

Isolasi dan Karakterisasi Potongan DNA Gen *Sterol Metiltransferase 1* (SMT1) Asal Kelapa Sawit

Isolation and Characterization of Oil Palm Sterol Methyltransferase 1 (SMT1) Gene Fragment

Syamsi Rizal^{1*}, Dewi Sukma², Roberdi Siberakuno^{3*}, Tony Liwang³, dan Sudarsono Sudarsono^{2*}

¹Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

²Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
(IPB University), Jl. Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

³PT SMART Tbk, Jl. Cijayanti, Kec. Babakan Madang, Bogor, Jawa Barat 16810, Indonesia

Diterima 18 Agustus 2020/Disetujui 11 November 2020

ABSTRACT

*Slow height increment is a desirable character in oil palm breeding, and brassinosteroid is an important hormone associated with the character. Sterol methyltransferase 1 (SMT1) is a key gene associated with brassinosteroid biosynthesis. One of the molecular marker development approaches is identifying and characterization of genes associated with the target character. The study aims to isolate and characterize the nucleotide sequence diversity of the SMT1 gene. PCR amplification of the SMT1 gene from *Elaeis oleifera* (E.o.), *E. guineensis* (E.g.), and their hybrids (E.g. × E.o.) was done using SMT1 gene-specific primers. The SMT1 gene fragment representing partial intron 8, exons 9, intron 9, and partial exon 10 was successfully amplified and the fragment sequenced in this study. The total nucleotide sequences found in this study were between 501-505 bp, encoded a ranged from 104-105 amino acid residues. A conserved domain of the amino acid residues associated with brassinosteroid biosynthesis was identified in the translated polypeptide, confirming the amplicon's identity as the SMT1 gene fragment. The identified SMT1 gene nucleotide sequence variabilities may be used to develop molecular markers useful for oil palm breeding programs, especially for the low height increment character.*

Keywords: Brasinosteroid, dwarf stature, sterol

ABSTRAK

*Tanaman dengan pertambahan tinggi yang lambat merupakan karakter penting dalam program pemuliaan kelapa sawit dan brasinosteroid merupakan hormon penting yang berpengaruh untuk karakter tersebut. Gen sterol metiltransferase 1 (SMT1) merupakan salah satu gen kunci dalam biosintesis brasinosteroid. Pengembangan marker molekuler dapat dimulai dengan identifikasi dan karakterisasi gen yang terkait dengan karakter target. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi keragaman nukleotida gen SMT1. Amplifikasi PCR dilakukan menggunakan genom *Elaeis oleifera* (E.o.), *E. guineensis* (E.g.) dan hibrida dari keduanya (E.g. x E.o.) dengan sepasang primer spesifik gen SMT1. Dalam penelitian ini berhasil diampifikasi satu potongan DNA gen SMT1 dan dari hasil DNA sequencing berhasil diidentifikasi sebanyak 501- 505 pb. Potongan DNA yang diidentifikasi terdiri atas partial intron 8, exon 9, intron 9, dan patial exon 10, yang menyandi antara 104-105 residu asam amino. Domain residu asam amino terkonservasi ditemukan dalam hasil translasi amplicon, yang berkorelasi dengan situs aktif dalam biosintesis brasinosteroid dan mengkonfirmasi identitas amplicon sebagai bagian dari gen SMT1. Keragaman nukleotida potongan DNA gen SMT1 yang teridentifikasi berpotensi dapat digunakan untuk pengembangan marker molekuler yang bermanfaat untuk pemuliaan tanaman kelapa sawit, terutama untuk karakter pertambahan tinggi tanaman yang lambat.*

Kata kunci: Brasinosteroid, sterol, tanaman kerdil

* Penulis untuk korespondensi. e-mail: sudarsono_agh@apps.ipb.ac.id

PENDAHULUAN

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) merupakan tanaman penghasil minyak nabati dengan produktivitas tertinggi dibandingkan dengan tanaman penghasil minyak lainnya. Kelapa sawit memenuhi 34% total konsumsi minyak nabati dunia dengan total produksi sebanyak 69.57 juta ton pada tahun 2017 (USDA, 2018). Sejauh ini kelapa sawit merupakan tanaman penghasil minyak yang paling produktif dan mampu memenuhi permintaan minyak nabati dunia yang diperkirakan mencapai 240 juta ton pada tahun 2050 (Corley, 2009).

Sumber pertumbuhan kebun kelapa sawit di Indonesia sebesar 89% disebabkan oleh perluasan areal (ekstensifikasi) dan 11% disebabkan oleh peningkatan produktivitas (*yield*) (Saragih, 2016). Secara alami kelapa sawit memiliki pertumbuhan tinggi batang yang bervariasi antara aksesori. Pertumbuhan tinggi batang pada genotipe komersial *Elaeis guineensis* berkisar 45-75 cm per tahun, sedangkan pada *E. oleifera* setiap tahun bertambah tinggi sekitar 5-10 cm. Hibrida F₁ interspesifik antara *E. guineensis* dan *E. oleifera* memiliki pertumbuhan tinggi rata-rata dari kedua tetua dengan pertumbuhan tinggi antara 15-25 cm per tahun.

