

**Hubungan Metilasi DNA dengan Ekspresi Gen *MADS-box* pada Buah Mantel Tanaman Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.)**

***Correlation between DNA Methylation and Expression of the MADS-box Genes on Mantled Fruit of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)***

Maharani Anischan<sup>1\*</sup>, Suharsono<sup>2</sup>, Nurita Toruan-Mathius<sup>3</sup>, dan Andree Sunanjaya Kusnandar<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana IPB  
Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680, Indonesia

<sup>2</sup>Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor,  
Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

<sup>3</sup>Plant Production and Biotechnology Division, Biotechnology Department  
PT SMART, Tbk., Plaza BII, Jl. Thamrin Kav.22, Jakarta, Indonesia

Diterima 10 Oktober 2013/Disetujui 28 April 2014

**ABSTRACT**

*The presence of mantled fruit on large-scale clonal production of oil palm had trully decreased the oil productivity. Mantled phenotype is likely to be that of an epigenetic change involving DNA methylation and the MADS-box transcription factor gene which encoded floral organ homeotic transformation. The objectives of this research were to quantify the degree of methylation which determined fruit abnormality through Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) and to study its correlation with the MADS-box EgAGL6, EgAG2, and EgAGA genes expressed on mantled fruit derived from oil palm clonal plants which have been quantified using Quantitative Real-Time PCR (qPCR). This research was arranged in two replications for each gene and cDNA. The expression of the target genes were compared to EF1- $\alpha$ 1 as the reference gene. Through the Least Significant Difference (LSD) Test at 95% confidence level of qPCR result, EgAGL6 expression was significantly lower in mantled fruit which decreased from 1.88 fold in Abn m to 0.46 fold in Abn. EgAG2 expression was increased non-significantly from 0.91 fold in Abn m to 1.13 fold in Abn, while EgAGA expression was higher in mantled which increased significantly from 1.48 fold in Abn m to 1.71 fold in Abn. Nuclease S1 digestion and UPLC revealed the genome-wide increase in DNA methylation on mantled fruit (18.33-19.55%) compared to its normal counterparts (5.67%). This increased in global DNA methylation was showed by the significant decreased in EgAGL6 transcript level of mantled fruit. This gene assumed to be involved in the development of mantled fruit.*

*Keywords: DNA-methylation, MADS-box genes, Mantled fruit, Quantitative Real-Time PCR*

**ABSTRAK**

*Buah mantel pada produksi klonal kelapa sawit skala besar dapat menurunkan produktivitas minyak. Fenotipe mantel disebabkan oleh perubahan epigenetik yang melibatkan metilasi DNA dan gen MADS-box yang menyandikan transformasi homeotik organ reproduksi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui derajat metilasi yang menentukan abnormalitas buah menggunakan Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) dan melihat hubungannya dengan ekspresi gen MADS-box EgAGL6, EgAG2, dan EgAGA pada buah mantel regenerasi yang telah dikuantifikasi dengan Quantitative Real Time PCR (qPCR). Penelitian ini dirancang dalam dua ulangan, untuk setiap gen dan cDNA. Ekspresi dari gen target dibandingkan dengan EF1- $\alpha$ 1 sebagai gen pembanding. Kuantifikasi ekspresi gen dengan qPCR menunjukkan penurunan yang sangat berbeda nyata pada BNT 5% pada ekspresi gen EgAGL6 dari 1.88 fold pada Abn m menjadi 0.46 fold pada Abn. Level ekspresi gen EgAG2 meningkat namun tidak berbeda nyata pada BNT 5% dari 0.91 fold pada Abn m menjadi 1.13 fold pada Abn, sedangkan level ekspresi gen EgAGA meningkat dengan berbeda nyata dari 1.48 fold pada Abn m menjadi 1.71 fold pada Abn. Pemotongan DNA genom dengan enzim S1 Nuklease dan UPLC menunjukkan adanya hipermetilasi pada buah mantel sebesar 18.33-19.55% dibandingkan dengan buah normal sebesar 5.67%. Peningkatan dalam level metilasi ini ditunjukkan oleh penurunan yang nyata dari level transkrip EgAGL6 pada buah mantel. Gen ini diduga terlibat dalam perkembangan buah mantel.*

*Kata kunci: Metilasi DNA, Gen MADS-box, Buah Mantel, Quantitative Real-Time PCR*

\* Penulis untuk korespondensi. e-mail: rani.anischan@gmail.com

## PENDAHULUAN

Kelapa sawit merupakan tanaman utama perkebunan di Indonesia. Hal ini dapat dilihat dari peningkatan luas areal perkebunan, produksi minyak dan volume ekspor komoditas ini dari tahun ke tahun. Indonesia merupakan negara penghasil dan pengekspor kelapa sawit terbesar di dunia. Seluas 10 juta hektar areal perkebunan kelapa sawit Indonesia menghasilkan sekitar 50% total minyak sawit dunia (BPS, 2013).

