

PELACAKAN FRAGMENT GEN PENYANDI ENZIM β -KETOASIL-ACP SINTASE II (KAS II) DARI MESOKARP KELAPA SAWIT (*ELAEIS GUINEENSIS* JACQ. L.)

Yohanes Chandrawijaya¹, Teuku Tajuddin², Hermin Pancasakti K¹,
Anto Budiharjo¹

1. Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro,
Semarang. Telepon (024) 7474754; Fax (024) 76480690

2. Laboratorium Teknologi Gen, Balai Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) Puspitek
Serpong, Tangerang. Telepon (021) 7563120; Fax (021) 7560208

Email : yohanezchandra@yahoo.com

Abstract

The standard of quality is one of the determining values of crude palm oil as an international trade commodity. Better standard of quality for crude palm oil is a constant demand of the market. Quality improvement can be made by increasing the contents of oleic acid in the mesocarp of *E. guineensis*. Among the uses of oleic acid are as follows: anti-carcinogenic agent, anti-oxidant, source of pro-vitamin A, and source of Vitamin E. Oleic acid is a form of non-saturated fatty acid encoded by KAS II genes. The expression profiling of KAS II is achieved through isolation of total RNA by Trizol reagent, RNA purification, using DNase RNase free, synthesis of cDNA using Reverse Transcription PCR approach, and amplification of KAS II genes with Nested PCR approach. The amplification process of KAS II genes is carried out using both internal and external primers. The first step of the external primer PCR is F-KAS-1 and R-KAS-1. Internal primer of PCR in the second step is F-KAS-2 and R-KAS-2. The results of this research are fragments of KAS II genes between 1500–2000 bp. These amplicons are suitable with primers designed at the approximation of 1796 bp. Selection of three amplicons at the annealing temperatures of 54°C, 55.9°C, and 58°C shows good DNA band visualizations. Annealing at 58°C shows the best result with high intensity DNA band and no smear. Further research is needed to determine the accuracy of the amplicons through sequencing step.

Keywords: KAS II, *Elaeis guineensis*, annealing, Nested PCR, RT-PCR.

Abstrak

Standar mutu minyak sawit menjadi suatu daya saing ekonomi di pasar internasional. Permintaan minyak sawit dunia dengan standar kualitas yang lebih baikpun semakin meningkat. Upaya peningkatan mutu minyak sawit dilakukan dengan cara meningkatkan kadar asam oleat pada mesokarp *E. guineensis*. Ragam manfaat asam oleat antara lain: antikanker, antioksidan, provitamin A dan vitamin E. Asam oleat merupakan asam lemak tak jenuh yang disandi oleh gen KAS II. Penelitian ini bertujuan untuk melacak fragmen gen KAS II dari mesokarp *E. guineensis*. Pelacakan gen KAS II ditempuh dengan beberapa tahapan yaitu isolasi RNA total dengan Trizol reagent, purifikasi RNA dengan DNase RNase free, pembuatan cDNA melalui pendekatan Reverse Transcription PCR dan Amplifikasi gen KAS II melalui pendekatan Nested PCR Amplifikasi gen KAS II menggunakan dua primer yaitu eksternal dan internal. Primer eksternal pada PCR tahap pertama yaitu F-KAS-1 dan R-KAS-1. Primer internal pada PCR tahap kedua yaitu F-KAS-2 dan R-KAS-2. Hasil penelitian diperoleh fragmen gen KAS II pada kisaran 1500-2000 pb. Amplicon tersebut sesuai dengan

primer yang dirancang sebesar 1796 pb. Seleksi ketiga amplicon pada variasi suhu annealing 54°C, 55,9°C dan 58°C menunjukkan visualisasi pita DNA yang baik. Suhu annealing 58°C menghasilkan amplicon terbaik dengan visualisasi pita DNA berintensitas tebal tanpa smear. Penelitian lanjutan diperlukan untuk menentukan akurasi amplicon melalui tahapan sekuensing.

Kata kunci : KAS II, *Elaeis guineensis*, annealing, Nested PCR, RT-PCR

Pendahuluan

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq. L.) merupakan tanaman monokotil famili Palmae yang memiliki kuantitas produksi minyak nabati terbesar di dunia (Nakkaew et al., 2010). Minyak sawit memiliki keunggulan antara lain: sebagai sumber provitamin A (Kritchevsky et al., 1992). Minyak sawit juga merupakan sumber tokoferol dan vitamin E yang berfungsi sebagai antioksidan (Tan, 1992). Minyak sawit juga berperan sebagai sumber kalori tinggi yang tidak mudah teroksidasi (Siregar, 2006). Komoditi minyak sawit Indonesia merupakan salah satu peluang ekspor untuk meningkatkan pendapatan dan devisa negara.