Karakter pertumbuhan tinggi batang lambat merupakan sifat penting dalam pemuliaan tanaman kelapa sawit. Batang pendek akan memudahkan dalam proses panen tandan buah segar (TBS) dan memperpanjang umur ekonomis tanaman kelapa sawit (Kovi *et al.*, 2011). Kemajuan teknologi molekuler memudahkan proses pemuliaan tanaman dalam mewujudkan varietas dengan target karakter tertentu. Penggunaan penanda molekuler untuk seleksi tanaman dapat memperpendek siklus pemuliaan tanaman dan seleksi yang dilakukan lebih valid, sehingga hanya kelapa sawit terpilih yang ditanam di lapangan. Melalui kemajuan teknologi molekuler, identifikasi dan karakterisasi gen potensial dan variasi genom yang meregulasi pertumbuhan tinggi batang sebagai langkah awal pemuliaan tanaman dapat dicapai (Roberdi *et al.*, 2015; Devi *et al.*, 2017).

Gen kekerdilan (*dwarf*) sangat berkaitan dengan biosintesis hormon pertumbuhan tanaman seperti auxin, brasinosteroid dan giberelin (Azni *et al.*, 2014). *Brasinosteroid* berperan penting dalam berbagai macam aspek biologi tanaman termasuk pemanjangan sel, pembelahan sel, pertumbuhan akar, foto-morfogenesis, diferensiasi stomata dan jaringan pembuluh (Tang *et al.*, 2016). Salah satu gen kunci dalam biosintesis *brasinosteroid* adalah gen sterol metiltransferase 1 (*SMT1*). Chen *et al.* (2018) melaporkan bahwa gen *SMT1* mempunyai fungsi yang berhubungan dengan fenotipe kerdil pada tanaman herba. Lebih lanjut, isolasi dan karakterisasi gen *SMT1* telah dilaporkan pada tanaman *Tripterygium wilfordii* (Guan *et al.*, 2017). Informasi mengenai keberadaan gen *SMT1* pada kelapa sawit perlu dikaji lebih lanjut dengan tujuan pengembangan marker molekuler untuk mendukung pemuliaan kelapa sawit. Tersedianya informasi gen *SMT1* asal kelapa sawit gen *SMT1* pada kelapa sawit dapat digunakan sebagai bahan pengembangan marker molekuler terkait pertumbuhan tinggi batang tanaman kelapa sawit.

Tujuan penelitian ini adalah melanjutkan isolasi potongan DNA gen *SMT1* asal kelapa sawit dengan amplifikasi PCR, mengkarakterisasi potongan DNA yang teramplifikasi dengan *DNA sequencing* dan mengembangkan primer untuk menghasilkan marker molekuler spesifik gen *SMT1* yang dapat digunakan untuk mendukung pemuliaan kelapa sawit ke depan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan pada bulan April 2019 sampai dengan Desember 2019 di Laboratorium Bioteknologi Divisi Produksi Tanaman dan Bioteknologi, PT. SMART Tbk., Kelurahan Cijayanti, Kecamatan Babakan Madang, Kabupaten Bogor, Jawa Barat. Materi genetik yang digunakan pada percobaan ini terdiri atas tiga tanaman *E. guineensis* (*E.g.*) sebagai contoh tanaman dengan pertumbuhan cepat (normal), tiga tanaman *E. oleifera* (*E.o.*) sebagai contoh tanaman dengan pertumbuhan tinggi lambat dan tiga tanaman hibrida *E.g. x E.o.* sebagai contoh tanaman dengan pertumbuhan tinggi medium. Gen terkait pertumbuhan tinggi yang dipelajari dalam penelitian adalah gen penyandi enzim sterol metiltransferase 1 (*SMT1*).