Salah satu upaya untuk memenuhi kebutuhan produksi adalah penyediaan bibit berkualitas dengan produktivitas tinggi. Hal tersebut dapat dilakukan melalui perbanyakan klonal dari pohon dengan performa terbaik dengan teknik kultur jaringan. Kendala yang dihadapi dalam pemanfaatan teknologi kultur jaringan adalah timbulnya abnormalitas pada organ reproduktif di antaranya buah mantel yang disebabkan adanya variasi somaklonal. Suatu bunga ditemukan struktur menyerupai karpel yang menggantikan stamen dan berbentuk seperti “pembungkus” pada buah dapat ditemukan pada bunga sawit (Adam *et al.*, 2005). Menurut Hetharie (2008) mesokarp buah mantel mengakumulasi sangat sedikit minyak. Pada kasus buah mantel berat, mesokarp buah berubah menjadi jaringan yang sangat keras sehingga pengaruh buah mantel pada penurunan produksi minyak dapat sangat besar (20-30%) dibandingkan dengan buah normal.

Pencarian penanda molekuler untuk abnormalitas buah mantel telah dilakukan namun belum berhasil menemukan pita DNA spesifik yang dapat membedakan tanaman berbuah normal dengan abnormal secara universal sehingga diperlukan metode lain untuk menerangkan penyebab terbentuknya fenotipe mantel pada regenerasi kelapa sawit.

Fenotipe mantel disebabkan oleh modifikasi epigenetik yang mengubah pola ekspresi dari sejumlah gen yang terlibat dalam pembungaan dan perkembangan buah (Shearman *et al.*, 2012). Metilasi DNA merupakan salah satu mekanisme epigenetik karena bersifat *reversible* (Bollati dan Baccarelli, 2010). Proses organogenesis bunga (Adam *et al.*, 2007) dan perkembangan buah (Tranbarger *et al.*, 2011) kelapa sawit didasarkan pada peranan faktor transkripsi, yaitu gen *MADS-box*. Menurut Elliot dan Elliot (2009) metilasi salah satunya dapat terjadi di level faktor transkripsi.

*Qualitative Real Time Polymerase Chain Reaction* (qPCR) adalah suatu teknik yang paling sensitif untuk deteksi dan kuantifikasi ekspresi gen yang ada pada saat ini (Kubista *et al.*, 2006). Yang *et al.* (2011) menggunakan metode *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) untuk menetapkan status metilasi DNA.

Penelitian ini ditujukan untuk mengkuantifikasi level ekspresi beberapa gen *MADS-box*, menghitung level metilasi DNA genom dan menerangkan hubungan antara abnormalitas buah kelapa sawit akibat metilasi dengan ekspresi gen *MADS-box*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi mengenai kuantitas metilasi yang menentukan tingkat abnormalitas pada buah serta hubungannya dengan gen *MADS-box* yang terekspresi. Informasi tersebut dapat dimanfaatkan untuk mendapatkan

pemecahan mengatasi permasalahan abnormalitas pada kelapa sawit.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Juni 2012 sampai April 2013 di Laboratorium Genomik dan Transkriptomik, Departemen Bioteknologi, PT. SMART Tbk., Bogor.

Bahan tanaman yang digunakan adalah buah normal dan buah mantel muda dari tanaman klonal Tenera SOCFINDO berumur 15 tahun dan diambil dari perkebunan kelapa sawit Padang Halaban, Sumatera Utara. Buah mantel dikelompokkan menjadi dua, yaitu buah mantel yang diambil dari dalam tandan (Abn m) dan buah mantel yang diambil dari luar tandan (Abn). Primer spesifik didisain mengisolasi cDNA gen target *EgAGL6*, *EgAG2*, *EgAGA* dan gen pembanding *EF1- $\alpha$ 1*. Primer aktin *ActF* (5'-CCAAGGCAAACAGAGAGAAGAT-3') dan *ActR* (5'-AAATTGGGACAGTGTGGGTAAC-3') yang dirancang spesifik untuk ekson 2-ekson 3 gen *EgACT1*, digunakan sebagai alat evaluasi kemurnian cDNA total.

### Analisis Ekspresi Gen

Ekspresi dari gen *EgAGL6* (subfamili *AGAMOUS-like*), *EgAG2* (subfamili *AGAMOUS*) dan *EgAGA* (subfamili *AGAMOUS*) ditentukan dengan metode *two-step Quantitative Real-Time PCR* (qPCR). RNA total dari sampel diisolasi menggunakan *RNeasy® Plant Mini Kit* (Qiagen). *First-strand* cDNA total disintesis melalui proses transkripsi balik (*reverse transcription*, RT) RNA total (900 ng) menggunakan primer oligo (dT) yang tersedia dalam *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* (Qiagen). Penggunaan kit dilakukan dengan mengikuti prosedur dari Qiagen.