Prospek lahan kelapa sawit di Indonesia pada tahun 2005-2010 mencapai 9,2 juta ha dengan kapasitas produksi hingga 21 juta ton/tahun. Perolehan produksi minyak sawit di Indonesia menyokong hampir setengah total produksi minyak sawit dunia sebesar 45 juta ton/tahun, sehingga Indonesia dinobatkan sebagai negara eksportir minyak sawit terbesar di dunia. Hingga tahun 2010, pencapaian produksi minyak sawit dunia mencapai 29.210 juta ton, sehingga belum mampu mencukupi konsumsi minyak sawit dunia sebesar 154.109 juta ton. Peningkatan kuantitas produksi minyak sawit diperlukan untuk mencukupi konsumsi minyak sawit dunia (Teoh, 2010; USDA 2010).

Kualitas minyak sawit dapat ditinjau dari kandungan asam lemak jenuh dan tak jenuh. Tingginya kandungan asam lemak tak jenuh (10-11% asam linoleat) pada minyak sawit merupakan suatu keunggulan, karena dengan komposisi demikian bersifat stabil terhadap oksidasi maupun pemanasan tinggi. Tingginya kandungan asam palmitat sebagai asam lemak jenuh dalam minyak sawit sebesar 44-45% menjadi kendala dalam persaingan global dengan beberapa minyak nabati lain. Oleh karena itu, untuk meningkatkan daya saing penjualan minyak kelapa sawit di pasar global diperlukan penyediaan benih dengan potensi produksi yang tinggi dan peningkatan kandungan asam oleat (Budiani dan Purba, 2010).

Enzim KAS II merupakan salah satu enzim kunci yang terlibat dalam jalur pembentukan asam lemak tak jenuh khususnya asam oleat (Budiani, 2005). Industri kelapa sawit berpotensi untuk mendapat nilai tambah sebesar US\$ 1.500/ha tiap tahun apabila kandungan asam oleatnya lebih dari 65% (Madon et al., 2005).

Salah satu upaya yang dapat digunakan untuk meningkatkan produksi asam oleat dapat diawali melalui teknik rekayasa genetika yaitu pelacakan fragmen gen β -ketoasil-ACP sintase II (KAS II) dari mesokarp *E. guineensis*. Penelitian tersebut dianggap perlu karena keterbatasan ekspresi gen KAS II pada jaringan penghasil minyak mesokarp *E.*

guineensis (Utomo, 2006). Publikasi penelitian genetika dalam lingkup kelapa sawit juga diharapkan dapat digunakan sebagai rujukan untuk peningkatan kualitas kelapa sawit transgenik (Cloonan et al., 2008; Hass & Zody, 2010).

Langkah penelitian awal dapat dilakukan dengan cara mengisolasi RNA total mesokarp *E. guineensis*, purifikasi RNA, pembuatan cDNA melalui pendekatan Reverse Transcription dan amplifikasi Nested PCR. Penelitian ini bertujuan untuk melacak fragmen gen KAS II dari mesokarp *E. guineensis* varietas Tenera yang berperan penting dalam biosintesis asam oleat. Hasil dari penelitian ini diharapkan sebagai bahan rujukan untuk melanjutkan penelitian pada proses kloning gen dan transformasi. Jangka panjang hasil penelitian berguna sebagai dasar rekayasa kelapa sawit transgenik yang memiliki kemampuan memproduksi minyak dengan kuantitas dan kualitas tinggi.

Metode Penelitian

Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Gen, Balai Pengkajian dan Penerapan Teknologi Puspitek Serpong Tangerang mulai Oktober 2012 hingga Desember 2012.

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain: mortar porselen, pestle, gelas beker, gelas ukur, labu erlenmeyer, gunting, pinset, ice box, glove, masker, set elektroforesis, microcentrifuge, tabung microcentrifuge, UV transluminator, neraca analitik, mesin PCR (Thermal Cycler Analyzer), PCR tube, mikropipet,

tip, tip filter, spectrophotometer nanodrop, parafilm, microwave, heat block, vacuum pump, desicator, digital camera, refrigerator -20°C dan -70°C.

Bahan

Bahan yang digunakan adalah bahan tanaman dan bahan kimia. Bahan tanaman berupa sampel mesokarp buah kelapa sawit (*Elaeis guineensis*) varietas Tenera yang diambil dari lahan kelapa sawit BPPT Puspitek Serpong kawasan perbatasan Bogor.

Bahan kimia yang digunakan antara lain: Bahan isolasi RNA Invitrogen Trizol Reagent Kits RNase zap, RNase inhibitor, alkohol 70%, tisu, dan nitrogen cair. Bahan purifikasi RNA antara lain: DNase RNase free Thermo Scientific Kits dan sampel RNA (1 µg/µl). Bahan pembuatan cDNA antara lain: Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Roche Kits dan sampel RNA (1 µg/µl).