Isolasi DNA Aksesori Kelapa Sawit

Isolasi DNA dilakukan mengikuti prosedur standar Kit isolasi DNA tanaman II dari Bioline (Bioline, London, Inggris) sebagaimana disarankan oleh pabrikan kit DNA. Contoh daun yang telah digerus sebanyak 100 mg dipindahkan ke dalam tabung ukuran 2 mL, ditambahkan 200 µL bufer lisis, dan digerus agar homogen. Selanjutnya ke dalam gerusan daun ditambahkan 10 µL larutan RNAse dan dicampur agar homogen. Campuran selanjutnya diinkubasi pada suhu 65 °C selama 10 menit. Setelah pemanasan, supernatan dipindahkan ke dalam tabung berfilter, dengan ukuran volume 2 mL dan disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 11,000 g. Selanjutnya ke dalam supernatan ditambahkan 450 µL bufer *binding* dan dicampur hingga homogen. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke tabung baru dengan ukuran volume 2 mL dan disentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 11,000 g. Kemudian sebanyak 400 µL bufer pencuci pertama ditambahkan dan disentrifugasi kembali selama 1 menit. Selanjutnya, ditambahkan bufer pencuci kedua sebanyak 700 µL, disentrifugasi selama 1 menit serta dilanjutkan dengan menambahkan bufer pencuci ketiga sebanyak 200 µL dan disentrifugasi selama 2 menit. Filter dipindahkan ke dalam tabung ukuran 1.5 mL dan ditambahkan 50 µL *elution buffer*, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 65 °C. Selanjutnya disentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 11,000 g dan tahap ini diulangi dengan menambahkan 50 µL *elution buffer* yang kedua. DNA hasil elusi digunakan sebagai cetakan pada proses PCR atau disimpan pada suhu 4 °C.

DNA hasil isolasi kemudian ditentukan kuantitasnya menggunakan Nanodrop spektrofotometer 2,000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) dan dilanjutkan uji kualitas dengan elektroforesis dalam 1% gel agarosa.

Konsentrasi DNA yang digunakan untuk melakukan amplifikasi PCR yaitu 40 ng/ μ L.

Desain Primer Spesifik Gen *SMT1*

Desain primer spesifik dilakukan menggunakan metode homologi dari runutan DNA gen *SMT1* tanaman kurma (no. Aksesori XM_010925108) yang diperoleh dari database DNA GenBank *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Runutan DNA gen *SMT1* pada tanaman kurma digunakan untuk memperoleh runutan nukleotida dan lokasi gen *SMT1* pada genom tanaman kelapa sawit dengan metode BLAST-N (*basic local alignment search tool - nucleotide*) di database DNA lokal milik PT. SMART Tbk. Hal ini dilakukan untuk mengetahui panjang, posisi, jumlah exon dan intron gen *SMT1* di dalam genom kelapa sawit.

Posisi dan jumlah exon yang diperoleh pada database lokal digunakan sebagai bahan untuk mendesain primer spesifik menggunakan perangkat lunak Primer3plus. Output dari perangkat lunak berupa sepasang primer *forward* dan *reverse*. Runutan DNA dari primer yang digunakan adalah primer *forward* 5'-GCACCAGATGTTFFTAATCTGC-3' dan primer *reverse* 5'-CTTCTTTCTCTTTGCTCGTCA-3'.

Amplifikasi PCR dengan Primer Spesifik *SMT1*

Amplifikasi DNA gen *SMT1* menggunakan materi genetik *E. guineensis* (*E.g.*), *E. oleifera* (*E.o.*) dan hibrida *E.g. × E.o.* yang merupakan representasi dari karakter cepat (normal), lambat dan medium menggunakan Kit Toyobo *High Fidelity Taq Polymerase* (TOYOBO, OSAKA, Jepang). Total volume untuk reaksi PCR adalah 25 μ L untuk 1x reaksi yang terdiri dari: 12.5 μ L 2x PCR buffer, 5 μ L 1x dNTPs, 3 μ L primer *forward* 1 μ M dan 3 μ L primer *reverse* 1 μ M, 0.5 μ L 1U/ μ L Taq DNA polymerase dan 4 μ L DNA 40 ng/ μ L. Reaksi PCR dilakukan dengan 35 siklus, denaturasi pada suhu 98 °C selama 10 detik, penempelan pada suhu 65 °C selama 30 detik dan pemanjangan pada suhu 68 °C selama 30 detik. Hasil produk PCR divisualisasi dengan gel agarosa 1% selama 25 menit pada mesin elektroforesis dengan arus 100 V. Produk PCR dengan pita tunggal dilakukan purifikasi atau pemurnian menggunakan QIAquick *PCR Purification Kit* (Qiagen, Jerman). Hasil purifikasi digunakan sebagai bahan untuk perunutan nukleotida yang dikirim ke 1stBASE (Singapura).

Karakterisasi Gen *SMT1*

Amplikon berupa pita tunggal dari masing-masing aksesori kelapa sawit dikirim untuk proses perunutan nukleotida (DNA *sequencing*) ke 1st BASE, Singapura. Proses perunutan nukleotida menghasilkan data genomik berupa urutan basa nukleotida gen *SMT1* dari sembilan aksesori contoh kelapa sawit yang digunakan. Data yang diperoleh berupa format ab1 dalam bentuk elektroferogram. Data dianalisis menggunakan perangkat lunak Geneious

(Biomatters, Ltd.) dengan cara disejajarkan untuk penentuan bagian exon dan intron serta ditranslasikan menjadi residu asam amino. Runutan nukleotida amplikon dan runutan asam amino hasil translasi dilakukan analisis *basic local alignment sequence tool* (BLAST) untuk menemukan kesamaan runutan nukleotida dengan aksesori yang ada di database DNA Genbank NCBI. Hasil analisis BLAST digunakan untuk menduga identitas amplikon yang didapatkan. Selanjutnya sejumlah aksesori gen *SMT1* dari tanaman dikotil dan monokotil yang teridentifikasi diunduh dari database NCBI dan dilakukan analisis filogenetik untuk mengevaluasi hubungan kekerabatannya dengan aksesori dari kelapa sawit yang dikarakterisasi dalam penelitian ini.

