

Primer Construction of Transporter Genes Based on Almt1 for The Analysis of Cmp-Sialic Acid Transporter Gene in Derendan

Taufikurrahman¹, Fatma Jumaita Putri¹, Nurbaiti¹, Putri Oktavia Ramadhani¹,
Ninik Nihayatul Wahibah^{1*}

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Pekanbaru, Indonesia;

Article History

Received : June 19th, 2025

Revised : June 26th, 2025

Accepted : July 02th, 2025

*Corresponding Author:

Ninik Nihayatul Wahibah,

Jurusan Biologi, Fakultas

Matematika dan Ilmu

Pengetahuan Alam,

Universitas Riau,

Pekanbaru, Indonesia;

Email:

ninikwahibahh@gmail.com

Abstract: Derendan (*Lansium* sp.) is an underutilized endemic fruit tree species from Bengkalis Island that grows in acidic peatland soils with high concentrations of toxic aluminum ions (Al^{3+}). This study aimed to construct gene-specific primers to detect stress tolerance genes in derendan, with an initial focus on the *ALMT1* (Aluminum-activated malate transporter) gene, which is known to mediate aluminum detoxification through organic acid exudation. Primers were designed based on *ALMT1* sequences from model species and tested using PCR amplification and sequencing of derendan genomic DNA. Surprisingly, the amplified DNA fragment showed high similarity with *CMP-sialic acid transporter 1* genes in several plant species, based on BLASTn analysis. The *CMP-sialic acid transporter* gene encodes a protein involved in the transport of sialic acid, an organic acid known to play roles in abiotic stress responses. These findings suggest that the constructed primers may target conserved transporter domains related to stress adaptation. The resulting primers have potential applications in molecular studies and breeding programs aimed at enhancing peatland stress tolerance in derendan and related species.

Keywords: Abiotic tolerance, ALMT1, Bengkalis Island, CMP-sialic acid transporter, derendan, primer design, peatland stress.

Pendahuluan

Derendan (*Lansium* sp.) merupakan salah satu spesies tanaman buah-buahan endemik Pulau Bengkalis yang termasuk kedalam famili Melliaceae. Derendan memiliki kemiripan morfologi yang hampir mirip dengan buah dari famili Melliaceae lainnya, namun kulit buah derendan lebih tipis, bertekstur kasar dengan bintik-bintik hitam putih di permukaan kulit buah, dan memiliki ukuran buah yang lebih besar dibandingkan dengan buah duku. Buah derendan juga memiliki rasa yang lebih manis dibandingkan duku. Derendan mempunyai banyak manfaat antara lain daun dan kulit batang pohon mengandung senyawa antioksidan yang mampu menangkal dampak negatif oksidan dalam tubuh (Utami *et al.* 2016). Derendan merupakan salah satu buah yang kurang dikenal oleh masyarakat luas disebabkan informasi terkait potensinya masih terbatas, sehingga buah

ini termasuk kedalam golongan tanaman buah yang kurang dimanfaatkan (Gambar 1) (Anggraeni *et al.* 2023).

Berbeda dengan genus *Lansium* lainnya, spesies derendan memiliki penyebaran populasi yang sangat terbatas, terutama di Pulau Bengkalis. Tumbuhan ini mampu beradaptasi dengan baik di wilayah ini karena didominasi oleh tanah gambut yang memiliki pH asam (Siregar 2021). Wilayah pada lahan gambut memiliki tingkat kesuburan rendah yang diakibatkan oleh tingkat keasaman yang tinggi dan konsentrasi aluminium yang bersifat toksik bagi tanaman (Khotimah *et al.* 2020). Unikny, derendan memiliki kemampuan toleran cekaman (*stress tolerance*) terhadap lahan gambut tersebut. Studi informasi molekuler terkait dengan toleransi derendan terhadap cekaman aluminium lahan gambut masih belum terungkap.

Salah satu elemen paling dominan dalam

tanah gambut adalah aluminium (Al), yang bersifat tidak esensial bagi sejumlah tanaman yang sensitif terhadap perubahan pH (Daspute *et al.* 2017). Pada tanah yang asam, ion aluminium akan berada dalam bentuk trivalen (Al^{3+}) yang akan merusak membran dan dengan cepat dapat menghambat pertumbuhan akar (Tasma 2016). Adapun mekanisme pertahanan beberapa tanaman terhadap elemen aluminium ini adalah dengan bergantung pada pelepasan anion organik seperti malat, sitrat, dan oksalat dari bagian akar yang mampu mengkelat (membentuk kompleks stabil antara ion logam dengan molekul organik) Al^{3+} untuk mencegahnya berikatan pada dinding serta membran sel agar tidak memasuki sitosol (Liu & Meixue 2018).