Bahan Elektroforesis gel agarose : agarose 1% (30 ml buffer TAE 1x dan 0,3 gr agarose), TAE buffer 0,5x, DNA loading dye, gel red staining, DNA marker aliquote plus Ladder

Cara Kerja Penelitian

a. Isolasi RNA Total dari Mesokarp *E. guineensis* dengan Trizol Reagent Kits

Sampel mesokarp *E. guineensis* dari mesokarp *E. guineensis* varietas Tenera digunakan untuk tahap isolasi RNA total. Isolasi RNA total dengan Trizol Reagent Kits menggunakan metode Rhea (2011). Untuk mengendapkan RNA digunakan Trizol, klorofom, isopropanol, DEPC treated water. Uji kualitatif RNA dilakukan melalui elektroforesis gel agarose 1% yang ditambah dengan 0,7 µL gel red staining pada tegangan 50 Volt. Uji kualitatif dapat digunakan untuk

melihat parameter keberhasilan sementara dari isolasi RNA total dengan kemunculan pita 28S dan 18S rRNA. Uji kuantitatif RNA dilakukan melalui pengukuran konsentrasi dan kemurnian pada serapan panjang serapan gelombang 260 nm dengan 280 nm menggunakan spectrophotometer nanodrop (Sambrook & Russel, 2001).

b. Purifikasi RNA dengan DNase RNase free Thermo Scientific Kits Tahap purifikasi RNA melalui resuspensi antara RNA (1 µg/µL) dengan DNase RNase free Thermo Scientific Kits dengan menggunakan metode Wiame (2000) dan Zilienskiene (2012).

c. Pembuatan cDNA dengan Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kits melalui Pendekatan Reverse Transcription PCR Tahap pembuatan cDNA menggunakan metode Roche (2006) beserta penggunaan Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kits melalui pendekatan Reverse Transcription. Sampel cDNA dapat disimpan pada refrigerator suhu -20°C.

d. Amplifikasi Gen KAS II dengan Fast Start Enzyme melalui pendekatan Nested PCR

Tahap amplifikasi gen KAS II terdiri dari dua tahap yaitu tahap PCR I (primer eksternal) dan PCR II (primer internal) (Roche, 2005). Konsentrasi minimal cDNA yang digunakan untuk kedua tahap PCR yaitu 0,1-0,2 µg/µL. Pengaturan suhu: inisiasi denaturasi (96°C, 3 menit), denaturasi (96°C, 45 detik), annealing (56°C, 30 detik), elongasi (72°C, 2 menit), final elongasi (72°C, 7 menit). Siklus diulang

sebanyak 30x. Tahap PCR II memiliki kemiripan dengan perlakuan PCR I. Perbedaan perlakuan yaitu terdapat pada primer dan suhu PCR. Optimasi suhu ulangan I: inisiasi denaturasi (96°C, 3 menit), denaturasi (96°C, 45 detik), annealing (54°C, 30 detik), elongasi (72°C, 2 menit), final elongasi (72°C, 7 menit). Optimasi suhu annealing pada ulangan II dan III memiliki program suhu yang sama dengan optimasi suhu annealing masing-masing 55,9 °C dan 58°C. Siklus diulang sebanyak 30x.

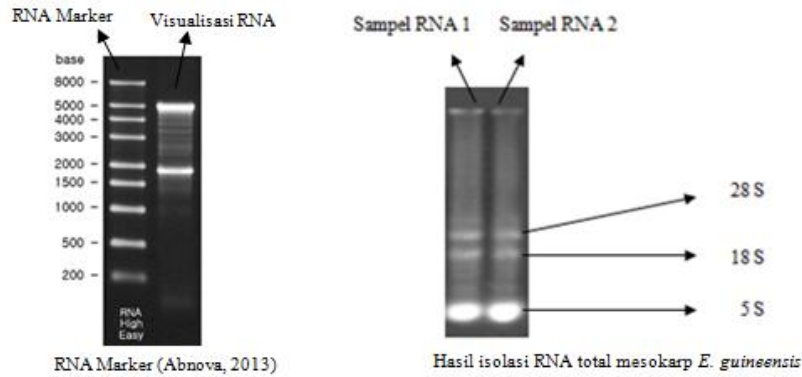
Analisis Data

Amplifikasi Gen KAS II metode Fast Start Enzyme memiliki parameter keberhasilan dengan terbentuknya visualisasi full length amplicon berkisar 1796 pb.

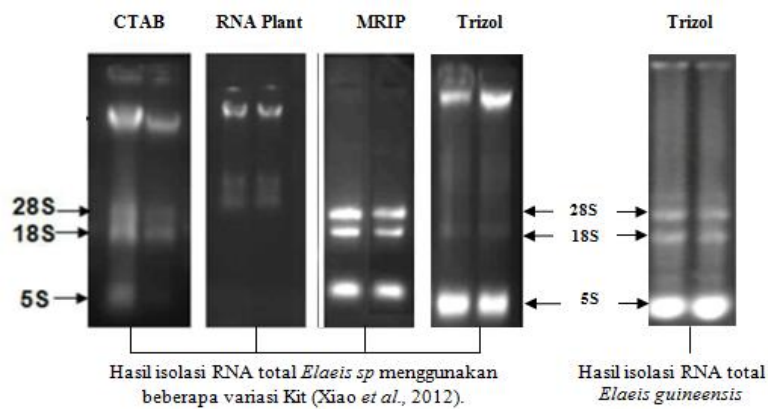
Hasil dan Pembahasan

Tahap Isolasi RNA total dari mesokarp *E. guineensis* varietas Tenera telah berhasil dilakukan. Hasil isolasi RNA total pada Gambar 1 dapat dinilai dari segi kualitas dan kuantitas RNA. Hasil pengamatan kualitas melalui visualisasi pita RNA terdapat keberadaan 3 pita ribosomal RNA yaitu pita 28S, 18S dan 5S. Hal tersebut sudah sesuai dengan parameter keberhasilan isolasi RNA (Sambrook et al., 1989; Soares & Bonaldo, 1998).