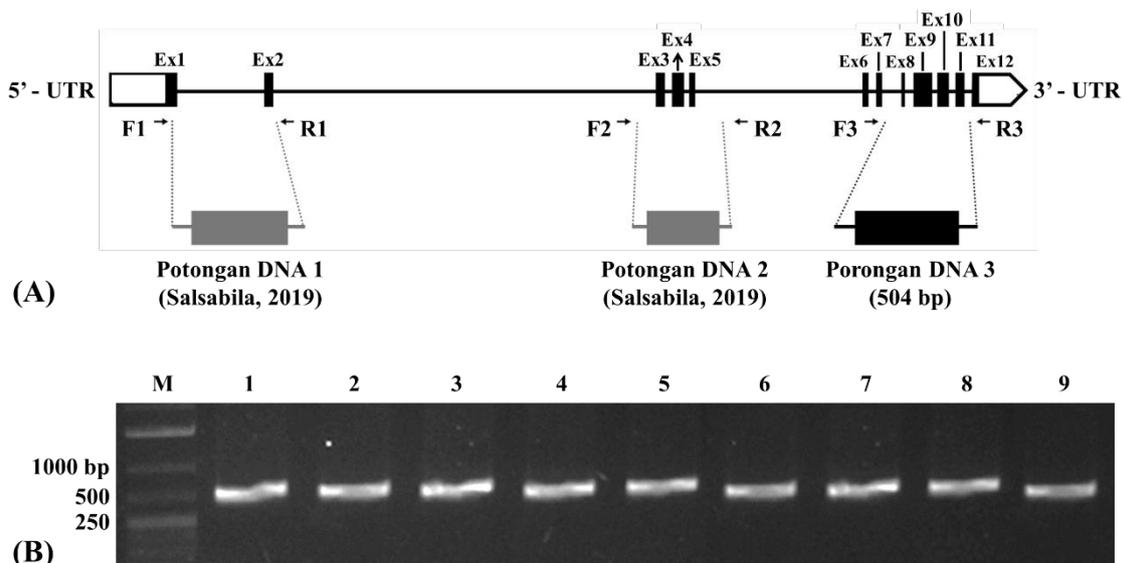
HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi PCR dengan Primer Spesifik *SMT1*

Struktur lengkap gen *SMT1* berukuran panjang 9.787 pasang basa (pb) dengan unit transkripsi yang terdiri atas 12 exon dan 11 intron (Gambar 1.A) serta menyandi polipeptida yang terdiri atas 342 residu asam amino. Untuk gen *SMT1*, exon 1 dan 2 (Potongan DNA 1) dan exon 3-5 (potongan DNA 2) asal kelapa sawit (Gambar 1.A) telah berhasil diisolasi dan dikarakterisasi oleh Salsabila (2019). Pada penelitian ini dilakukan amplifikasi pada sebagian exon 8 sampai dengan sebagian exon 11 (Gambar 1). Namun demikian, berdasarkan hasil perunutan nukleotida hanya berhasil diidentifikasi sebanyak 501-505 pb dari gen *SMT1*. Potongan DNA yang diidentifikasi runutan nukleotidanya terdiri atas sebagian intron 8, exon 9, intron 9 dan sebagian exon 10. Potongan DNA yang diidentifikasi menyandi antara 104-105 residu asam amino. Sebagian dari runutan nukleotida dari potongan DNA hasil amplifikasi PCR tidak dapat teridentifikasi karena berkualitas rendah sehingga harus dihilangkan dari hasil perunutan nukleotida. Sesuai dengan kesepakatan dengan PT SMART Tbk, runutan nukleotida yang teridentifikasi tidak dapat dipublikasikan dan hanya disajikan dalam bentuk residu asam amino hasil translasi dan hasil analisis filogenetik.

