



**DESAIN PRIMER GEN *SMT 1* TERHADAP PERTAMBAHAN TINGGI
BATANG MELAMBAT PADA TANAMAN KELAPA SAWIT (*Elaeis
gueneensis* Jacq.) BERDASARKAN SITUS SNP**

***PRIMER DESIGN OF THE SMT 1 GENE ASSOCIATED WITH PLANT
STEM GROWTH INHIBITOR IN OIL PALM (*Elaeis
gueneensis* Jacq.) BASED ON SNP SITES***

Aline Sisi Handini^{1*}, Jefryan Syaputra¹, Halida Adisty Putri¹

¹Program Studi Teknologi Produksi Tanaman Perkebunan, Politeknik Kelapa Sawit
Citra Widy Edukasi

Jl. Gapura No.8 Rawa Banteng Desa Cibuntu, Kecamatan Cibitung, Kabupaten
Bekasi, Provinsi Jawa Barat 17520

*Korespondensi : alinesisihandini@cwe.ac.id

Received October 3, 2023; Revised November 23, 2023; Accepted November 29, 2023

ABSTRAK

Karakter pertambahan tinggi batang melambat merupakan salah satu tujuan dari pemuliaan tanaman kelapa sawit untuk optimalisasi umur ekonomis tanaman, mengurangi siklus replanting, dan mempermudah proses panen. Gen *SMT 1* merupakan gen kunci didalam biosintesis hormon brasinosteroid yang berperan dalam pertumbuhan dan pertambahan batang tanaman. Teknik yang digunakan untuk mengidentifikasi gen yang memiliki karakter unggul tersebut adalah PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Dalam proses PCR, desain primer merupakan hal yang sangat penting karena primer tersebut akan menentukan keberhasilan dalam proses amplifikasi PCR. Tujuan dari penelitian ini untuk mendapatkan kandidat primer yang akan digunakan dalam analisis keragaman genetik terkait pertambahan tinggi batang berdasarkan situs SNP. Data sekuen DNA kelapa sawit diperoleh pada laman NCBI. Pensejajaran sekuen DNA dilakukan pada software *geneious prime* untuk mengidentifikasi situs SNP. Desain primer dilakukan pada perangkat lunak WebSNAPER. Hasil penelitian menghasilkan dua kandidat pasang primer yang akan digunakan untuk melakukan analisis keragaman genetik terkait gen pengendali pertambahan tinggi batang melambat. Masing- masing primer terdiri dari primer *reference* dan *alternate* dan memiliki ukuran amplikon yang berbeda pada setiap pasang primer.

Kata kunci: Keragaman Genetik, Gen *SMT 1*, Kelapa Sawit, SNP, Desain Primer

ABSTRACT

The character of growth inhibitor stem is one of the goals of oil palm plant breeding to increase the economic life of the plant, reduce the replanting cycle and simplify the harvesting process. The SMT 1 gene is a key gene in the brasinosteroid hormone which plays a role in the growth and addition of plant stems. The technique used to identify genes with superior characters is PCR (Polymerase Chain Reaction). In the PCR process, the design of the primer is very important because the primer will determine the success of the PCR amplification process. The aim of this study was to obtain primer to

be used in the analysis of genetic diversity related to stem height gain. Oil palm DNA sequence data were obtained in terms of NCBI. DNA sequence alignment was performed on Geneious Prime software to obtain SNP sites. Primer design was performed on WebSNAPER software. The results of the study obtained two candidate pairs of primers to be used for the analysis of genetic diversity related to the increase in the height of the stems of the stem. Each primer consists of reference and alternate primers and has a different amplicon size for each pair of primers.

Keywords: Genetic Diversity, SMT 1 Gene, Oil Palm, SNP, Primer Design

PENDAHULUAN

Luas areal kelapa sawit yang ada di Indonesia pada tahun 2021 tercatat mencapai 15.081.021 Ha (Ditjenbun, 2021). Rata-rata pertambahan tinggi tanaman kelapa sawit di Indonesia adalah 50-70 cm/tahun dengan demikian pada umur 20 tahun tinggi tanaman berkisar 10-14 meter (Natawijaya, 2018). Panen buah kelapa sawit lebih dari 3 meter dinilai kurang ekonomis dan beresiko terhadap keselamatan kerja di lapangan. Selain itu, tandan yang akan jatuh ke tanah juga lebih rentan mengalami kerusakan saat panen sehingga mengaktifkan hidrolisis triasil gliserol (TAG) yang menyebabkan turunnya kualitas minyak (Corley dan Tinker 2015). Berdasarkan hal tersebut salah satu upaya yang bisa dilakukan adalah mengembangkan genotipe kelapa sawit yang memiliki gen pertambahan pertumbuhan batang melambat yang diharapkan dapat meningkatkan umur ekonomis tanaman kelapa sawit, mengurangi siklus replanting dan tetap menghasilkan produksi yang tinggi sehingga peningkatan produksi tanaman kelapa sawit dapat diarahkan tanpa melalui perluasan areal (Ainni, 2014).

Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mengetahui tanaman terdapat gen yang memiliki karakter unggul seperti pertambahan tinggi batang

melambat adalah dengan pemanfaatan teknologi molekuler. Teknik yang sering dilakukan untuk mengidentifikasi gen yang memiliki karakter unggul adalah dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Fakhri *et al.*, (2021) menyebutkan teknik tersebut dianggap valid karena dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu spesies secara molekuler. Kelebihan lain teknik PCR memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi dibandingkan teknik yang lainnya.

Pada penelitian ini gen yang akan digunakan sebagai kandidat primer adalah gen *sterol methyltransferase 1* (SMT 1). Gen SMT 1 merupakan gen kunci di dalam biosintesis hormon brassinosteroid. Hormon brassinosteroid merupakan hormon yang berperan penting dalam pertumbuhan tanaman salah satunya pemanjangan batang (Carland *et al.*, 2010., Tang *et al.*, 2016). Marka molekuler merupakan salah satu pendekatan yang dapat digunakan untuk mengetahui adanya keragaman genetik (*genetic diversity*) dan hubungan kekerabatan (*genetic distance*) dalam suatu populasi (Handini, 2014). Marka molekuler juga dapat meningkatkan efisiensi dalam program pemuliaan tanaman (Peterson *et al.*, 2014). Salah satu marka molekuler generasi baru yang dapat digunakan dalam studi analisis keragaman genetik adalah marka SNAP (*Single Nucleotide Amplified*

Polymorphism). Marka SNAP memiliki keunggulan keberadaan situs SNP (*Single Nuclotide Polymorphism*) yang melimpah dan tersebar sepanjang genom organisme (Sutanto *et al.*, 2013). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi situs SNP dan melakukan design primer yang selanjutnya digunakan untuk menganalisis keragaman genetik terkait pertambahan tinggi batang melambat pada tanaman kelapa sawit.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan selama 4 bulan terhitung pada bulan Januari - April 2023 di Laboratorium Biologi Molekuler Politeknik Kelapa Sawit Citra Widya Edukasi Bekasi Jawa Barat.

Desain Primer gen SMT 1 dilakukan dengan menganalisis sekuen DNA tanaman kelapa sawit pada database *GeneBank* NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sekuen DNA tersebut digunakan untuk mendesain primer SNAP melalui identifikasi situs-situs SNP sepanjang untaian DNA pada gen SMT 1. Selanjutnya dilakukan proses pensejajaran terhadap beberapa sekuen aksesori gen SMT 1. Masing-masing aksesori disejajarkan (*alignment*) melalui *software* geneious untuk mengidentifikasi letak situs SNP.

Hasil identifikasi situs SNP dari pensejajaran sekuen tersebut kemudian dilakukan proses desain primer melalui perangkat lunak WebSNAPER pada situs <https://pgh.mgh.harvard.edu>. Hasil dari desain primer tersebut selanjutnya akan digunakan sebagai landasan untuk mengidentifikasi terkait gen pertambahan

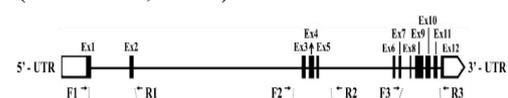
tinggi batang melambat pada tanaman kelapa sawit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ketersediaan Sekuen Gen SMT 1 Tanaman Kelapa Sawit pada Database NCBI

Peran gen SMT 1 pada kelapa sawit memegang peranan penting terutama dalam pertumbuhan batang tanaman. Chen *et al* (2018) melaporkan bahwa gen CdSMT1-1 berfungsi dalam mengatur karakter pertumbuhan tinggi yang lambat sehingga tanaman menjadi kerdil. 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.