Keberadaan pita 5S tidak mempengaruhi kualitas sampel RNA, sehingga tidak mengganggu proses pembuatan cDNA. Karakteristik penggunaan Trizol pada isolasi RNA total *Elaeis sp* dapat dilihat pada Gambar 2. Kuantitas RNA dapat diukur dari konsentrasi dan tingkat kemurniannya menggunakan spectrophotometer nanodrop disajikan pada Tabel 1.



Gambar 1. Visualisasi RNA total mesokarp *E. guineensis*



Gambar 2. Perbandingan hasil isolasi RNA total *Elaeis guineensis* dengan hasil isolasi beberapa RNA Isolation Kits.

Kemunculan pita 5S pada elektroforesis gel agarose disebabkan oleh penggunaan Trizol RNA Isolation Kits. Xiao et al. (2012) dan Tattersall et al. (2005) memperkuat pernyataan tersebut bahwa Trizol RNA Isolation Kits memiliki karakteristik yang tak dapat mengelusi pita 5S, dikarenakan jaringan tanaman berfamily palmae memiliki kelimpahan polisakarida dan polifenolik pada bagian membran sel. Hasil pengamatan kuantitas RNA pada kedua sampel memiliki konsentrasi dan kemurnian yang baik. Kedua sampel

memiliki rerata kemurnian mencapai 1,81. Kemurnian yang telah diperoleh menunjukkan RNA tidak terkontaminasi oleh protein. Hal tersebut sudah sesuai dengan kemurnian ideal RNA pada $_{260/280}$ yaitu 1,8-2,0 (Fatchiyah, 2011). Sampel RNA yang digunakan untuk tahap pembuatan cDNA yaitu sampel RNA 2. Penggunaan sampel tersebut dikarenakan sampel RNA 2 memiliki konsentrasi lebih besar dibandingkan dengan sampel RNA 1.

Tabel 1. Hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian RNA total menggunakan spectrophotometer nanodrop.

Sampel	[RNA] ng/ μ L	^{260/280}
RNA 1	2103,05	1,81
RNA 2	2387,75	1,81

Tahap purifikasi RNA merupakan langkah pemurnian RNA dari beberapa kontaminasi protein. Hasil pengukuran konsentrasi RNA pasca purifikasi adalah 801,75 ng/ μ L. Perubahan konsentrasi sebelum dan sesudah proses purifikasi yaitu 2387,75 ng/ μ L menjadi 801,75 ng/ μ L. Penurunan konsentrasi tersebut diakibatkan oleh proses

purifikasi yang melibatkan beberapa larutan Purification Kits. Konsentrasi dan kemurnian RNA pada proses purifikasi disajikan pada Tabel 2. Kualitas kemurnian RNA pada ^{260/280} yang didapatkan setelah proses purifikasi yaitu 1,81. Hasil pengukuran kemurnian tersebut menunjukkan bahwa RNA bebas dari kontaminan.

Tabel 2. Hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian RNA total pasca purifikasi menggunakan spectrophotometer nanodrop

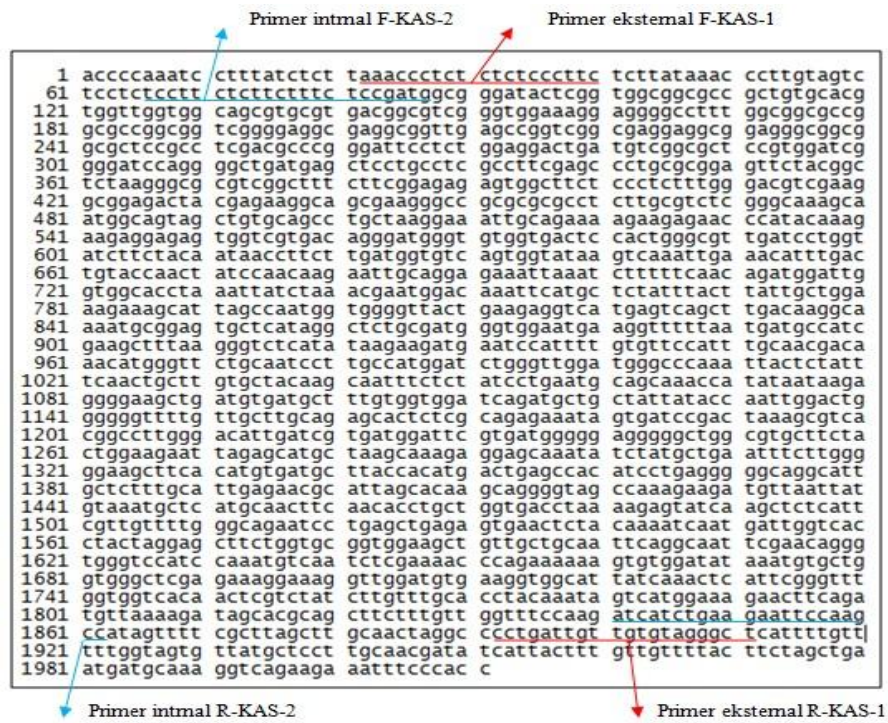
Sampel	[RNA] ng/ μ L	^{260/280}
RNA pra purifikasi	2387,75	1,81
RNA pasca purifikasi	801,75	1,81