Salah satu gen yang berperan dalam mengontrol toleransi terhadap aluminium (Al) adalah gen *ALMT* (*Aluminium-activated malate transporter*), khususnya kelompok *ALMT1*, yang menyandi protein transmembran. Protein ini berfungsi sebagai saluran anion dan berperan dalam berbagai proses pengangkutan anion organik maupun anorganik di dalam sel. Gen *ALMT1* terlokalisasi pada puncak akar yang sedang tumbuh (Gilliam & Maria 2021). Anion organik seperti malat memberikan ketahanan terhadap toksisitas Al pada tanah masam karena ketika asam malat dilepaskan dari akar, gugus karboksilnya akan mengkelat kation Al trivalen (Al^{3+}) sehingga menjadi kurang toksik (Liu & Meixue 2018).

Penelitian ini mengonstruksi primer berdasarkan sekuens gen *ALMT1* dari berbagai spesies yang tersedia di GenBank. Hal ini dikarenakan sekuens gen *ALMT1* diduga memiliki kemiripan dengan gen *CMP-sialic acid transporter*. Gen ini tergolong ke dalam kelompok gen penyandi protein transpor yang berfungsi dalam pengangkutan asam sialat, yaitu molekul yang terlibat dalam berbagai interaksi biologis seluler serta respon terhadap cekaman abiotik (Cakir & Olcay 2013). Keterkaitan fungsi antara *ALMT1* dan *CMP-sialic acid transporter* sebagai protein transpor asam organik membuka peluang eksplorasi lebih luas terhadap mekanisme adaptasi tanaman khususnya derendan terhadap cekaman abiotik (Dabravolski & Isayenkov 2023).

Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengonstruksi primer berbasis sekuens gen *ALMT1* guna mendeteksi gen transporter

yang terkait dengan cekaman abiotik, dengan fokus pada analisis gen *CMP-sialic acid transporter* pada tanaman derendan asal Pulau Bengkalis. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat berkontribusi dalam menambah informasi pada database GenBank. Selain itu, hasil yang didapat dari penelitian ini juga berperan dalam tahap seleksi pemuliaan spesies genus *Lansium* maupun spesies kerabat dekat lainnya yang potensial di lahan gambut. Dengan demikian, penelitian ini juga berkontribusi dalam menjaga keberlanjutan ekosistem di lahan gambut terutama pada Pulau Bengkalis

Bahan dan Metode

Waktu dan Tempat

Penelitian telah dilakukan dari bulan April 2024 sampai Juli 2024 di Laboratorium Genetika, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau. daun muda derendan diambil dari Pulau Bengkalis, Provinsi Riau.

Alat dan bahan

Alat untuk proses isolasi DNA adalah gunting daun, micropipete (VWR) ukuran 10 μ l, 200 μ l dan 1000 μ l, micro tip (Axygen) ukuran 10 μ l, 200 μ l, dan 1000 μ l, tube 1,5 ml (Axygen), tube 0,2 ml (Axygen), rak tube, mortar, pinset, spidol, timbangan digital (Accuris INSTRUMENTS), waterbath (P selecta), vortex (Maxi Mix II), hot plate (Cimarec), spin down, dan mesin sentrifus (Benchmark). Alat untuk proses elektroforesis adalah perangkat elektroforesis (Mupid-exU). Alat untuk proses PCR adalah mesin PCR (Hercuvan).

Bahan yang digunakan untuk proses isolasi DNA adalah sampel daun tanaman derendan, kit isolasi DNA Genomic DNA Mini Kit Plant (Geneaid), tisu dan isopropanol. Bahan yang digunakan untuk proses elektroforesis adalah bubuk agarosa (Thermo Scientific), buffer TBE 10X (Tris- boric acid EDTA) (Thermo Scientific), aquades, DNA Ladder 1 kb (Thermo Scientific), etidium bromida, parafilm dan DNA Loading Dye (Thermo Scientific). Bahan yang digunakan untuk proses PCR adalah KOD OneTM PCR Master Mix-Blue (Toyobo, Ltd), Molecular Biology Grade Water, template DNA dan sepasang primer.

Konstruksi Primer *ALMT1*

Eksplorasi sekuens nukleotida terkait sekuens gen *ALMT1* di *database* GenBank pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> menggunakan kotak pencarian dengan kata kunci, yaitu *ALMT1*. Sekuens gen *ALMT1* yang dipilih yaitu sekuens gen hasil penelitian *non predicted* atau penelitian secara *in vivo* pada beberapa tumbuhan yang mengapi wilayah CDS. Konstruksi primer secara manual dilakukan berdasarkan parameter panjang primer dengan kisaran 18 sampai 30 basa. Kemudian dari hasil konstruksi primer, dipilih dua pasang kandidat primer dan dilakukan analisis karakteristik primer seperti panjang basa, kandungan GC, *Temperature Melting* (Tm) atau suhu saat ikatan DNA menjadi tunggal, dan *Temperature Annealing* (Ta) atau suhu yang diperkirakan agar primer dapat berikatan dengan *template* DNA secara stabil. Selanjutnya dilakukan pembuatan primer ke PT. Genetika Science untuk diperoleh dua pasang primer dengan konsentrasi 50 µm/M.