Kemurnian *first-strand* cDNA total diketahui melalui PCR dengan menggunakan primer spesifik untuk cDNA ekson2-ekson3 dari *EgACT1* dengan komposisi 1  $\mu$ L cDNA, 1.5  $\mu$ L *Taq* bufer 1x, 1.5  $\mu$ L dNTP mix 4 mM, 1.5  $\mu$ L Primer *ActF* 1 mM dan 1.5  $\mu$ L Primer *ActR* 1 mM, 0.16  $\mu$ L  $MgCl_2$  40 mM, 0.12  $\mu$ L enzim *Taq* DNA polimerase 0.5 U (Thermo Scientific) dan *Rnase-free water* hingga mencapai volume akhir 15  $\mu$ L. Campuran direaksikan dengan kondisi pra-PCR 95 °C, 5 menit; denaturasi 95 °C, 30 detik; penempelan primer 60 °C, 20 detik; pemanjangan 72 °C, 30 detik dan pasca-PCR 72 °C, 7 menit diteruskan dengan pendinginan 25 °C, 1 menit. PCR dilakukan sebanyak 25 kali siklus.

Dua ulangan dirancang untuk setiap gen dan cDNA. Kurva standar dirancang untuk menghitung efisiensi amplifikasi PCR dari cDNA gen target dan gen pembanding. Hanya efisiensi amplifikasi yang sama antara cDNA gen target dan gen pembanding yang dapat digunakan sebagai data. Komposisi reaksi adalah 1  $\mu$ L cDNA (900ng), 5  $\mu$ L *Quantifast SYBR Green RT-PCR Master Mix 2x* (*Quantifast SYBR Green PCR Kit*, Qiagen), 2  $\mu$ L primer mix spesifik (50:50 campuran primer *forward* dan *reverse*, masing-masing 1  $\mu$ M mL<sup>-1</sup>) dan *RNase-free water* hingga mencapai volume akhir 10  $\mu$ L. Kondisi reaksi adalah pra-PCR pada

95 °C, 10 menit; denaturasi pada 95 °C, 30 detik; penempelan primer pada 60 °C, 20 detik dan pemanjangan pada 72 °C, 30 detik. PCR dilakukan sebanyak 40 kali siklus.

Ekspresi gen dianalisis dengan menggunakan mesin *Real-Time PCR Rotor-Gene®Q* (Qiagen). Nilai  $C_T$  untuk setiap gen ditentukan dengan *Rotor Gen®Q Series Software* (Qiagen) dan rasio ekspresi dihitung dengan metode *AAC<sub>T</sub> Relative Quantification* (Livak dan Schmittgen, 2001) sesuai acuan Bustin and Nolan (2004) dan Bustin *et al.* (2009) dilanjutkan dengan Uji BNT pada selang kepercayaan 95%.

*Analisis Level Metilasi DNA Genom*

Level metilasi DNA ditentukan dengan kombinasi hidrolisis DNA genomik menggunakan enzim Nuklease S1 dilanjutkan dengan pemisahan menggunakan *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) menjadi nukleotida-nukleotida tunggal.

Isolasi DNA menggunakan *GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich) dilakukan sesuai prosedur dari manufaktur. Sebanyak 3.5 µg sampel DNA genomik, 50 ng µL<sup>-1</sup> *un-methylated λ*, 50 ppm larutan standar 5-Methyl-2-Deoxycytidine (MDC) dan 2-Deoxycytidine (DC), dH<sub>2</sub>O serta blanko (*no template control*) ditambahkan dengan 10% *S1 nuclease buffer 10x* (300 mM Na-asetat pH 4.6, 10 mM ZnSO<sub>4</sub>, 50% Gliserol). Seluruh sampel didenaturasi 95 °C, 10 menit sebelum didinginkan ke dalam es. Sejumlah 3 U µl<sup>-1</sup> (~ 1 µg DNA) enzim S1 Nuklease (Thermo Scientific) yang sebelumnya telah diencerkan dengan *S1 nuclease dilution buffer* (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 50 mM NaCl, 50% gliserol) ditambahkan dalam setiap sampel hingga mencapai volume akhir 70 µl. Sampel lalu diinkubasi 20 jam pada 37°C kemudian disentrifus 5 menit pada 15,000 g sebelum dielektroforesis untuk mengkonfirmasi hasil pencacahan DNA.