Upaya purifikasi RNA merupakan tahapan penting menjaga kemurnian RNA terhadap kontaminasi RNase. Ribonuklease (RNase) merupakan enzim yang dapat mendegradasi RNA (Holzmann et al., 2008). Purifikasi RNA diperlukan karena struktur kimia RNA lebih rentan terhadap kontaminasi RNase dari lingkungan, jika dibandingkan dengan DNA.

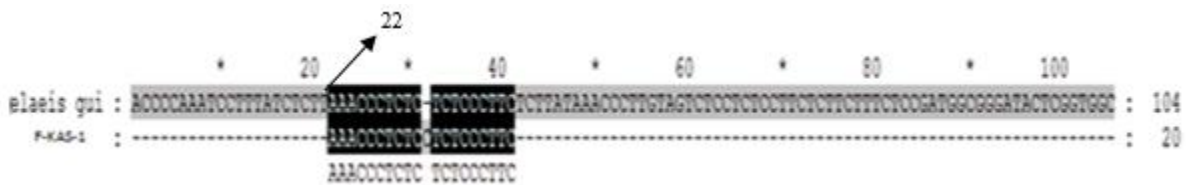
Tahap pembuatan cDNA merupakan tahapan penting dalam suatu pelacakan gen. Kualitas dan kuantitas RNA yang baik diperlukan dalam pembuatan cDNA. Konsentrasi RNA yang digunakan untuk proses pembuatan cDNA yaitu sebesar 801,75 ng/ μ L. Konsentrasi RNA sudah sesuai dengan penelitian Myers & Sigua

(1995) menyebutkan bahwa konsentrasi RNA yang baik untuk pembentukan pustaka DNA berkisar 250 ng. Kualitas RNA yang didapatkan pasca purifikasi mencapai 1,81. Kualitas tersebut sudah memenuhi standar kualitas RNA yang baik.

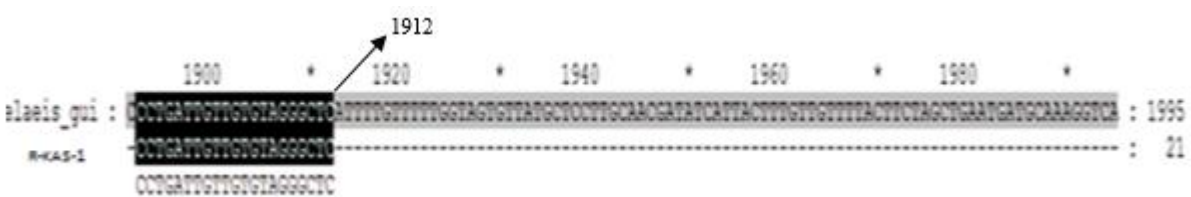
Amplifikasi Gen KAS II menggunakan reaksi PCR sebanyak dua tahap. Tahap PCR I menggunakan primer eksternal yang terletak di bagian luar, sedangkan tahap PCR II menggunakan primer internal yang terletak di bagian dalam penempelan sisi template DNA. Letak urutan basa primer pada template DNA *E. guineensis* AF2204532 disajikan pada Gambar 3.



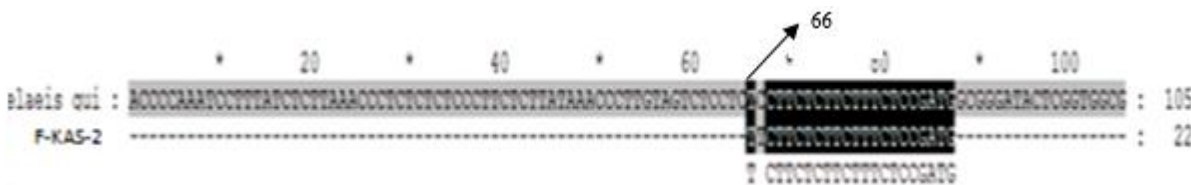
Gambar 3. Letak primer pada urutan basa E. guineensis AF2204532.