Identitas Potongan DNA Gen *SMT1*

Runutan nukleotida potongan DNA gen *SMT1* hasil penelitian ini dibandingkan dengan aksesori gen *SMT1* yang terdapat pada database DNA GenBank NCBI dengan menggunakan BLAST-N. Hasil analisis BLAST-N diperoleh tingkat kesamaan runutan nukleotida gen *SMT1* tanaman kelapa sawit dengan tanaman lainnya. Tingkat kesamaan tertinggi (94%) diperoleh pada runutan nukleotida gen *SMT1* dari tanaman kurma (*Phoenix dactylifera*). Kesamaan identitas gen *SMT1* asal kelapa sawit dengan runutan nukleotida tanaman pisang, nanas dan anggur memiliki kisaran nilai antara 80-85% (Tabel 1). Meskipun berbeda-beda tingkat kesamaan identitas runutan nukleotidanya, gen *SMT1* yang diisolasi dari aksesori kelapa sawit diduga memiliki fungsi yang sama dengan gen *SMT1* dari tanaman lain.



Gambar 1. (A) Ilustrasi struktur gen *sterol metiltransferase 1 (SMT1)* asal kelapa sawit *Elaeis guineensis*. (B) Foto hasil elektroforesis gel agarosa untuk amplikon potongan DNA hasil PCR dengan menggunakan sepasang primer spesifik *SMT1*. Posisi masing-masing primer F = *forward* (F1, F2, dan F3); serta R = *reverse* (R1, R2, dan R3) pada struktur gen *SMT1* ditunjukkan dengan tanda panah; pb = pasang basa. Kolom 1-3 (aksesi hibrida *E.g. x E.o.*); 4-6 (aksesi *E. guineensis*); 7-9 (aksesi *E. oleifera*); M = marker DNA (1 kb ladder)

Analisis Filogenetik Potongan DNA Gen SMT1

Analisis filogenetik residu asam amino yang ditranslasikan dari potongan gen *SMT1* dari tiga aksesori kelapa sawit dan dari berbagai spesies lain disajikan dalam Gambar 2. Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa *SMT1* dari berbagai tanaman yang dievaluasi terbagi ke dalam tiga grup utama (grup I, II dan III). Grup 1 terdiri atas tiga aksesori tanaman dikotil, grup II terdiri atas 6 enam tanaman monokotil dan grup 3 terdiri atas tiga tanaman monokotil lainnya. Residu asam amino *SMT1* dari tiga aksesori kelapa sawit memiliki kedekatan dengan *SMT1* dari *Phoenix dactylifera* (keempatnya masuk ke dalam sub-grup II.B) serta berada dalam satu grup dengan *SMT1* dari anggrek *Dendrobium catenatum* dan anggrek *Phalaenopsis equestris* yang berada dalam sub-grup II.A.

Rekonstruksi pohon filogenetik bertujuan untuk melihat pengelompokan individu berdasarkan kemiripan runutan nukleotida atau residu asam aminonya (Chen *et al.*, 2018). Dalam penelitian yang dilakukan, analisis filogenetik digunakan untuk mengetahui kedekatan genetik berdasarkan runutan nukleotida gen *SMT1* kelapa sawit dan gen *SMT1*

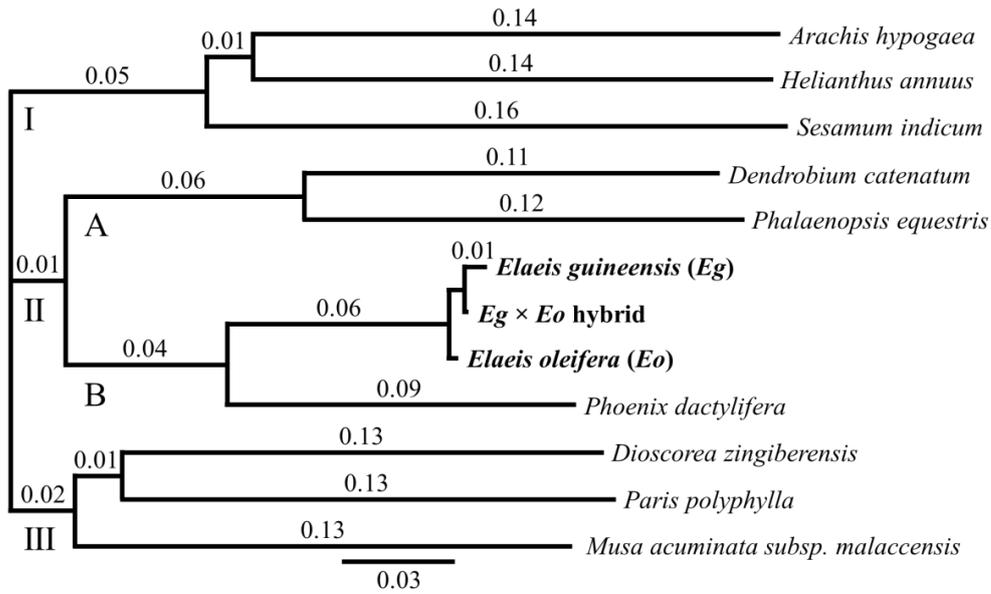
tanaman lain berdasarkan data hasil perunutan nukleotida dan residu asam amino yang ditranslasikan dari data runutan nukleotida. Pengklasteran dengan metode *Neighbor-Joining* merupakan metode yang menggunakan prinsip algoritma untuk jarak genetik antar runutan nukleotida pada bagian-bagian yang memiliki kemiripan. Rekonstruksi pohon filogenetik yang ditampilkan pada Gambar 2 digunakan untuk mempelajari hubungan kekerabatan, nenek moyang dan evolusi suatu organisme. Menurut Putri (2010), informasi parameter genetik sangat diperlukan untuk kegiatan seleksi agar dapat berjalan efisien. Selanjutnya Sayekti (2015) menjelaskan bahwa analisis pengelompokan baik berdasarkan metode *Neighbor-Joining* atau PCoA tidak selalu menunjukkan pengelompokan individu berdasarkan aksesori yang dikoleksi.