Sampel disuntikkan ke dalam kolom berukuran 100 mm x 2.1 mm yang berisi partikel ACQUITY UPLC BEH C-18 berukuran 1.7 µm dan dipisahkan dengan alat Waters® ACQUITY UPLC™ System. Elusi dilakukan dalam fase gerak pada 97% buffer KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dan 3% metanol pH 4.2 dengan kecepatan alir 1 mL menit<sup>-1</sup> pada suhu ruang dan dideteksi pada panjang gelombang 254 nm. Luas peak nukleotida tunggal dari standar DC dan MDC selanjutnya digunakan untuk mengkuantifikasi konsentrasi kandungan sitidin ([C]) dan 5-metilsitidin ([5-mC]) pada sampel, dengan rumus:

$$\frac{\text{Luas area sampel}}{\text{Luas area standar}} \times \text{Konsentrasi standar}$$

Persentase kandungan 5-metilsitidin (5 mC) dari DNA genom kelapa sawit dihitung dengan rumus :  $([5 \text{ mC}] / [5 \text{ mC} + \text{C}]) \times 100\%$  (Kubis *et al.*, 2003).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

*Sintesis cDNA Total*

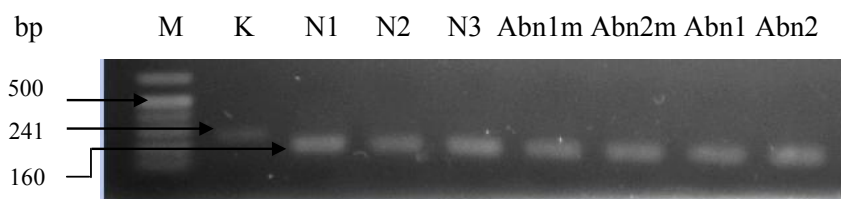
cDNA disintesis melalui transkripsi balik dengan menggunakan cetakan RNA total dan primer oligo-dT sehingga cDNA yang terbentuk hanya berasal dari mRNA yang mengandung poli-A pada ujung 3', sedangkan rRNA dan tRNA tidak. PCR dengan menggunakan primer ActF dan ActR untuk mengamplifikasi ekson2-ekson3 dari *EgACT1* menghasilkan DNA yang berukuran sekitar 160 pb (Gambar 1) yang menunjukkan bahwa daerah yang teramplifikasi adalah cDNA ekson2-ekson3 bukan DNA ekson2-ekson3 dari *EgACT1*. Kontrol DNA menghasilkan pita berukuran sekitar 241 pb, lebih besar dari cDNA karena mengandung intron di antara ekson2 – ekson3 yang dibuang pada saat pembentukan mRNA (Shah *et al.*, 1982).

Teramplifikasinya cDNA dengan primer *ActF* dan *ActR* dengan ukuran 160 pb menunjukkan bahwa sintesis cDNA total melalui proses transkripsi balik telah berlangsung dengan baik. Menurut Muzuni *et al.* (2010) hal ini juga menunjukkan bahwa RNA total yang telah diisolasi mempunyai kualitas yang sangat bagus yang terbebas dari kontaminasi DNA sehingga dapat digunakan untuk mensintesis cDNA. Oleh sebab itu, cDNA total ini dapat digunakan sebagai cetakan untuk mengamplifikasi fragmen cDNA *EgAGL6*, *EgAG2*, *EgAGA* dan *EF1-α1* dengan qPCR.

*Kuantifikasi Ekspresi Gen EgAGL6, EgAG2 dan EgAGA dengan Quantitative Real-Time PCR (qPCR)*

*Gen EgAG2 dan EgAGA*

Level ekspresi gen *EgAG2* antara buah mantel Abn m dan Abn dengan buah normal tidak berbeda nyata. Level ekspresi gen *EgAGA* antara buah mantel Abn m dan Abn dengan buah normal berbeda nyata, dimana rasio ekspresi *EgAGA* pada Abn dan Abn m relatif terhadap normal adalah sebesar 1.71 kali N dan 1.48 kali N (Gambar 2, Tabel 1).



Gambar 1. Hasil amplifikasi *EgACT1*. 1 = marker 1 kb; 2 = hasil amplifikasi dengan DNA genom sebagai cetakan (kontrol); 3-9 = hasil amplifikasi dengan cDNA sampel sebagai cetakan (3 = N1; 4 = N2; 5 = N3; 6 = Abn1m; 7 = Abn2m; 8 = Abn1; 9 = Abn2)

Gen-gen di dalam subfamili *AGAMOUS* termasuk ke dalam gen *MADS*-box kelas C/D yang terlibat dalam pembentukan karpel pada bunga (Adam *et al.*, 2007). Menurut Stern *et al.* (2003) tipe buah drupa seperti kelapa sawit berkembang dari bunga dengan ovari tipe superior dimana buah berkembang hanya dari jaringan ovari, yaitu karpel. Tadiello *et al.* (2009) melaporkan bahwa transkrip gen *PpPLENA* pada buah peach (*drupe-like*) lebih berlimpah di karpel, menandakan bahwa gen tipe C adalah yang paling berperan dalam pembentukan karpel. Hetharie, (2008) menyatakan bahwa buah mantel mempunyai karpel tambahan. Kehadiran karpel tambahan pada buah mantel diduga merupakan penyebab lebih tingginya level ekspresi gen *EgAGA* pada buah abnormal.