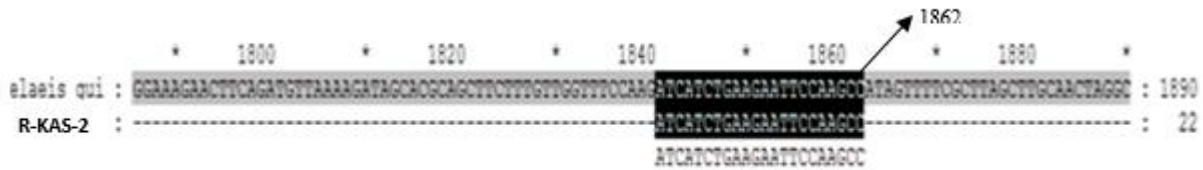
Gambar 4. Penjajaran primer eksternal F-KAS-1 dengan template DNA E. guineensis AF2204532 menggunakan program Gen Doc.



Gambar 5. Penjajaran primer eksternal R-KAS-1 dengan template DNA E. guineensis AF2204532 menggunakan program Gen Doc.



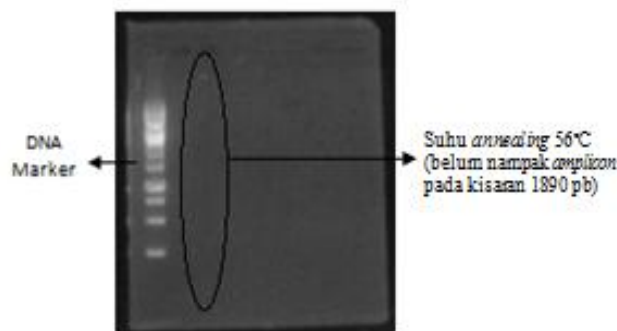
Gambar 6. Penjajaran primer eksternal F-KAS-2 dengan template DNA E. Guineensis AF2204532 menggunakan program Gen Doc.



Gambar 7. Penjajaran primer eksternal R-KAS-2 dengan template DNA *E. Guineensis* AF2204532 menggunakan program Gen Doc.

PCR tahap pertama menggunakan sepasang primer eksternal yaitu F-KAS-1 dan R-KAS-1. Primer F-KAS-1 menempel pada urutan basa ke-22 (Gambar 4), sedangkan R-KAS-1 menempel pada urutan basa ke-1912 (Gambar 5). Perancangan primer tahap pertama akan menghasilkan amplicon sebesar 1890 pb. PCR tahap kedua menggunakan sepasang primer internal yaitu F-KAS-2 dan R-KAS-2. Primer F-KAS-2 menempel pada urutan basa ke-66 (Gambar 6), sedangkan R-KAS-2 menempel pada urutan basa ke-1862 (Gambar 7). Perancangan primer pada tahap pertama akan menghasilkan amplicon sebesar 1796 pb. Chahuan et.al. (2009) menegaskan bahwa amplifikasi Nested PCR menyebabkan terbentuknya amplicon

yang berukuran lebih pendek dari produk PCR pertama. Hasil amplifikasi PCR tahap pertama dapat dilihat pada Gambar 8. Berdasarkan pengamatan pada proses PCR tahap pertama belum menunjukkan separasi DNA hasil amplifikasi. Hal tersebut menandakan bahwa suhu annealing sebesar 56°C pada PCR tahap pertama belum optimal dalam proses penempelan primer terhadap template DNA. Suhu annealing yang digunakan pada PCR tahap pertama belum tepat untuk proses annealing. Oleh karena itu diperlukan upaya optimasi suhu annealing dengan beberapa variasi suhu yang berbeda pada PCR tahap kedua.

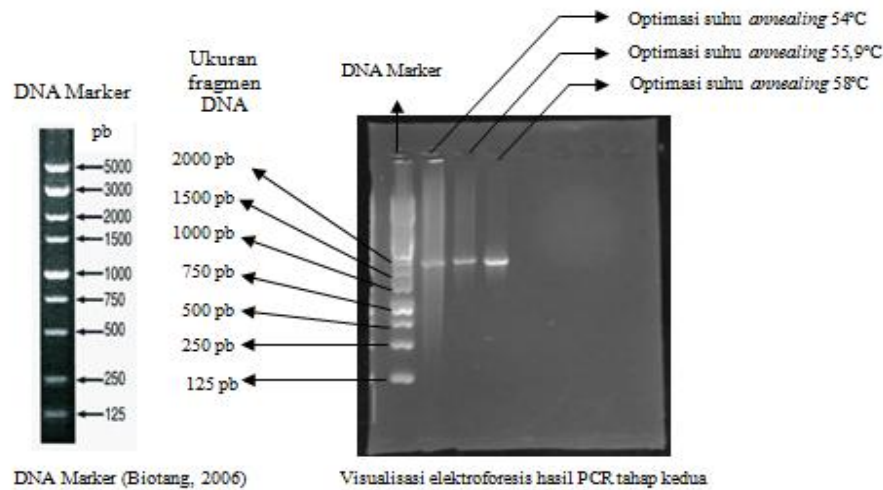


Gambar 8. Visualisasi PCR tahap pertama dengan primer eksternal

Hasil amplifikasi PCR tahap kedua dapat dilihat pada Gambar 9. Template DNA yang digunakan pada amplifikasi tahap kedua memiliki konsentrasi sebesar 529,1 ng/μL. Konsentrasi template DNA tersebut sudah memenuhi syarat untuk dilakukan PCR

tahap kedua. Reece (2004) juga menegaskan bahwa konsentrasi template DNA yang ideal untuk amplifikasi pada PCR yaitu sebesar 100 - 1000 ng untuk setiap reaksinya. Amplifikasi PCR tahap kedua menggunakan optimasi suhu PCR

dengan tiga variasi suhu annealing yang berbeda yaitu 54°C, 55,9°C dan 58°C.