Sekuen DNA gen SMT 1 pada tanaman kelapa sawit didapatkan melalui situs NCBI (*National Center For Biotechnology Information*). NCBI merupakan situs yang berisi kumpulan informasi genetik termasuk salah satunya adalah gen SMT 1. Struktur lengkap gen SMT1 berukuran panjang 9.787 pasang basa (pb) dengan unit transkripsi yang terdiri atas 12 exon dan 11 intron (Gambar 1) serta menyandi polipeptida yang terdiri atas 342 residu asam amino (Rizal *et al*, 2020).



Gambar 1. Ilustrasi struktur gen sterol metiltransferase 1 (SMT1) asal kelapa sawit *Elaeis guineensis*.

Sekuen DNA yang telah didapatkan melalui situs NCBI kemudian dilakukan pensejajaran sekuen. Sekuen yang didapatkan pada penelitian ini terdiri dari empat aksesori kelapa sawit (Tabel 1).

Tabel 1. *Sequence identity* fragmen gen SMT 1 pada data GaneBank

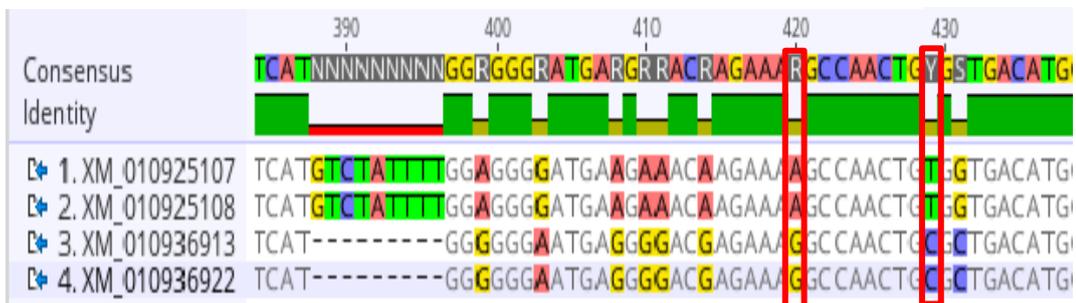
Aksesori Gene Bank	Deskripsi Aksesori
XM_010925707.3	Cicloartenol-c-24-metiltransferase 1 <i>Elaeis guineensis</i>
XM_010923108.3	Cicloartenol-c-24-metiltransferase 1 <i>Elaeis guineensis</i>
XM_01093691.3	Cicloartenol-c-24-metiltransferase 1 <i>Elaeis guineensis</i>
XM_01093692.2	Cicloartenol-c-24-metiltransferase 1 <i>Elaeis guineensis</i>

Pensejajaran Sekuen Gen pada Geneious Prime

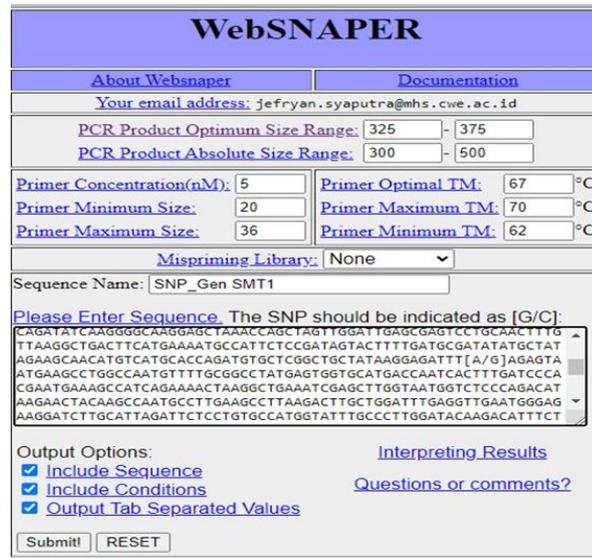
Sekuen genom tanaman kelapa sawit yang telah didapatkan selanjutnya disejajarkan menggunakan *multiple alignment* (pensejajaran sekuen) dengan

software geneious prime. Pensejajaran sekuen bertujuan untuk mengidentifikasi persebaran dari situs SNP (Balladona 2020). Hasil menunjukkan bahwa terdapat beberapa persebaran situs SNP yang berhasil diperoleh dari proses pensejajaran empat aksesori sekuen gen SMT 1 yang terdeposit pada gene bank NCBI.