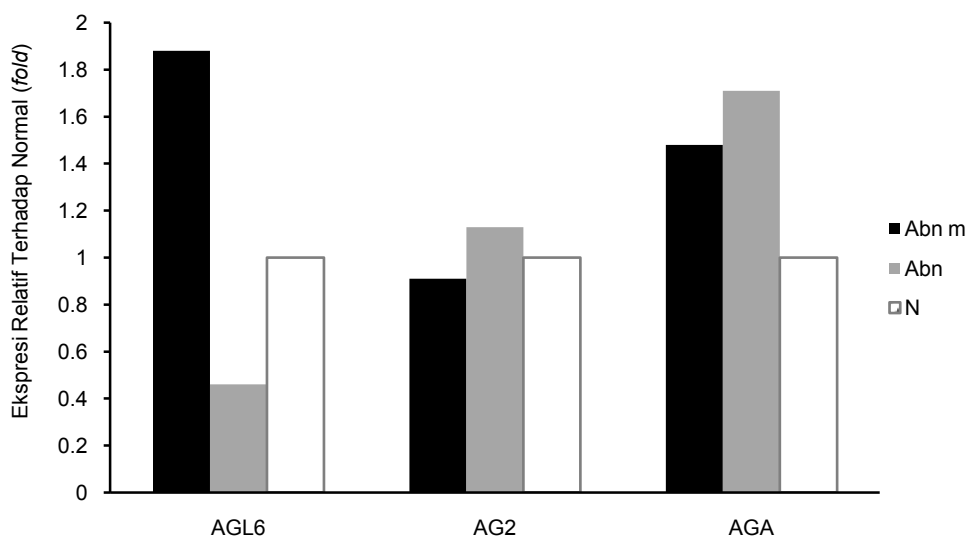
Peningkatan level ekspresi *EgAGA* dari buah abnormal Abn m ke Abn diduga disebabkan karena buah Abn telah mengalami perkembangan lebih lanjut dibandingkan dengan buah Abn m. Menurut Seymour *et al.* (2008) sebagian besar gen yang terlibat dalam perkembangan karpel terlihat juga memiliki fungsi dalam perkembangan dan pemasakan buah. Tadiello *et al.* (2009) melaporkan bahwa transkrip gen *PpPLENA* juga meningkat seiring fase pemasakan pada mesokarp buah peach.

### Gen *EgAGL6*

Level ekspresi gen *EgAGL6* pada Abn m sebesar 1.88 kali lipat normal sementara pada Abn sebesar 0.46 kali lipat normal. Namun ekspresi *EgAGL6* antara buah Abn m dengan buah normal tidak berbeda nyata, sedangkan ekspresi *EgAGL6* antara buah Abn dengan buah normal berbeda nyata, pada BNT 5% (Gambar 2, Tabel 1).

Tranbarger *et al.* (2011) melaporkan bahwa berdasarkan analisis filogenetik gen *MADS*-box buah kelapa sawit normal ditemukan satu contig, yaitu CL1Contig 5666 yang berhubungan dekat dengan gen *AtAGL6* (*AGL6* pada *Arabidopsis thaliana*). Transkrip gen ini mencapai puncaknya pada 100 hari setelah polinasi (akhir fase II) dan menurun seiring proses pematangan dan pemasakan. Oleh karena itu, gen ini termasuk ke dalam *subclade* SEP 4. Diduga gen ini adalah gen *AGL6* kelapa sawit (*EgAGL6*).

Gen *RIN* (*ripening inhibitor*) pada buah tomat termasuk ke dalam *subclade* SEP4. Apabila gen ini termutasi maka akan menunjukkan fenotip yang normal pada buah (Vrebalov *et al.*, 2002). Gen *RIN* mengkode suatu regulator transkripsi dan meregulasi ekspresi dari gen lain yang berperan dalam proses pemasakan (Vrebalov *et al.*, 2002; Manning *et al.*,



Gambar 2. Ekspresi relatif gen *EgAGL6*, *EgAG2* dan *EgAGA* pada buah kelapa sawit Abn dan Abn m, terhadap normal

Tabel 1. Nilai ekspresi gen *EgAGL6*, *EgAG2*, dan *EgAGA* pada berbagai parameter abnormalitas buah kelapa sawit

Parameter abnormalitas	Ekspresi gen					
	<i>EgAGL6</i>		<i>EgAG2</i>		<i>EgAGA</i>	
	BNT 5% = 0.75	Rasio terhadap normal (kali)	BNT 5% = 0.91	Rasio terhadap normal (kali)	BNT 5% = 0.32	Rasio terhadap normal (kali)
Normal	4.87a	1.00	4.73a	1.00	7.13b	1.00
ABN	6.17b	0.46	4.58a	1.13	6.35a	1.71
ABN m	4.13a	1.88	4.90a	0.91	6.56a	1.48