Domain Terkonservasi pada SMT1 Kelapa Sawit

Domain terkonservasi merupakan bagian protein yang berasosiasi dengan fungsi tertentu dan terkonservasi selama terjadi evolusi (Singh dan Singh 2015). Domain terkonservasi dianalisis pada potongan *SMT1* dari tiga

Tabel 1. Hasil *basic local alignment sequence tool (BLAST)* dan identitas runutan nukleotida potongan DNA gen sterol metiltransferase 1 (*SMT1*) hasil PCR asal *Elaeis guineensis* dengan aksesori tanaman lain pada data *GeneBank*

Deskripsi aksesori	Nomer aksesori	Nilai E	Identity (%)
<i>Phoenix dactylifera</i> cycloartenol-C-24-methyltransferase 1-like	XM_008806132.3	2e-81	94%
<i>Ananas comosus</i> cycloartenol-C-24-methyltransferase 1-like	XM_020227168.1	4e-52	85%
<i>Musa acuminata</i> subsp. malaccensis cycloartenol-C-24-methyltransferase 1	XM_009413003.2	5e-45	82%
<i>Vitis vinifera</i> cycloartenol-C-24-methyltransferase	XM_010661136.2	5e-39	80%



Gambar 2. Pohon filogenetik yang dikonstruksi menggunakan runutan nukleotida gen sterol metiltransferase 1 (*SMT1*) dari *Elaeis guineensis* (*E.g.*), *E. oleifera* (*E.o.*) dan hibrida interspesifik *E.g.* × *E.o.* serta gen *SMT1* dari sejumlah tanaman monokotil dan dikotil yang terdeposit di database DNA *GeneBank* NCBI. Angka pada pohon filogenetik menunjukkan jarak genetik dan garis di bawah pohon filogenetik menunjukkan referensi jarak genetik sebesar 0.03. Aksesori dengan huruf tebal adalah representasi aksesori yang dihasilkan dalam penelitian ini, sedangkan yang lain adalah aksesori yang diunduh dari database DNA *GeneBank* NCBI

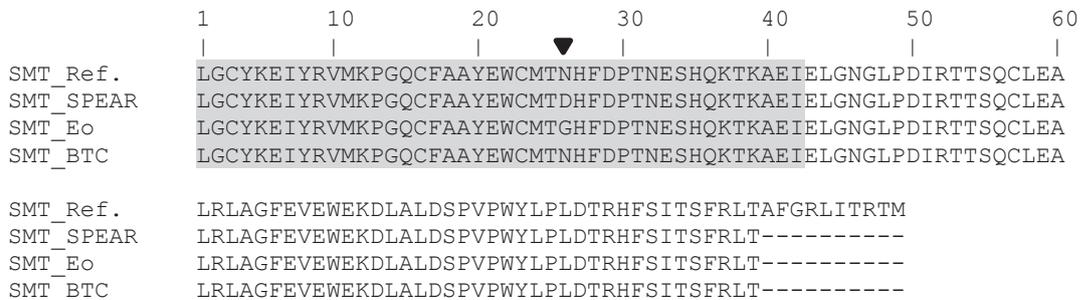
aksesi kelapa sawit yang masing-masing mewakili tiga kelompok fenotipe pertambahan tinggi. Analisis domain terkonservasi dilakukan dengan menggunakan program *conserved domain* di NCBI website (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

Dari potongan *SMT1* asal kelapa sawit, berhasil diidentifikasi keberadaan satu domain yang merupakan domain terkonservasi dari sterol metiltransferase di bagian *C-terminus*, sebagai domain terkonservasi dengan kode Cdd: pfam08498 (Gambar 3). Dengan demikian memperkuat hasil sebelumnya yang menunjukkan bahwa potongan DNA yang berhasil diamplifikasi adalah potongan DNA dari gen *SMT1* asal kelapa sawit.