Persiapan Sampel dan Isolasi DNA Total

Sampel yang digunakan berupa daun muda segar. Proses isolasi DNA tanaman derendan dilakukan mengikuti prosedur dari protokol *Genomic DNA Mini Kit Plant* (Geneaid) untuk memperoleh *template* DNA. DNA total hasil isolasi selanjutnya dilakukan pengecekan dengan menggunakan elektroforesis gel (Wahibah *et al.* 2023).

PCR Menggunakan Primer *ALMT1* dan Sekuensing

Seluruh sampel DNA derendan diamplifikasi menggunakan dua pasang primer *ALMT1*. Komponen *mix* PCR yang digunakan pada penelitian ini adalah KOD One™ PCR Master Mix-Blue (Toyobo, Ltd), *Molecular Biology Grade Water*, *template* DNA dan sepasang primer (Tabel 1.).

Proses tahapan PCR terdiri atas pra-PCR, *denaturation* (pemisahan dua utas DNA), *annealing* (penempelan primer), *extension* (pemanjangan) dan pasca-PCR. Jumlah siklus dari proses *denaturation* hingga *annealing* menghasilkan 35 siklus dengan lama waktu untuk melakukan pra-PCR adalah 2 menit dengan suhu 94°C, *denaturation* selama 30 detik dengan suhu 94°C, dan *annealing* selama 30 detik dengan suhu 55°C. Pada proses *extension*

selama 30 detik dengan suhu 68°C dan diakhiri dengan proses pasca-PCR dengan waktu tak terhingga dengan suhu 15°C.

Hasil PCR dielektroforesis untuk mengetahui keberhasilan amplifikasi. Selanjutnya hasil PCR beserta 30 µl primernya (*forward* dan *reverse*) dikirim ke PT. Genetika Science Indonesia, Jakarta Barat untuk proses sekuensing.

Analisis Data Sekuens *ALMT1* dan Sekuensing

Data hasil sekuensing diperiksa menggunakan *software* BioEdit. Sekuens dianalisis menggunakan program BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool nucleotide*) untuk melihat kemiripannya dengan *database* yang ada di GenBank pada *website* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Setelah sekuens terkonfirmasi sebagai wilayah gen *ALMT1*, selanjutnya dilakukan konstruksi primer menggunakan *software* Primer3Plus. Primer yang diperoleh kemudian divalidasi untuk menentukan spesifitas primer tersebut.

Hasil dan Pembahasan

Konstruksi primer *ALMT1*

Sekuens nukleotida penyandi protein *ALMT1* diperoleh melalui pencarian pada *database* GenBank, yang mendapatkan 11 sekuens dari berbagai spesies. Seluruh sekuens tersebut berasal dari molekul mRNA yang telah dikonversi menjadi cDNA. Di antara 11 sekuens tersebut, dua di antaranya merupakan *non predicted* sekuens, yakni milik *Arabidopsis thaliana* (NM_100716) dan *Triticum aestivum* (NM_001405814) (Gambar 2.). Kedua sekuens ini dipilih sebagai acuan dalam konstruksi primer *ALMT1* untuk tanaman derendan (Gambar 3).

Hasil ini sejalan dengan temuan Daspute *et al.* (2017), yang menunjukkan bahwa gen *ALMT1* pada *Arabidopsis thaliana* telah berhasil dikarakterisasi dan terbukti berperan penting dalam toleransi terhadap aluminium melalui eksudasi malat. Namun, terdapat perbedaan pendapat dalam beberapa studi terkait konservasi urutan *ALMT1* antarspesies. Variasi sekuens cukup signifikan antar spesies sehingga menyulitkan penyusunan primer universal (Kochian *et al.* 2015). Meskipun demikian, pemilihan dua sekuens *non predicted* dari spesies

model dinilai representatif karena memiliki karakter yang telah divalidasi secara fungsional dalam konteks toleransi terhadap Al.

Masing-masing jenis primer terdiri dari bagian *forward* dan *reverse*. Primer *forward* dipilih sebanyak 20 basa pada bagian awal *complete* CDS (*Coding Sequence*) yang memuat kodon start yaitu ATG. Kodon ATG ini akan diubah menjadi kodon AUG saat proses translasi.

