara tidak langsung melalui konsentrasi oleat.

Walaupun ada potensi korelasi dari variasi DNA dengan fenotipe asam lemak pada penelitian ini, namun sulit untuk menarik keputusan disebabkan jumlah sampel yang sedikit. Namun, Montoya *et al.* (2013) menemukan hanya ada satu *copy* gen KAS II dan tiga SNP dengan jumlah sampel yang lebih banyak. Budiani dan Purba (2010) menemukan 4 variasi genetik pada mRNA gen KAS II pada DxP Simalungun dan Hibrida (*Eg*. DxP Simalungun x *E. oleifera*).

Tulisan ini bisa dijadikan dasar bahwa enzim KAS II berpotensi dijadikan marka molekuler dibandingkan enzim SAD pada kelapa sawit dalam melakukan seleksi tanaman dengan kandungan oleat tinggi. Sambanthamurthi *et al.* (2009) melaporkan bahwa aktivitas KAS II terbukti berkorelasi positif dengan

kandungan asam lemak tak jenuh pada plasma nutfah PORIM di Malaysia.

KESIMPULAN

Konsentrasi asam lemak oleat pada *E. oleifera* berbeda nyata lebih tinggi dibandingkan dengan *E. guineensis*. Variasi genetik pada gen KAS II antar *E. oleifera* dan *E. guineensis* cukup tinggi yang diduga berkorelasi dengan perbedaan spesies. Konsentrasi asam lemak oleat pada CMR78 berbeda nyata lebih tinggi dibandingkan sesama *E. guineensis* maupun hibrida. Beberapa variasi genetik yang dijumpai sangat potensial menjadi marka molekuler yang berkorelasi dengan konsentrasi tinggi asam lemak oleat.

Untuk *E. guineensis*, DNA gen berada di kromosom 10 (NC_026002) sebesar 8.734 bp dengan nilai identik dan *query cover* 99% dan 100%, sedangkan untuk *E. oleifera* DNA gen berada di scaffold o8_sc00006_36 (ASIR01002139) sebesar 8.800 bp dengan nilai identik dan *query cover* 99%. Hasil BLASTN terhadap database kelapa sawit di NCBI diketahui bahwa DNA gen kedua spesies terdiri dari 13 *exon*.

Hasil translasi *in silico* mRNA menjadi urutan asam amino mempunyai ukuran 573 bp untuk *E. guineensis* dan 562 bp untuk *E. oleifera*, serta identik terhadap aksesinya AAF26738 (Eg) dan ACQ41833 (Eo) sebesar 91,7% dan 73,7% berturut-turut.

Walaupun ada potensi korelasi dari variasi DNA dengan fenotipe asam lemak pada penelitian ini, namun sulit untuk menarik keputusan disebabkan jumlah sampel yang sedikit.

DAFTAR PUSTAKA

- Bhore, S.J. and F.H. Shah. 2011. Construction of efficient and effective transformation vectors for palmitoyl-acyl carrier protein thioesterase gene silencing in oil palm. *Bioinformation*, 6(6), 212.
- Bhore, S.J., T.S. Cha, K. Amelia, and F.H. Shah. 2014. Insights from computational analysis of full-length β -ketoacyl-[ACP] synthase-II cDNA isolated from American and African oil palms. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 5(1), 73.