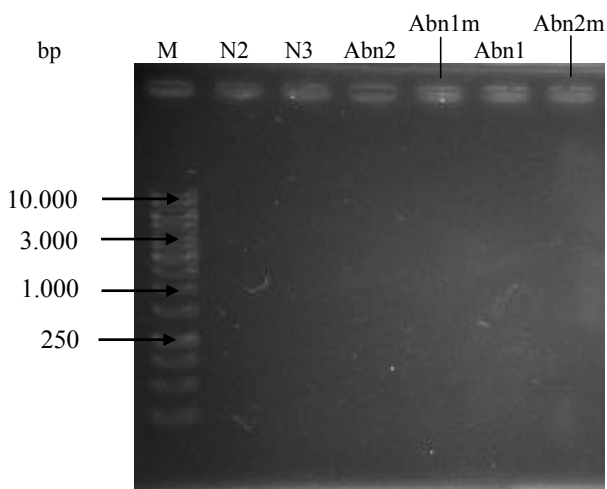
Keterangan: Angka rata-rata yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan hasil berbeda nyata pada uji BNT 5%

2006; Ito *et al.*, 2008). *RIN* berinteraksi dengan promoter gen yang terlibat dalam jalur pemasakan utama diantaranya sintesis etilen (Barry, 2007; Ito *et al.*, 2008), metabolisme dinding sel (Marin-Rodriguez *et al.*, 2002) dan akumulasi karoten (Bramley, 2002). Oleh karena itu Martel *et al.* (2011) menyatakan *RIN* sebagai master regulator pada proses pemasakan yang secara langsung mempengaruhi proses-proses yang terkait pemasakan. Ito *et al.* (2008) menyatakan bahwa *RIN* dapat menempeli CarG-box dan Fujisawa *et al.* (2011) mengkonfirmasi penempelan *RIN* ke gen yang terlibat dalam sintesis etilen dan metabolisme dinding sel, karena promoter gen tersebut mengandung sekuens CarG-box.

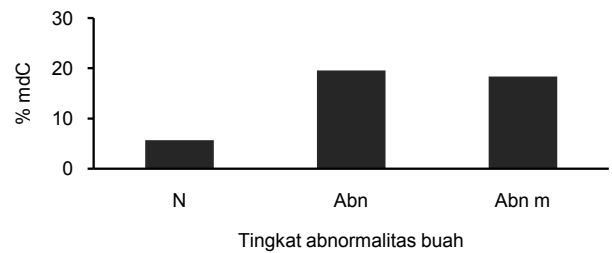
Pengelompokan gen *EgAGL6* dan gen *RIN* pada tomat (*S/RIN*) dalam satu *subclade* yang sama, memungkinkan kemiripan perkembangan buah mantel kelapa sawit dengan buah mutan *RIN* pada tomat. Hetharie (2008) menyatakan bahwa pada sebagian besar buah mantel kelapa sawit dengan tipe abnormalitas sangat berat yang berada dalam satu tandan, terjadi penghambatan pematangan sebelum dan saat tanaman memasuki fase buah agak matang yang kemudian mulai membusuk. Hal ini diduga terjadi karena penghambatan produksi etilen. Selain itu, mesokarp yang dihasilkan lebih berserat bahkan berkayu. Diduga hal ini berkaitan dengan penurunan atau bahkan penghentian aktivitas transkripsi gen-gen yang terlibat dalam proses pelunakan dinding sel.

*Kuantifikasi Level Metilasi DNA Genom dengan Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)*

Analisis kuantitatif DNA membutuhkan DNA yang murni sehingga apabila dicacah dengan enzim nuklease menjadi nukleotida tunggal, akan menunjukkan hasil yang baik karena tidak ada *smear* yang terlihat. Hal ini berarti DNA telah tercacah seluruhnya (Gambar 3).



Gambar 3. Hasil pencacahan DNA genomik oleh enzim *nuclease SI*. 1: marker 1 kb; 2-3: dua ulangan buah normal (n2, n3); 4-5: dua ulangan buah abnormal dari luar tandan (Abn1, Abn2); 6-7: dua ulangan buah abnormal dari dalam tandan (abn1m, abn2m)



Gambar 4. Perbandingan kandungan 5-metil-deoksisisitidin (mdC) antara buah normal dan abnormal. N, buah normal; Abn, buah abnormal diambil dari luar tandan; Abn m, buah abnormal diambil dari dalam tandan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa buah abnormal mengalami hipermetilasi sebesar 19.55% pada buah Abn dan sebesar 18.33% pada buah Abn m, dibandingkan dengan buah normal, yaitu 5.67% (Gambar 4).