Hal yang sama juga dilakukan pada primer *reverse* yang diambil pada bagian akhir sekuens CDS yang memuat kodon stop berupa TAG, TAA, dan TGA, namun dilakukan *reverse complement* atau mengubah urutan DNA menjadi suatu urutan yang dibalik. Hal ini sesuai dengan karakteristik struktur DNA yang berbentuk *double helix* dan bersifat antiparalel.

Arabidopsis thaliana (thale cress) (1961 bp)

ORIGIN

```
1 ctccgaagtgc aacgcaccac taatttttta taaattattaa cataacattt catgagtcct
61 aaacaagagt cttctcttgg ctttataaat acatgatccc atgtacataaa aaacaacaag
121 tcatcttttc ttctctatct aaggtatcca gaaatcaga aaacacttga gagaactgag
181 tgaccatcaa aagtggtttg gagaagaagt agagaagatg tgagagaagg gattatgaga
241 ggaagaagag acccgagaag aattattcat gctttcaaa tggaacttgc tctgttttgg
301 tctcttctct tctattatta ccaactcttc gctctttca cggattactt cggatcaaat
361 gcaatgtggg ctgcatgagc cgtgtgtgtt gtctttgaat tctcgttagg ggtacacatt
421 ggaagaagag taatcagagc agtggcaaca ttagtacagc gaggactagg aattggagctt
481 catcaactag caagattgtc ggttgcaaca gtggaacctt tcttttgttg catgtgtgtc
541 tttgtgcaag ctgctgtgtc gacgttgcta aggtttttcc catgggtaaa gacaaggttc
601 gattatggga tatgtgattt catattgacg ttcgcgtgta tatcgtgttc ggggtttaga
661 gacgaagaga taatggattt ggcagaagc agactatcga cagtgtgtat tggaggagtc
721 agttgcatcc ttatctctat cttgttgtgt cctgtttggg ctggacaaga tctacattct
781 cctcttgctc ctacttttga cactctctcc cactctcttc aagatttttg ggaagaatat
841 ttgaagcga gagaagaagg ggaactcaaa gtatggaga agaggaaaaa gaactcttgg
901 agatataaaa ggtgttttga cttcaaaagg gatgaagaag ctttgggtat taacgcagaa
961 ttggaacgcg ccatctggca atttagttt aggtatccat ggaacataa ttgtgctgtt
1021 gttcatcatt tccggaagt tgcctcaagg attgatgctt ggaattcata catcaactca
1081 tattttcaga tccagtgga cataaaaaa aaattagaaa caccattaa agaatgagc
1141 tgggaatcgg gaaactcaat gaaagaaatg tccatttcac taaaacaaat gataaataa
1201 tcttcttctg atactccatg ctaaaactca caagctgcat gcaaatctct tctacttta
1261 ttttaactcg gcatcttga cgtgtttgag cctcttcaaa tgatctcatt gatgacgact
1321 tctccatcgc tcatagatat tgttaactta accgaaaaga tctcgaatc tttacacgag
1381 cttgcatcgc ctgcaagatt taagaacaa atgagccgca cgtgtctata cgagaagtgc
1441 gattccggaa gcaattgttg tccatgcca atagattctc atgaagatca tcatgtgttc
1501 acagttttac atgacgttga taatgataga tcaaaacatg ttgatgattc acgtggaggg
1561 agttcacagg aetcatgtca tcatgttgc ataaagattg ttgatgataa ctcaaacatt
1621 gaaaacatg aagatgttga atacatgta catacttaa gtaatgggca tcttcagtaa
1681 gtaattcaac tcaattattg aggaagcgtc tttttaccg gcaagattat agagacgaga
1741 ctaactgatt ataacattat cgggtatttc attcagattt gaagtgtgtt acaatactta
1801 ttgcgtcttt tgactacttt tgaactattt gtaacattt taataaagtc ttgttcttgc
1861 ttttcttttg cgttactctt ttaagaattt ttatatacaa ctgatcaaaa aatttaaaaa
1921 tagcatggtt ttatttttgg attatgtgtt tttagagaga t
```

Triticum aestivum (bread wheat) (1972 bp)