Gambar 9. Visualisasi PCR tahap kedua dengan primer internal dengan optimasi suhu annealing.

Optimasi suhu annealing bertujuan untuk menghasilkan amplicon terbaik dalam proses amplifikasi. Pelacakan gen KAS II berhasil dilakukan pada ketiga variasi suhu annealing. Berdasarkan hasil pengamatan pada Gambar 4.9, visualisasi amplicon pada PCR tahap kedua menunjukkan kesejajaran ukuran antara 1500 hingga 2000 pb. Hasil tersebut sesuai dengan DNA target yang diharapkan pada kisaran 1796 pb.

Visualisasi ketiga amplicon dengan variasi suhu annealing menghasilkan perbedaan visualisasi pada masing-masing amplicon. Berdasarkan pengamatan Gambar 4.9, visualisasi amplicon dengan suhu annealing 54°C memiliki intensitas ketebalan terendah pada pita DNA. Amplicon memiliki kualitas yang kurang baik dengan keberadaan pita DNA yang belum teramplifikasi optimal (smear). Hal tersebut sesuai dengan penelitian Innis et al. (1990) yang menegaskan bahwa suhu annealing yang rendah menyebabkan primer

tidak optimal menempel pada DNA cetakan, sehingga hasil amplifikasi menjadi tidak spesifik.

Visualisasi amplicon dengan suhu annealing 55,9°C memiliki kualitas dan kuantitas cukup baik dibandingkan dengan suhu annealing 54°C. Hal tersebut ditunjukkan dengan visualisasi pita DNA yang tebal tanpa terdapat smear. Berdasarkan pengamatan pada Gambar 4.10, amplicon dengan suhu annealing tertinggi sebesar 58°C memiliki karakteristik dengan intensitas pita DNA yang lebih tebal jika dibandingkan amplicon lain. Hal tersebut sudah sesuai dengan penelitian Innis et al. (1990) yang menegaskan bahwa semakin tinggi suhu annealing yang digunakan maka pita yang teramplifikasi semakin spesifik atau sesuai dengan ukuran gen target. Visualisasi amplicon pada suhu annealing 58°C menunjukkan suhu annealing yang tepat, sehingga proses annealing dan amplifikasi berlangsung baik. Hal tersebut berimplikasi

terhadap terbentuknya amplicon yang utuh tanpa smear. Oleh karena itu perlakuan amplifikasi gen KAS II dengan suhu annealing 58°C menghasilkan amplicon dengan kualitas terbaik.

Kesimpulan

Fragmen gen KAS II telah berhasil dilacak pada kisaran ukuran amplicon 1796 pb. Amplicon terbaik didapatkan pada perlakuan suhu annealing 58°C dengan visualisasi pita DNA berintensitas tebal tanpa smear. Keakuratan ukuran amplicon dapat dikonfirmasi melalui tahapan lanjutan berupa sekuensing.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Teuku Tajuddin selaku kepala proyek penelitian; Bapak Imam Civi Cartealy selaku kepala laboratorium teknologi gen BPPT Puspitek Serpong; Ibu Siti Zulaeha dan Ibu Rahma selaku teknisi laboratorium teknologi Gen BPPT Puspitek Serpong; Ibu Hermin Pancasakti dan bapak Anto Budiharjo selaku dosen pembimbing Biologi FSM UNDIP yang telah memberikan bimbingan dalam penulisan penelitian ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

Abnova. 2013. RNA Marker. http://www.abnova.com/products/productsdetail.asp?Catalog_id=R0004. Diunduh tanggal 3 Juli 2013.

Biotang. 2006. DNA Marker. <http://www.biotangusa.com>. Diunduh tanggal 5 Juli 2013.

Budiani, A. 2005. Ekspresi Protein Spesifik dalam Biosintesis Minyak dan Kloning Gen Penyandi Ht-Accase Subunit Biotin Karboksilase dan Enoil- ACP Reduktase dari Mesokarp Kelapa

Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq). Tesis. Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.