*Hubungan Abnormalitas akibat Metilasi DNA dengan Ekspresi Gen*

Menurut Elliott dan Elliott (2009) metilasi DNA berhubungan dengan penghambatan ekspresi gen. Hal ini antara lain dapat disebabkan oleh terjadinya metilasi pada situs CpG di dalam sekuens gen-gen normal yang merupakan situs penempelan faktor transkripsi (Medvedeva, 2013), metilasi pada *binding protein* yang menempel pada faktor transkripsi (Manning *et al.*, 2006), metilasi pada histon yang akan menginduksi histon deasetilasi dan menuntun kepada *silencing* daerah heterokromatin (Jorgensen *et al.*, 2013), atau metilasi pada micro-RNA (Betel *et al.*, 2008).

Hipermetilasi yang terjadi pada buah mantel kelapa sawit mengindikasikan adanya gen-gen yang seharusnya terekspresi tetapi menjadi tidak terekspresi. Hipermetilasi ini salah satunya dibuktikan oleh menurunnya level ekspresi gen *EgAGL6*. Manning *et al.* (2006) dan Seymour *et al.* (2008) melaporkan bahwa metilasi DNA berperan dalam regulasi pemasakan buah. Zhong *et al.* (2013) membuktikan melalui perlakuan perendaman buah dengan 5-azacytidine (inhibitor metiltransferase) akan menyebabkan buah menjadi masak premature. Lebih lanjut dibuktikan melalui percobaan bisulfit sekuensing, bahwa hipermetilasi yang terjadi pada lokus gen *S/CNR* (*Colorless non Ripening*) akan menghambat perkembangan buah tomat. Daerah yang mengalami hipermetilasi ini, mengalami demetilasi pada *wild-type*.

**KESIMPULAN**

Level ekspresi gen *EgAGL6* adalah sebesar 1.88 kali lipat normal pada Abn m dan 0.46 kali lipat normal pada Abn. Penurunan level ekspresi *EgAGL6* pada Abn sangat berbeda nyata dengan buah normal, sedangkan peningkatan level ekspresi *EgAGL6* pada Abn m tidak berbeda nyata dengan buah normal. Level ekspresi gen *EgAG2* adalah sebesar 0.91 kali lipat normal pada Abn m dan 1.13 kali lipat normal pada Abn. Level ekspresi *EgAG2* pada Abn m maupun Abn

tidak berbeda nyata dengan buah normal setelah diuji pada BNT 5%. Level ekspresi gen *EgAGA* adalah sebesar 1.48 kali lipat normal pada Abn m dan 1.71 kali lipat normal pada Abn. Peningkatan level ekspresi *EgAGA* antara buah Abn m maupun Abn dengan buah normal berbeda nyata setelah diuji pada BNT 5%. Buah mantel mengalami metilasi pada DNA genom sebesar 18.33-19.55% sedangkan buah normal 5.67%. Hipermetilasi ditunjukkan oleh menurunnya level ekspresi gen *EgAGL6* pada buah mantel Abn.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada PT. SMART, Tbk yang telah mendanai penelitian ini dan kepada Bakrie Center Foundation sebagai sponsor biaya pendidikan.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Adam, H., S. Jouannic, E.Y. Duval, J.L. Verdeil, W. Tregear. 2005. Reproductive developmental complexity in the African oil palm (*Elaeis guineensis*, Arecaceae). *Am. J. Bot.* 92:1836-1852.
- Adam, H., S. Jouannic, Y. Orioux, F. Morcillo, F. Richaud, Y. Duval, J.W. Tregear. 2007. Functional characterization of MADS-box genes involved in the determination of oil palm flower structure. *J. Exp. Bot.* 58:1245-1259.
- Barry, C.G.J. 2007. Ethylene and fruit ripening. *J. Plant Growth Regul.* 26:143-159.
- Betel, D., M. Wilson, A. Gabow, D.S. Marks, C. Sander. 2008. The microRNA.org resource: target and expression. *Nucleic Acids Res.* 36:149-153.
- Bramley, P.M. 2002. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J. Exp. Bot.* 53:2107-2113.
- Bollati, V., A. Baccarelli. 2010. Environmental epigenetics. *Heredity* 105:105-112.
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2013. Statistik Kelapa Sawit Indonesia. Katalog BPS. Badan Pusat Statistik. Jakarta.
- Bustin, S.A., T. Nolan. 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J. Biomolecular Techniques* 15:155-166.
- Bustin, S.A., V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, C.T. Wittwer. 2009. The MIQE guidelines : Minimum information for the publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55:611-622.
- Elliot, W.H., D.C. Elliot. 2009. *Biochemistry and Molecular Biology* 4<sup>th</sup> Ed. Oxford University Press Inc., New York.
- Fujisawa, M., T. Nakano, Y. Ito. 2011. Identification of potential target genes for the tomato fruit-ripening regulator *RIN* by chromatin immunoprecipitation. *BMC Plant Biol.* 11:26.
- Hetharie, H. 2008. Abnormalitas bunga dan buah pada klon kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) berdasarkan analisis morfologi, biokimia dan DNA genom. Disertasi. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Ito, Y., M. Kitagawa, N. Ihashi, K. Yabe, J. Kimbara, J. Yasuda, H. Ito, T. Inakuma, S. Hiroi, T. Kasumi. 2008. DNA-binding specificity, transcriptional activator potential, and the *rin* mutation effect for the tomato fruit-ripening regulator *RIN*. *Plant J.* 55:212-223.
- Jorgensen, S., G. Schotta, C.S. Sorensen. 2013. Histone H4 lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic Acids Res.* 41:2797-2806.
- Kubis, S.E., A.M.M.F. Castilho, A.V. Vershinin, J.S. Heslop-Harrison. 2003. Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant Mol. Biol.* 52:69-79.
- Kubista, M., J.M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonak, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjoback, B. Sjogreen, L. Strombom, A. Stahlberg, N. Zoric. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 27:95-125.
- Livak, K.J., T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> Method. *Methods* 25:402-408.
- Manning, K., M. Tor, M. Poole, Y. Hong, A.J. Thompson, G.J. King, J.J. Giovannoni, G.B. Seymour. 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat. Genet.* 38:948-952.
- Marin-Rodriguez, M.C., J. Orchard, G.B. Seymour. 2002. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *J. Exp. Bot.* 53:2115-2119.
- Martel, C., J. Vrebalov, P. Tafelmeyer, J.J. Giovannoni. 2011. The tomato MADS-box transcription factor *ripening inhibitor* interacts with promoters involved in numerous ripening processes in a *colorless non ripening*-dependent manner. *Plant Physiol.* 157:1568-1579.