ORIGIN

```
1 tccacacgca cgagcagcag gcaatagcac agcgaacgca gatcgggtcc atgatattca
61 ttcccacagg ccccaataaa aacacgtacg gacgttcgca gggcgagagt cgtatctgac
121 agcggcgtgc cctcagagg tggatctcgg cggaggcgcg cgtctggaag ggcgctatcc
181 agcggagcgc accggcaggg gggggaacgc cgtctctaac gtacgcgctt cgtgtgttcc
241 cctggcgcact gatttgggta ggcggttgga ttggttaga ggaatgtgag cgcgcatagt
301 gtttgcgcgc cagtgcctaa ctgcgcactt gctctaaag cgcggtgcta ggttactgta
361 ctttaattagc agcgcgcgac gctgttgagg ttgattgca tctgccttg atattgatac
421 cgggaagag agcgaacggc agatggttgg cactctcgcc agctcgccgc tctgtctoca
481 ctegtctctc gccgggctcg ggcgtgcgca cgcgggttgc gcccggaagg tggcgcgccg
541 cggcgaggag gaccgcaggg ggttgccgca ctctgcctaa ctgcggctgg cgtctgcgct
601 ggtgtcgttc gtctacttgc tcaacgcgct cttaacgcgc ctgcgggtgt ccgctgatgt
661 ggcgctgctc accgtctgtc tctcatgaga gtacacgcgc ggtgcacgc tgagtaaaag
721 ttggaacaga gcttggcga cgtgtgttgc ttgctgcato gccgtcgagc ctcactgatt
781 agctgaatta gctgaacgtc gttgtgatca gggagagccc atgatgctca cgtgtcgtc
841 tttcttctga gctgaacgcy gacgtcttct gctcttcac cggagatca aggcgaata
901 ggaactacgc gtpacatct tcatctgac cttcgtctg ttgcccgtgt cgaattaaag
961 agtgaagag ctcactcagg tccgcacga cgcgtctcac accatagcgc tccgctgtct
1021 catctgctct tgaacacacg tttctctctt cccgtctcgg gccgagagg agctcaacaa
1081 gctcgtctcc ggaacactgc acaactctgc tcatctcatt gaaggaatgg aattcaacaa
1141 ctttgcgaa aacagtgttg caataattt tgggggaaag gattccccc aaatgcacaa
1201 gacgtctctt aattcgaag ccaactgaga ctctttgtgc acctttgca aatggagcc
1261 tctcatggc cagttcagat ttgcacaccc atggagccaa taccagaagc tgggaactct
1321 ttctgcgcaa tctcgtctt ctatggagc tctgtctca tatgtatca caactctaaa
1381 aaccacgtgc cctgctgca ccaacccctg gctatcatgt aagttcgaa aaacatgtgg
1441 gaaatgagc ttgacttct ccaaggtgct tagggatctc gaaatggca ctgcgaacat
1501 gactgtgccc tctcagtgta ataccacctt ggtacagcc gttgaagcag cggaaagcct
1561 gagaagcag cttgcagaga acacgctctt gttgcaatgt atgcattggg ccgtcacccg
1621 aacactctct gggactcttg ttgatgggtt gaaagaatc ggggaattgt ttgatgctct
1681 agaaagactc gggactctta agaacccgca ggaacacaaa aatgtctgtt tcatgacggc
1741 gactcagagg atagacacac ctttgcctga gctgttatt ttgaaatct tcaaacatt
1801 ggtagactat atgtgaga acatggtagt actatagtag tactatgatt caactacgta
1861 gggctctgta ttggttgatt tagatttatt actcgtgaga catgttgat atatgacgca
1921 ttttccatat gcttggccac agtaatatga tagataaac atgataatgc gc
```

Gambar 2. Sekuens gen *ALMT1* pada spesies (a) *Arabidopsis thaliana* (b) *Triticum aestivum*

Hasil konstruksi primer dari spesies *Arabidopsis thaliana* dan *Triticum aestivum* (Tabel 1.)

Tabel 1. Hasil Kontruksi primer *ALMT1*

Nama Primer	Tipe	Primer
Almt1-derendan1	<i>Forward</i>	5' ATG-GAG-AAA-GTG-AGA-GAG-AT 3'
Almt1-derendan1	<i>Reverse</i>	5' TTA-CTG-AAG-ATG-CCC-ATT-AC 3'
Almt1-derendan2	<i>Forward</i>	5' ATG-GAT-ATT-GAT-CAC-GGC-AG 3'
Almt1-derendan2	<i>Reverse</i>	5' TTA-CAA-AAT-AAC-CAC-GTC-AG 3'

Berdasarkan tabel diatas, maka didapatkan dua pasang primer yang dikonstruksi menggunakan sekuens gen *ALMT1* dari dua spesies tanaman yaitu primer Almt1-derendan1 dengan panjang sekuens 1961 panjang basa (pb)

dan primer kedua yaitu Almt-derendan2 dengan panjang sekuens 1972 pb. Kedua primer ini mengapit wilayah *complete* CDS (*Coding Sequence*) yang dikonstruksi dengan memperhatikan karakteristik primer (Tabel 2.).