Dari situs-situs SNP yang muncul, pada penelitian ini terpilih dua situs SNP. Pemilihan sebaran situs SNP tersebut dilakukan dengan cara memilih sekuen yang terdapat perbedaan satu basa nukleotida dan memiliki karakter *bi-alelik* yaitu satu basa nukleotida berubah menjadi basa nukleotida yang lain (Putri dan Wathon 2018). Dua situs SNP yang telah di peroleh dapat di lihat pada (Gambar 2). Situs SNP pertama memiliki substitusi basa A (Adenin) dan G (Guanin) dan posisi basa terletak di 420, sedangkan untuk situs SNP kedua memiliki substitusi basa T (Timin) dan C (Sitosin) terletak di posisi basa 428. Kedua hasil identifikasi situs ini akan digunakan untuk mendesain primer berbasis gen SMT 1.



Gambar 2. Dua situs SNP terpilih –yang diperoleh dari pensejajaran sekuen di *geneious prime*



Gambar 3. Tampilan WebSNAPER yang digunakan untuk mendesain primer SNAP

Tabel 2. Dua situs SNP (*Single Nucleotide Polimorphysm*) terpilih dan digunakan untuk mendesain primer gen SMT 1 pada tanaman kelapa sawit

SNP	Subtitusi Basa	Posisi SNP
		Basa
SMT1_SNP1	A ↔ G	420
SMT1_SNP2	T ↔ C	429

Keterangan : A= basa adenin, G= basa guanin, C= basa sitosin dan T= basa timin.

Tabel 3. Profil dua pasang primer SNAP (*Single Nucleotide Amplified Polimorphism*) Berbasis Gen SMT 1.

Primer	Ukuran amplicon (bp)		
	<i>Forward 5'-3'</i>	<i>Reverse 3'-5'</i>	
SMT1_R	GGTCCTCGTTCGCACTGCG C	CGCCAGAAGCGAGA	265
SMT1_A	TTTATGTGAAGGTCCTCGT T CGCACTTCTA	TCCAGAGCT	349
SMT2_R	TATGTGAAGGTCCTCGTTC GCACTGTTC	CGCCAGAAGCGAGA	273
SMT2_A	TTATGTGAAGGTCCTCGTT CGCACTGATA	TCCAGAGCT	274

Pada Tabel 2, hasil penelitian menunjukkan terdapat 2 situs SNP terpilih yang akan digunakan untuk mendesain primer berbasis gen SMT1.

Pada Tabel 2 terlihat substitusi basa pada SMT1_SNP1 terjadi substitusi antara basa yaitu basa Adenin (A) berubah menjadi basa Guanin (G) pada posisi basa 420. Sedangkan pada SMT1_SNP2 terdapat substitusi basa Timin (T) berubah menjadi basa Sitosin (C) pada posisi basa 429. Dua situs SNP tersebut digunakan sebagai marka berbasis gen SMT 1 untuk melihat keragaman genetik dan hubungan kekerabatan pada tanaman kelapa sawit terhadap karakter pertumbuhan batang melambat.

Desain Primer Berdasarkan Situs SNP

Setelah mendapatkan situs SNP yang diperoleh dari hasil pensejajaran selanjutnya situs SNP terpilih dijadikan materi untuk melakukan desain primer dengan perangkat lunak Web SNAPER (Gambar 3). Situs SNP target ditandai sebagai [X/Y] dimana X/Y adalah basa nukleotida untuk alel alternatif. Beberapa parameter selanjutnya diisi sesuai dengan desain marker SNAP. Setelah terisi seluruhnya selanjutnya dilakukan submit dan perangkat lunak Web SNAPER akan mengirimkan hasil analisisnya dalam bentuk pesan elektronik ke alamat email pengguna yang selanjutnya dikonversi dan dibaca menggunakan MS.Excel. Proses desain primer tersebut diulang kembali untuk setiap posisi SNP pada runutan DNA yang diinginkan. Hal ini juga telah dilakukan pada penelitian; Handini (2014), Salsabila (2019), dan Rizal (2020).

Kandidat Primer SNAP

Hasil primer yang didapatkan terpilih dua pasang primer yang digunakan untuk analisis keragaman genetik terkait pertumbuhan tinggi batang melambat. Dua pasang primer terdiri dari primer

reference dan *alternate*. Profil primer SNP berbasis gen SMT 1 dapat di lihat pada Tabel 3. Primer yang telah didesain digunakan untuk analisis keragaman genetik terkait pertumbuhan tinggi batang melambat. Pada profil primer (Tabel 3) terdapat informasi primer forward dan reverse. Panjang primer pada penelitian ini adalah 20-30pb. Rata – rata panjang primer umumnya berkisar 18-30pb (Sasmito *et al .*, 2014). Terdapat informasi ukuran amplicon produk PCR pada masing-masing primer. Ukuran amplicon berbeda pada setiap pasang primer. Target ukuran amplicon pada penelitian ini berkisar antara 265-349 pb (*base pair*). Target amplicon tersebut diharapkan dapat teramplifikasi pada sampel DNA sehingga fragmen gen target dapat teramplifikasi.