- Medvedeva, Y.A., A.M. Khamis, I.V. Kulakovskiy, W. Ba-Alawi, M.S.I. Bhuyan, H. Kawaji, T. Lassmann, M. Harbers, A.R.R. Forest, V.B. Bajic. 2013. Effects of cytosine methylation on transcription factor binding sites. *BMC Genomics* 15:119.
- Muzuni, D. Sopandie, U.W. Suharsono, Suharsono. 2010. Isolasi dan pengklonan fragmen cDNA gen penyandi H<sup>+</sup>-ATPase membran plasma dari *Melastoma malabatricum* L. *J. Agron. Indonesia* 38:67-74.
- Seymour, G., M. Poole, K. Manning, G.J. King. 2008. Genetics and epigenetics of fruit development and ripening. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11:58-63.
- Shah, D.M., R.C. Hightower, R.B. Meagher. 1982. Complete nucleotide sequence of a soybean actin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:1022-1026.
- Stern, K.R., S. Jansky, J.E. Bidlack. 2003. *Introductory Plant Biology* 9<sup>th</sup> Ed. Mc.Graw-Hill Companies Inc., New York.
- Shearman, J.R., C. Jantasuriyarat, D. Sangsraku, T. Yoocha, A. Vannavichit, S. Tangphatsornruang, S. Tragoonrung. 2012. Transcriptome assembly and expression data from normal and mantled oil palm fruit. dataset paper in biology. hindawi publishing Corporation. <http://dx.doi.org> [20 Juni 2013].
- Tadiello, A., A. Pavanello, D. Zanin. E. Caporali, L. Colombo, G.L. Rotino, L. Trainotti, G. Casadoro. 2009. A PLENA-like gene of peach is involved in carpel formation and subsequent transformation into a fleshy fruit. *J. Exp. Bot.* 60:651-661.
- Tranbarger, T.J., S. Dussert, T. Joet, X. Argout, M. Summo, A. Champion, D. Cros, A. Omore, B. Nouy, F. Morcillo. 2011. Regulatory mechanism underlying oil palm fruit mesocarp maturation, ripening, and functional specialization in lipid and carotenoid metabolism. *Plant Physiol.* 156:564-584.
- Vrebalov, J., D. Ruezinsky, V. Padmanabhan, R. White, D. Medrano, R. Drake, W. Schuch, J. Giovannoni. 2002. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at tomato *ripening-inhibitor (rin)* locus. *Science* 296:343-346.
- Yang, I., M.C. Fortin, J.R. Richardson, B. Buckley. 2011. Fused-core silica column ultra performance liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry for determination of global DNA methylation status. *Ann. Biochem.* 409:138-143.
- Zhong, S., Z. Fei, Y.R. Chen, Y. Zheng, M. Huang, J. Vrebalov, R. McQuinn, N. Gapper, B. Liu, J. Xiang, Y. Shao, J.J. Giovannoni. 2013. Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. *Nat. Biotech.* 13:154-159.