Tabel 2. Hasil konstruksi primer *ALMT1*

Nama Primer	Tipe	Mulai	Ukuran (pb)	Tm (°C)	Ta (°C)	Persentase GC
Almt1-derendan1	<i>Forward</i>	199	20	50	55	40
Almt1-derendan1	<i>Reverse</i>	1680	20	49.7	54.7	40
Almt1-derendan2	<i>Forward</i>	407	20	52.4	57.4	45
Almt1-derendan2	<i>Reverse</i>	1786	20	48	53	35

Primer-primer yang telah dikonstruksi pada penelitian ini selanjutnya digunakan untuk

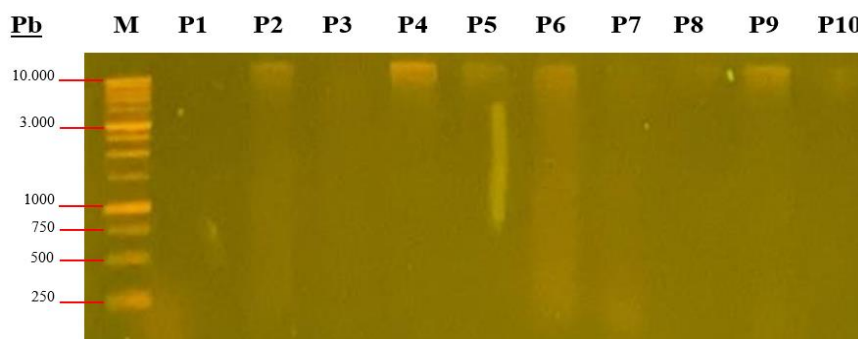
mengamplifikasi wilayah gen *ALMT1* pada derendan. Salah satu karakteristik primer yang

harus diperhatikan ialah panjang basa, Tm dan persentase GC primer. Menurut Khaira *et al.* (2023), panjang primer harus berkisar antara 15-30 nukleotida (basa), suhu leleh optimal (Tm) primer berkisar antara 52-58 °C, namun dapat diperluas hingga 45-65 °C. Tm akhir untuk kedua primer harus berbeda tidak lebih dari 5 °C dan kandungan GC yang optimal harus berkisar antara 40-60%.

Profil Pita Hasil Isolasi DNA Total Derendan

Isolasi DNA total dilakukan dengan

menggunakan sepuluh sampel derendan yang didapatkan dari 10 pohon derendan yang berbeda. Hasil elektroforesis DNA total derendan menunjukkan pola pita yang tebal, terang, dan terlihat *smear* serta tampak putus-putus pada bagian bawahnya yang terdapat pada sampel pohon keempat. Pada sampel lainnya menghasilkan pola pita DNA, namun tidak terlihat begitu jelas ketebalannya (Gambar 3). Oleh karena itu dipilih sampel pohon keempat untuk digunakan sebagai template DNA dalam proses PCR.



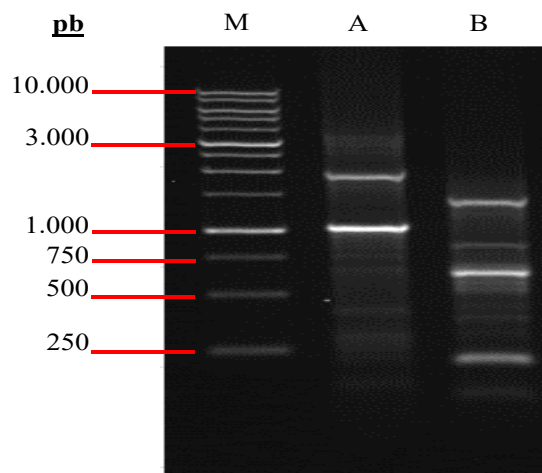
Gambar 3. Hasil elektroforesis DNA total derendan. M = 1 kb DNA ladder (*Thermo Scientific*); P = Hasil isolasi DNA total 10 sampel dari pohon derendan berbeda.

Profil Pita Hasil PCR Menggunakan Primer *ALMT1*

Visualisasi hasil PCR menggunakan elektroforesis (Gambar 5.) memperlihatkan bahwa primer yang telah dikonstruksi diduga berhasil mengamplifikasi beberapa wilayah sekuens gen *ALMT1* pada derendan. Primer tersebut bersifat komplemen dengan sekuens DNA *template* derendan. Hal ini ditandai dengan adanya pita DNA atau *band* yang terdeteksi dengan ukuran 650 pb dan 1400 pb menggunakan primer Almt-derendan1 serta ukuran 1300 pb dan 2200 pb menggunakan primer Almt-derendan2. Pita yang tebal, bersih, dan sesuai ukuran target pada hasil elektroforesis merupakan hasil yang optimal.

Hasil optimasi suhu annealing pada kedua jenis primer menunjukkan adanya pita DNA pada suhu 55°C. Optimasi suhu annealing yang tepat perlu dilakukan, karena suhu annealing merupakan suhu yang diperkirakan agar primer dapat berkaitan dengan DNA secara stabil, jika suhu terlalu tinggi atau rendah dapat menyebabkan

penempelan primer pada sekuens DNA menjadi tidak stabil bahkan bisa gagal. Penggunaan suhu annealing 55°C dan 35 siklus amplifikasi dianggap telah mampu mengamplifikasi sekuens *ALMT1* pada tumbuhan derendan asal Pulau Bengkalis Riau.