SIMPULAN

Pada penelitian diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Telah dilakukan desain primer berbasis gen SMT 1 untuk menganalisis keragaman genetik karakter pertumbuhan tinggi batang melambat pada tanaman kelapa sawit.
2. Terdapat dua kandidat primer yang telah berhasil didesain, dengan masing-masing primer terdiri dari alel *reference* dan alel *alternate* serta terdapat ukuran amplicon pada setiap pasang primer.

DAFTAR PUSTAKA

- Ainni, NI. 2014. Identification of differentially expressed genes related to hight increment in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Thesis. Malaysia. Universiti Putra Malaysia.

- Balladona, F.K., Ismail, M., Dewi, S., Sudarsono. (2020). Pengembangan Penanda Molekuler Berdasarkan Situs SNP dan Indel Genom Kloroplas Kelapa. *Jurnal Agronida*. 6 (1).
- Basuki, S. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Fragmen Gen Penyandi Enzim Putresis N-Metil Transferase yang Terkait dalam Biosintesis Nikotin dari Tanaman Tembakau Lokal (*Nicotiana tabacum*). *Disertasi*. Indonesia. Institut Pertanian Bogor.
- Carland F, Fujioka S, Nelson T. 2010. The Sterol Methyltransferase SMT1, SMT2, and SMT3 Influence Arabidopsis Development through Nonbrassinosteroid Products. *Plant Physiology*. Vol. 153: 741-756.
- 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., Tinker, P.B. 2015. *Oil Palm: Fifth Edition*. West Sussex: John Wiley & Sons Co., Ltd.
- Ditjenbun. (2021). Statistik Perkebunan Indonesia Komoditas Kelapa Sawit. *Direktoral Jendral Perkebunan*. Departemen Pertanian. Jakarta.
- Fakih, M.T., Salsabila, W., Sani, E.P. 2021. Desain Primer Gen 12S RNA dari DNA mitokondria sus scrofa secara in silico sebagai kandidat primer dalam analisis molekuler kehalalan Produk. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis* 8 (3), 316-322.
- Handini, AS. 2014. Analisis keragaman morfologi dan biokimia pada anggrek *Phalaenopsis* serta analisis keragaman genetik dengan marka SNAP. Tesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Natawijaya, A. 2018. Keragaman dan struktur genetik plasma nutfah kelapa sawit koleksi taman buah mekarsari berdasarkan karakter agronomi dan marka mikrosatelit *Disertasi*. Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- Peterson, GW., Dong, Y., Horbach, C., Fu, YB. 2014 Genotyping-by-sequencing for plant genetic diversity analysis: a lab guide for SNP genotyping. *Diversity*. 2014 (6): 665-680.
- Putri, A., Syubanul, W. 2018. Aplikasi single nucleotide polymorphism (SNP) dalam studi farmakogenomik. *Jurnal BioTrend*. Vol 9 (2): 69-74.
- Rizal, S., Dewi, S., Roberdi, S., Tony, L., Sudarsono. 2020. Isolasi dan karakterisasi potongan DNA gen sterol methyltransferase 1 (SMT 1) asal kelapa sawit. *Jurnal Agron*. 48 (3): 348-354.
- Salsabila, A.S. 2019. Identifikasi Single Nucleotide Polymorphism (SNP) pada Gen terkait Pertambahan Tinggi Batang Kelapa Sawit. Tesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sutanto, A., Hermanto, C., Sukma, D., Sudarsono. (2013). Pengembangan Marka SNAP Berbasis *Resistance Gene Analogue*. *J. Hort*. 23(4), 300-309.
- Sutanto A. 2014. Karakterisasi Molekuler Ketahanan Beberapa Kultivar Pisang (*Musa spp*). Terhadap Penyakit Layu Fusarium Oxysporium sp. Cubense *Disertasi*. Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- Tang, J., Han, Z., Chai, J. 2016. Q&A: What are brassinosteroid and how do they act in plants. *BMC Biology*. 14:11.