Pada domain terkonservasi gen *SMT1* asal kelapa sawit terdapat satu mutasi substitusi yang menyebabkan terjadinya non-sinonimous single nucleotide polymorphism (SNP). Non-sinonimous SNP tersebut

menyebabkan terjadinya perbedaan residu asam amino yang disandi (Gambar 3), yaitu N pada *SMT_Ref* dan *SMT1* dari aksesori kelapa sawit *SPEAR* (*SMT_SPEAR*), D pada aksesori kelapa sawit *BTC* (*SMT_BTC*), serta G pada aksesori *Eo* (*SMT_Eo*). Dari non-sinonimous SNP yang teridentifikasi tersebut selanjutnya dapat dikembangkan menjadi marker *single nucleotide amplified polymorphism* (SNAP) dan keterkaitan marker SNAPnya dapat dievaluasi dengan pertambahan tinggi tanaman kelapa sawit.

Senyawa sterol pada tanaman berperan sebagai penyusun membran lipid dan sebagai prekursor pembentukan hormon brassinosteroid, yang fungsinya menyerupai hormon steroid pada mamalia atau *ecdysteroid* pada serangga (Parish dan Nes, 1997). Fito-sterol memiliki satu sampai dua karbon tambahan karena peristiwa alkilasi yang dikatalisis oleh *S-adenosyl-methionine-dependent C-24 sterol methyltransferases* (SMTs). Enzim *SMT1*



Gambar 3. Pensejajaran asam amino hasil translasi potongan DNA gen sterol metiltransferase 1 (*SMT1*) dari tiga aksesori kelapa sawit, *Elaeis guineensis* (*E.g.*–*SMT_BTC*), *E. oleifera* (*E.o.*–*SMT_Eo*), dan hibrida interspesifik *E.g.* × *E.o.* (*SMT_SPEAR*) serta referensi gen *SMT1* (*SMT_Ref.*). Asam amino yang diberi latar belakang abu-abu merupakan domain polipeptida yang terkonservasi dari *SMT1* dan tanda panah menunjukkan posisi mutasi substitusi yang menyebabkan terjadinya perubahan asam amino

mengkatalisis tahapan awal dalam biosintesis sterol dengan penambahan metil tunggal pada posisi C-24 (penambahan C1). Sedangkan enzim SMT2 dan SMT3 masing-masing dapat menambahkan kelompok metil kedua (penambahan C2), sehingga melengkapi penambahan rantai etil pada posisi C-24 (Nes *et al.*, 1999).

Mutan sterol metiltransferase 1 (SMT1) dari *Arabidopsis* memiliki sifat fenotipik yang disebut *fackel* dan telah dibuktikan terkait dengan kekurangan pada langkah awal dalam jalur biosintesis sterol (Diener *et al.*, 2000). Gen *SMT1* menyandi enzim yang mampu melakukan alkilasi C-24 dari rantai samping sterol dengan adanya S-adenosilmetionin. Seperti brasinosteroid, senyawa sterol juga berperan penting dalam proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Senyawa sterol berperan sebagai prekursor untuk memproduksi brasinosteroid dan memiliki banyak peran yang serupa dengan brasinosteroid. Pada mutan *Arabidopsis*, abnormalitas biosintesis fito-sterol umumnya menampilkan fenotipe mirip defisiensi brasinosteroid yaitu pemendekan batang dan berkurangnya kesuburan (Vriet *et al.*, 2012).

Chen *et al.* (2018) melaporkan bahwa gen *CdSMT1-1* berfungsi dalam mengatur karakter pertumbuhan tinggi yang lambat sehingga tanaman menjadi kerdil. Fenotipe kerdil diamati pada tanaman padi transgenik sebagai akibat berkurangnya ekspresi gen *SMT1*. Peran dari terhambatnya ekspresi gen *SMT1* menyebabkan terjadinya akumulasi kolesterol dan menginduksi ekspresi gen untuk meningkatkan sintesis poliamin. Menurut Neelakandan *et al.*, (2010), SMT1 bertindak sebagai katalis yang terlibat dalam langkah metilasi awal dalam jalur biosintesis fito-sterol, dimana terjadi konversi cycloartenol (intermediate fito-sterol) menjadi sterol 24-alkil. Ekspresi gen *SMT1* mengakibatkan perubahan kandungan sterol dalam tanaman sehingga terjadi akumulasi kolesterol dan sterol yang teralkilasi. Menurut Diener *et al.*, (2000) ekspresi gen *SMT1* paling kuat terjadi di daerah tanaman yang sedang tumbuh dan berkembang terutama pada pucuk apikal.