Gambar 5. Hasil Elektroforesis produk PCR sampel derendan. M = 1 kb DNA ladder (*Thermo Scientific*); A: PCR menggunakan primer Almt1-

derendan1; B: PCR menggunakan primer Almt1-derendan2.

Analisis Hasil Sekuensing

Produk PCR derendan diubah menjadi data urutan basa nukleotida untuk memastikan karakteristik sekuens yang teramplifikasi melalui proses sekuensing DNA. Sekuensing DNA merupakan metode yang digunakan untuk menentukan urutan basa A, T, G, dan C dalam sekelompok DNA. Hasil sekuensing DNA yang diperoleh pada hasil visualisasi elektroforesis yang teramplifikasi menggunakan primer Almt1-derendan1, menghasilkan hasil yang tidak dapat terbaca dengan baik sedangkan dengan menggunakan primer Almt1-derendan2

dengan pita DNA yang berukuran 2200 pb menghasilkan hasil yang dapat terbaca dengan baik.

Urutan basa nukleotida dari sekuens gen *ALMT1* derendan yang berhasil teramplifikasi tersebut kemudian dianalisis menggunakan program BLASTn untuk mencari kemiripannya dengan sekuens di *database* GeneBank. BLASTn merupakan program yang terdapat pada *website* NCBI yang berfungsi dalam mencari kemiripan suatu sekuens basa nukleotida yang dimiliki dengan *database* yang ada pada GenBank yang terdapat pada situs NCBI (Lokapirnasari *et al.* 2017).

Tabel 5. Pensejajaran sekuens *ALMT1* pada sampel derendan menggunakan BLASTn

No	Deskripsi	Skor Maksimal	Skor Total	Query Cover (%)	E-Value	Identity (%)	Akses
1	PREDICTED: Prunus dulcis CMP-sialic acid transporter 1 (LOC117628843), transcript variant X2,mRNA	152	152	13	2e-31	84.42	XM_034361379.1
2	PREDICTED: Pistacia vera CMP-sialic acid transporter 1-like (LOC116113850), mRNA	143	143	15	1e-28	82.25	XM. 031400014.1
3	PREDICTED: Citrus clementina CMP-sialic acid transporter 1 (LOC18049916), transcript variant X1 ,mRNA	64,3	64,3	79	3e-09	48.53	XP_024192591.1

Hasil kemiripan BLASTn, sekuens yang diperoleh dalam penelitian ini memiliki kemiripan dengan sekuens *CMP-sialic acid transporter 1* pada beberapa tumbuhan. Hal ini berarti sekuens hasil sekuensing merupakan sekuens *CMP-sialic acid transporter 1* pada derendan. Gen ini menyandi protein transpor asam sialat pada tumbuhan. Asam sialat berfungsi sebagai penentu utama struktur oligosakarida yang dapat memediasi berbagai reaksi biologis fenomena seperti komunikasi sel-sel, interaksi sel substrat, adhesi, dan penargetan protein (Cakir & Olcay 2013). Gen ini

memiliki keterkaitan dengan cekaman abiotik yang hampir sama dengan gen *ALMT1*. Selain itu kedua gen ini merupakan gen yang menyandi protein transpor asam organik pada tumbuhan.

Hasil primer sekuens *CMP sialic acid transporter 1* pada derendan dikonstruksi menggunakan Primer3Plus, yakni primer dCMP1 forward 5' TCA-ACT-GCA-AAA-GCA-GCA-CC 3' dan dCMP2 reverse 5' ACA-ACT-TTC-GGG-TAA-GGG-CA 3'. Primer tersebut berpotensi didalam mendeteksi gen cekaman toleran, khususnya di wilayah gambut Pulau Bengkalis.

Sehingga primer dan sekuens yang telah ditemukan berkontribusi pada pemuliaan maupun penelitian lebih lanjut.

Kesimpulan

Primer Almt1-derendan2 yang telah dikonstruksi menunjukkan keberhasilan amplifikasi pada derendan dengan terlihatnya pita DNA berukuran 2200 pasang basa (pb) pada hasil elektroforesis. Berdasarkan hasil kemiripan BLASTn, sekuens yang diperoleh dalam penelitian ini memiliki kemiripan dengan sekuens *CMP-sialic acid transporter 1* pada beberapa tumbuhan. Hasil primer sekuens *CMP sialic acid transporter 1* pada derendan dikonstruksi menggunakan Primer3Plus, yakni primer dCMP1 forward 5' TCA-ACT-GCA-AAA-GCA-GCA-CC 3' dan dCMP1 reverse 5' ACA-ACT-TTC-GGG-TAA-GGG-CA 3'. Primer tersebut berpotensi untuk mendeteksi gen cekaman toleran, khususnya di wilayah gambut Pulau Bengkalis. Sehingga primer dan sekuens yang telah ditemukan berkontribusi pada pemuliaan maupun penelitian lebih lanjut.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia dan Universitas Riau yang telah mendukung penelitian ini melalui hibah Program Kreativitas Mahasiswa bidang Penelitian Eksakta (PKM-RE) tahun 2024.