- BUDIANI, A. dan A.R PURBA. 2010. Kloning fragmen gen penyandi β -ketoacyl-ACP synthase II dari dua tipe kelapa sawit dengan kandungan asam oleat yang berbeda. *Menara Perkebunan*, 78(1), 1-8.
- Ching, K.C. 2008. Fatty acids in food and their health implication third edition. CRC Press.
- Cifuentes, A. 2013. "Microbial Metabolites in the Human Gut". *Foodomics: Advanced Mass Spectrometry in Modern Food Science and Nutrition*. John Wiley & Sons. ISBN 9781118169452.
- http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Oilcrops/Documents/OECDReports/OECD_2013_22_oils_proj.pdf. Diakses pada tanggal 5 Januari 2016.
- Harwood, J.L. 2010. Plant fatty acid synthesis. AOCs Lipid Library. <http://lipidlibrary.aocs.org/content.cfm?ItemNumber=40304>. Diakses pada tanggal 2 Juni 2016.
- Khosla, P. 2006. Palm Oil: A nutritional overview. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 17. 21-23.
- Koressaar, T.M.R. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3 *Bioinformatics* 23(10):1289-91.
- Krutkaew, V., T. Srirat, S. Tragoonrung, A. Vanavichit, and C. Jantasuriyarat, 2013. Cloning and Characterization of stearoyl-ACP desaturase gene (SAD) in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) *Thai J. Genet.* 6(1): 60-64.
- Lopez-Huertas, E. 2010. Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacological Research*, 61(3), 200-207.
- Ursula, P., B.M. Webb, D.T. Barkan, D. Schneidman-Duhovny, A. Schlessinger, H. Braberg, Z. Yang, E.C. Meng, E.F. Pettersen, C.C. Huang, R.S. Datta, P. Sampathkumar, M.S. Madhusudhan, K. Sjolander, T.E. Ferrin, S.K. Burley, and A. Sali. 2011. MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models and associated resources. *Nucleic Acids Research* 39, 465-474.
- Montoya, C., R. Lopes, A. Flori, D. Cros, T. Cuellar, M. Summo, S. Espeout, R. Rivallan, A.M. Risterucci, D. Bittencourt, J.R. Zambrano, W.H. Alarcón G., P. Villeneuve, M. Pina, B. Nouy, P. Amblard, E. Ritter, T. Leroy, and N. Billotte. 2013. Quantitative trait loci (QTLs) analysis of palm oil fatty acid composition in an interspecific pseudo-backcross from *Elaeis oleifera* (HBK) Cortés and oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Tree genetics & genomes*, 9(5), 1207-1225.
- Muller, H., A.S. Lindman, A.L. Brantsaeter, and J.L. Pedersen. 2003. The serum LDL/HDL cholesterol ratio is influenced more favorably by exchanging saturated with unsaturated fat than by reducing saturated fat in the diet of women. *J Nutr.* 133(1):78-83.
- Parveez, G.K., O.A. Rasid, M.Y. Masani, R. Sambanthamurthi. 2015. Biotechnology of oil palm: strategies towards manipulation of lipid content and composition. *Plant Cell Rep.* 34(4): 533-43. doi: 10.1007/s00299-014-1722-4.
- Pettersen, E.F., T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, and T.E. Ferrin. 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*; 25(13):1605-12.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol* 4:406-425.
- Sambanthamurthi, R., R. Singh, A.P.G. Kadir, M.O. Abdullah, and A. Kushairi. 2009. "Opportunities for the oil palm via breeding and biotechnology," in *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species*, eds Mohan Jain S., Priyadarshan P. M., editors. (New York: Springer;), 377-421 10.1007/978-0-387-71201-7.
- Samieri, C., C. Feart, C. Proust-Lima, E. Peuchant, C. Tzourio, C. Stapf, C. Berr, P. Barberger-Gateau. 2011. Olive oil consumption, plasma oleic acid, and stroke incidence the three-city study. *Neurology*, 77(5):418-425.
- Scopes, R.K. 2002. Enzyme activity and assays. *Encyclopedia of life science*. Macmillan Publisher Ltd, Nature Publishing Group.



- Singh, R., S.G. Tan, J.M. Panandam, R.A. Rahman, L.C. Ooi, E.T. Low, M. Sharma, J. Jansen, and S.C. Cheah. 2009. Mapping Quantitative Trait Loci (QTL) for Fatty Acid Composition in an Interspecific Cross of Oil Palm. *BMC Plant Biology*, 9:114.
- Siregar, H. A., A. Yulandi, and M.T. Suhartono. 2016. Stearoyl-ACP Delta 9 Desaturase Might not be the only Factor Affecting Unsaturated Fatty Acids Concentration in Oil Palm (*Elaeis Sp.*). *British Biotechnology Journal* 11(1): 1-17.
- Soriguer, F., G. Rojo-Martinez, A. Goday, A. Bosch-Comas, E. Bordiu, F. Caballero-Diaz, A. Calle-Pascual, R. Carmena, R. Casamitjana, L. Castano, C. Castell, M. Catalá, E. Delgado, J. Franch, S. Gaztambide, J. Girbés, R. Gomis, G. Gutiérrez, A. López-Alba, M.T. Martínez-Larrad, E. Menéndez, I. Mora-Peces, E. Ortega, G. Pascual-Manich, M. Serrano-Rios, I. Urrutia, S. Valdés, and J.A. Vázquez, J. Vendrell. 2013. Olive oil has a factors. *Di@bet.es* study. *Eur J Clin Nutr.* 67(9):911–916.
- Titov, V.N., V.V. Krylin, and I. Shiriaeva, 2011. Prevention of atherosclerosis. Excess of palmitic acid in food, a cause of hypercholesterolemia, inflammatory syndrome, insulin resistance in myocytes, and apoptosis. *Klin Lab Diagn.* 2:4-15.
- Tuminah, S. 2009. (Tinjauan pustaka) Efek perbedaan sumber dan struktur kimia asam lemak jenuh terhadap kesehatan. *Bul. Penelit. Kesehat.* 38(1):43-51.
- Vance, D.E. and J.E. Vance, 2002. *Biochemistry of Lipid. Lipoproteins dan Membranes* (4th Edn.). *Elsevier Science B. V.*
- Wang, E., S. Chinni, and S.J. Bhore. 2013. Three-dimensional (3D) structure prediction of the American and African oil-palms β -ketoacyl-[ACP] synthase-II protein by comparative modelling. *Bioinformation*, 10(3), pp.130-137.