KESIMPULAN

Isolasi dan karakterisasi gen *SMT1* pada 13 aksesori kelapa sawit berhasil dilakukan dan menghasilkan amplicon sepanjang 504 pb yang menyandikan 167 asam amino. Tingkat kesamaan identitas gen *SMT1* diperoleh mencapai 80% sampai 94% dengan sejumlah aksesori gen *SMT1* di pangkalan data *GeneBank* NCBI. Domain terkonservasi teridentifikasi pada satu target yang terlibat biosintesis brasinosteroid yang berasal dari tiga aksesori kelapa sawit. Karakterisasi sekuens gen *SMT1* berupa informasi yang dapat digunakan untuk pengembangan penanda molekuler yang sangat bermanfaat untuk pemuliaan dan pengembangan varietas unggul tanaman kelapa sawit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada PT. SMART Tbk atas fasilitas yang telah diberikan selama pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Azni, I.N.A.M., P. Namasivayam, H.C. Ling, S.S.R.S. Alwee, M.A.A. Manaf. 2014. Differentially expressed transcripts related to height in oil palm. *J. Oil. Palm. Res.* 26:308-316.
- Chen, M., J. Chen, N. Luo, R. Qu, Z. Guo, S. Lu. 2018. Cholesterol accumulation by suppression of SMT1 leads to dwarfism and improved drought tolerance in herbaceous plants. *Plant Cell Environ.* 41:1417-1426.
- Corley, R.H.V. 2009. How much palm oil do we need? *Environ. Sci. Policy* 12:134-139. Doi:10.1016/j.envsci.2008.10.011.
- Devi, E.L., C.H. Devi, S. Kumar, S.K. Sharma, A. Beemrote, S.K. Chongtham, C.H. Singh, C. Tania, T.B. Singh, A. Ningombam. 2017. Marker assisted selection (MAS) towards generating stress tolerant crop plants. *Plant Gene* 11:205-218.
- Diener, A.C., H. Li, W.X. Zhou, W.J. Whoriskey, W.D. Nes, G.R. Fink. 2000. Sterol methyltransferase 1 controls the level of cholesterol in plants. *Plant Cell* 12:853-870.
- Guan, H., Y. Zhao, P. Su, Y. Tong, Y. Liu, T. Hu, L. Huang. 2017. Molecular cloning and functional identification of sterol C24-methyltransferase gene from *Tripterygium wilfordii*. *Acta Pharm Sin B.* 7: 603-609.
- Kovi, M.R., Y. Zhang, S. Yu, G. Yang, W. Yan, Y. Xing. 2011. Candidacy of a chitin-inducible gibberellin-responsive gene for major locus affecting plant height in rice that is closely linked to Green Revolution gene *sd1*. *Theor. Appl. Genet.* 123:705-714.
- Neelakandan, A.K., H.T.M. Nguyen, R. Kumar, L.S.P. Tran, S.K. Guttikonda, T.N. Quach, D.L. Aldrich, W.D. Nes, H.T. Nguyen. 2010. Molecular characterization and functional analysis of *Glycine max sterol methyl transferase 2* genes involved in plant membrane sterol biosynthesis. *Plant Mol. Biol.* 74:503-518.

- Nes, W.D., B.S. McCourt, J.A. Marshall, J. Ma, A.L. Dennis, M. Lopez, L. He. 1999. Site-directed mutagenesis of the sterol methyl transferase active site from *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of novel 24-ethyl sterols. *J. Org. Chem.* 64:1535-1542.
- Parish, E.J., W.D.Nes. 1997. *Biochemistry and function of sterols.* CRC press, Boca Raton, NY.
- Putri, L.A.P., H. Aswidinnoor, D. Asmono. 2010. Keragaan genetik dan pendugaan heritabilitas pada komponen hasil dan kandungan β -karoten progeni kelapa sawit. *J. Agron. Indonesia* 37:145-151.
- Roberdi, Sobir, S. Yahya, N. Toruan-Mathius, T. Liwang. 2015. Identification of gene related to hard bunch phenotype in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *J. Agron. Indonesia* 43:147-152.
- Salsabila, A.S. 2019. Identifikasi *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) pada Gen Terkait Pertambahan Tinggi Batang Kelapa Sawit. Tesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Saragih, B. 2016. Produktivitas sumber pertumbuhan minyak sawit yang berkelanjutan. *Palm Oil Agribusiness Strategic Policy Institute.* <https://www.iopri.org> [15 Agustus 2020].
- Sayekti, U., U. Widyastuti, N. Toruan-Mathius. 2015. Keragaman genetik kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) asal Angola menggunakan marker SSR. *J. Agron. Indonesia* 43:140-146.
- Schaller, H. 2004. New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* 42:465-476.
- Singh, B.D., A.K. Singh. 2015. *Marker-Assisted Plant Breeding: Principles and Practice.* India, Springer, IN.
- Tang, J., Z. Han, J. Chai. 2016. Q&A: What are brassinosteroid and how do they act in plants?. *BMC Biology.* 14:113.
- [USDA] United State Department of Agriculture. 2018. *Indonesia Oilseed and Products Update 2017.* Jakarta.
- Vriet, C., E. Russinova, C. Reuzeau. 2012. Boosting crop yields with plant sterols. *Plant Cell* 24:842-857.