Referensi

- Anggraeni, A., Yuniati, R., Silalahi, M., Lestari, R. and Jumari. (2023). Cultivation of underutilized fruit trees by indigenous people in Urug Villlage, West Java, Indonesia. *Biodiversitas*, 24(1), 454-466. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240152>
- Cakir, B., and Olcay, A.C. (2013). Molecular cloning, phylogenetic analysis, and expression profiling of a grape CMP-sialic acid transporter-like gene induced by phytohormone and abiotic stress. *Genes Genom*, 35(1), 225-238. [10.5483/bmbrep.2005.38.4.440](https://doi.org/10.5483/bmbrep.2005.38.4.440)
- Dabravolski, S. A. and Isayenkov, S. V. 2023. Recent updates on ALMT transporters, physiology, regulation, and molecular evolution in plants. *Plants*. 12(1): 1-12. <https://doi.org/10.3390/plants12173167>
- Daspute, A. A., Ayan, S., Mutsutomo, T., Yuriko, K., Sanjib, K. P. and Hiroyuki, K. (2017). Transcriptional regulation of aluminium-tolerance genes in higher plants: clarifying the underlying molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, (8), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01358>
- Gilliam, M. and Maria, H. (2021). Alluminating structure key to stress tolerance. *Cell Research*, (32), 5-6. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00604-8>
- Khaira, A., Achyar, A., Zulyusri., Atifah, Y., Putri, D. H. and Violita. 2023. Primer design and optimalization of annealing temperature for analysis of glutathione reductase gene expression in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Biological Science, Technology and Management*, 5(1), 142-148. <https://doi.org/10.5614/3bio.2023.5.1.3>
- Khotimah, S., Suharjono., Ardyati, T. and Nurani, Y. (2020). Isolation and identification of cellulolytic bacteria at fibric, hemic and sapric peat in Teluk Bakung peatland, Kubu Raya District, Indonesia. *Biodiversitas*, 21(5), 2103-2112. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210538>
- Kochian, L. V., Piñeros, M. A., Liu, J., & Magalhaes, J. V. (2015). Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. *Annual review of plant biology*, 66(1), 571-598. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114822>
- Liu, J. and Meixue, Z. (2018). The *ALMT* gene family performs multiple functions in plants. *Agronomy*, 8(20), 1-18. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210538>
- Lokapirnasari, W.P., Sahidu, A.M., Nurhajati, T., Suprianando, K. And Yulianto, A.B. (2017). Sekuensing 16S DNA bakteri selulolitik asal limbah cairan rumen sapi peternakan ongle. *Jurnal Veteriner*, 18(1), 76-82.

-
- <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2017.18.1.76>
- Siregar, A., Hilwa, W., Kamsia, D. S., Fitra, S. H. dan Yudi, T. 2021. Karakteristik sifat kimia tanah lahan gambut di Perkebunan kencur Desa Sei Baru Kecamatan Panai Hilir Kabupaten Labuhanbatu. *Agrotechnology Research Journal*. 5(1), 56-62. <https://doi.org/10.20961/agrotechresj.v5i1.48434>
- Tasma, I. M. 2016. Gen dan QTL pengendali toleransi tanaman terhadap keracunan aluminium dan aplikasinya untuk pemuliaan tanaman di Indonesia. *Jurnal AgroBiogen*. 11(3): 111-124. <https://doi.org/10.21082/jbio.v11n3.2015.p111-124>
- Utami, R., Furi, M. dan Tryanasari, L. (2016). Uji aktivitas antioksidan ekstrak, fraksi daun, dan kulit batang derendan (*Lansium parasiticum* var. *Aqueum* (Jack) Kostm) dengan metoda DPPH. *Indonesian Chemia Acta*, 6(1), 10-17. <https://doi.org/10.59638/junomefar.v2i2.783>
- Wahibah, N. N., Putri, R. P., Muflikhah, L., Martina, A. and Arini. 2023. Analysis of resistance to fungal pathogen *Hemileia vastatrix* of liberica coffee based on functional marker. *International Journal of Phythopathology*, 12(1), 1-7. <https://doi.org/10.33687/phytopath.012.01.4371>