- Budiani, A dan Purba, A.R. 2010. Kloning Fragmen Gen Penyandi - ketoacyl-ACP Synthase II dari Dua Tipe Kelapa Sawit Dengan Kandungan Asam Oleat yang Berbeda. Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Bogor Menara Perkebunan, 78(1):1-8.
- Chauhan, H. C., Kher, H. N., Chandel, B. S., Dadawala, A.L., Jain, L., Agrawal, S. M., Bhadaniya, A. 2009. Evaluation of Group Specific Nested PCR for Detection of Bluetongue Virus. *Veterinary World* 2(5):179-182.
- Cloonan, N., Forrest, A.R., Kolle, G., Gardiner, B.B., Faulkner, G.J., Brown, M.K., Taylor, D.F., Steploe, A.L., Wani, S., Bethel, G., Robertson, A.J., Perkins, A.C., Bruce, S.J., Lee, C.C., Ranade, S.S., Peckham, H.E., Manning, J.M., Kernan, K.J., and Grimmond, S.M. 2008. Stem Cell Transcriptome Profiling Via Massive Scale mRNA Sequencing. *Nat Methods* 5:613-619.
- Fatchiyah. 2011. Isolasi DNA dan RNA. <http://fatchiyah.lecture.ub.ac.id/general/dna-isolation>. Diunduh tanggal 27 November 2012.
- Holzmann, P., Frank, E., Löffler, K., Bennett, C., Gerner and Rossmann, W. 2008. RNase without RNA : Identification and Functional Reconstitution of The Human Mitochondrial tRNA Processing Enzyme. *Cell* 135(3):462-474.
- Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. and White, T. 1990. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego.

- Kritchovsky, D., Weber, M.M., and Klurfeld, D.M. 1992. Influence of Different Fats (Soybean Oil, Palm Olein or Hydrogenated Soybean Oil) on Chemically-Induced Mammary Tumors in Rat. *Nutrition Research* 12: 175-179
- Madon M, I., Maizura, R., Singh and Parveez, G.K.A. 2005. Oil Palm Improvement : MPOB's experience. In: Proc. PIPOC 2005. Petaling Jaya, 25-29 Sept.
- Myers, T. W. and C. L. Sigua. 1995. Amplification of RNA High Temperature Reverse Transcription and DNA Amplification with *Thermus thermophilus* DNA Polymerase. In : Innis, M. A., D. H. Gelfand, and J. J. Sninsky. PCR Strategies. Academic Press, Inc. San Diego, California.
- Nakkaew, A., Wilaiwan, C. and Amornrat, P. 2010. Molecular Cloning and Expression of Egtctp, Encoding a Calcium Binding Protein, Enhances The Growth of Callus in Oil Palm (*Elaeis guineensis*, Jacq.L). *Songklanakarini J. Sci. Technol.* 32(6): 561-569.
- Reece, R. J. 2004. Analysis of Genes and Genoms. John Wiley & Sons, England.
- Rhea, L. 2011. Trizol Tissue RNA Extraction Protocol Revised June 2011. Murray Lab and University of Iowa, US.
- Roche. 2005. A Protocol of of Fast Start Taq DNA Polyemerase Kits. [Http://www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com). Diunduh tanggal 28 Oktober 2012.
- _____. 2006. A Protocol of Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kits. [Http://www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com). Diunduh tanggal 25 Oktober 2012.
- Sambrook, J.E., Fritsch, F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Lab Press. New York .USA.
- Sambrook, J. and Russel, D.W. 2001. Molecular Cloning a Laboratory Manual Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Siregar, A.Z. 2006. Kelapa Sawit: Minyak Nabati Berprospek Tinggi. USU Repository, Medan.
- Soares, M.B. and Bonaldo, F. 1998. Genome Analisis: A Laboratory Manual Volume 2 .Editor : Eric De Green, Bruce Biren, Sue Klapholz, Richard M. Myers, Jene Roskam. Cold Spring Harbour Laboratory Press. USA.
- Tan, B. 1992. Antitumor Effects of Oil Palm Carotenes and Tocotrienols in HRS/J Hairless Female Mice. *Nutrition Research* 12. p.163-S173.
- Tattersal, E.A.R., Ergul, A., Alkayal, F., Deluc, L., Cushman, J.C. and Cramer, G.R. 2005 Comparison of Methods for Isolating High Quality RNA from Leaves of Grapevine. *Amj Enol Viticult* 56: 400-406.
- Teoh, C.H. 2010. Key Sustainability Issues in The Palm Oil Sector. Discussion Paper For Multi-Stakeholder Consultations Commissioned By The World Bank Group. Advisor Plantation Agriculture Petaling Jaya, Malaysia. p.3-4.
- USDA. 2010. Oilseeds : World Markets and Trade. Circular Series November FOP.
- Utomo, C. 2006. Fokus Rekayasa Genetika pada Tanaman Kelapa Sawit. Pusat Penelitian Kelapa Sawit, Medan. Hal.111-119.

- Wiame, I. 2000. Irreversible Heat Inactivation of DNase I Without RNA Degradation. *BioTechniques* 29: 252-256.
- Xiao, Y., Yang, Y., Cao, H., Fan, H., Ma, Lei, X., Mason, A.S., Xia, Z. and Huang, X. 2012. Efficient Isolation of High Quality RNA from Tropical Palms for RNA-seq Analysis. *Plant Omics Journal* 5(6):584-589.
- Zilinskiene, J. 2012. Product Information DNase RNase Free. <http://thermoscientific.com/onebio>. Diunduh tanggal 25 Oktober 2012