

ARTICLE

## **ANALISIS EKSPRESI RELATIF DAN PENYEJAJARAN GEN *Bmr12* PADA AKSESI SORGUM (*Sorghum bicolor* L. Moench)**

[*Relative Expression and Alignment Analysis of Bmr12 Genes from Accessions of Sorghum (Sorghum bicolor* L. Moench)]

Vincentia Esti Windiastri<sup>1, 2\*</sup>, Sintho Wahyuning Ardie<sup>3</sup>, Takuji Miyamoto<sup>4</sup>, Toshiaki Umezawa<sup>5</sup>, Satya Nugroho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pusat Riset Rekayasa Genetika, Badan Riset dan Inovasi Nasional

<sup>2</sup>Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Fakultas Pertanian, IPB

<sup>3</sup>Departemen Agronomi dan Hortikultur, Fakultas Pertanian, IPB

<sup>4</sup>Sakeology Center, Niigata University

<sup>5</sup>Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University

### **ABSTRAK**

Gen *Bmr12* (*SbCOMT*) diperkirakan mempunyai fungsi dalam penentuan kandungan total lignin pada sorgum karena mutasi gen *Bmr12* menyebabkan kandungan total lignin tanaman mutan tereduksi. Pada penelitian sebelumnya telah dikelompokkan aksesi-aksesi sorgum di Indonesia berdasarkan kandungan lignin tinggi dan lignin rendah (Buleleng Empok, JP dan Pahat). Untuk mengetahui pola ekspresi gen *Bmr12* pada kedua kelompok sorgum yang berbeda, maka dilakukan analisis level ekspresi relatif dari sorgum berlignin tinggi yang diwakili oleh aksesi KS, 4183, dan SMM; dan sorgum berlignin rendah yang diwakili oleh aksesi Buleleng Empok, JP dan Pahat. Sebagai data pendukung, dilakukan pula perunutan gen *Bmr12* yang diisolasi dari aksesi KS, 4183, Buleleng Empok dan Pahat. Hasil analisis tersebut memperlihatkan adanya perbedaan pola ekspresi gen *Bmr12*. Level tertinggi ada pada aksesi 4183A, dan yang terendah adalah aksesi Pahat. Keempat aksesi lainnya mempunyai pola ekspresi yang hamper sama. Perunutan dan penyejajaran gen *Bmr12* memperlihatkan adanya substitusi basa nitrogen yang mengarah ke substitusi asam amino pada aksesi KS. Namun substitusi tersebut tidak mengganggu fungsi gen *Bmr12* dalam biosintesis lignin.

**Kata kunci:** *Bmr12*, level ekspresi relatif, lignin, penyejajaran gen, sorgum

## ABSTRACT

*It is predicted that the Bmr12 gene in sorghum (SbCOMT) has some function in determining the total lignin content in sorghum. It is because mutation of Bmr12 gene causes the reduction of total lignin content in mutant plants. In a previous study, sorghum accessions in Indonesia were grouped based on their lignin contents: sorghum with high lignin content and sorghum with low lignin content. To determine the gene expression level of the Bmr12 gene in those two groups, we conducted the relative expression levels analysis for highly lignin sorghum, represented by KS, 4183, and SMM accessions; and low lignin sorghum represented by Buleleng Empok, JP and Pahat accessions. As supporting data, we sequenced Bmr12 gene isolated from KS, 4183, Buleleng Empok, and Pahat accessions. The results of the analysis showed that there were differences in the relative expression level of the Bmr12 genes. The highest level is the 4183A accession (25,59 times), and the lowest is the Pahat accession (1 time). The other four accessions have almost the same expression pattern. Sequencing and alignment of the Bmr12 genes showed that there were substitutions that led to amino acid substitutions in KS accession. However, these substitutions may not disrupt the function of the Bmr12 gene in the lignin biosynthesis.*

**Keywords:** *Bmr12, genes alignment, lignin, relative expression level, sorghum*

## PENDAHULUAN

Setiap tahunnya, limbah pertanian di dunia menghasilkan biomassa sebesar 9,4 milyar ton (Lang *et al.*, 2019). Sejak tahun 2022, 10 persen dari produksi biomassa berasal dari limbah pertanian. Oleh karena itu, limbah pertanian mempunyai potensi untuk dimanfaatkan sebagai sumber produksi biomassa, terutama biomassa lignoselulosa. Lignoselulosa adalah senyawa polisakarida yang terdiri dari selulosa, hemiselulosa dan lignin. Saat ini lignin telah banyak dimanfaatkan dalam berbagai industri, mulai dari biopolimer, bioenergi dan biofuel (Bajpai, 2017). Pemanfaatan limbah pertanian sebagai sumber lignin adalah langkah yang strategis, karena ketersediaan bahan yang lebih berkelanjutan dari sisi ekologis. Meskipun demikian, jumlah total lignin pada tanaman pertanian – yang biasanya adalah tanaman golongan rumput-rumputan (Poaceae), lebih sedikit dari pada jumlah total lignin pada tanaman berkayu (Umezawa, 2018). Oleh karena itu untuk memanfaatkan lignin dari tanaman rerumputan secara optimal diperlukan adanya manipulasi kandungan lignin dari tanaman pertanian, terutama tanaman yang mempunyai biomassa yang besar.

Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) merupakan salah satu tanaman serealia yang potensial dimanfaatkan sebagai sumber lignoselulosa. Total produksi sorgum di dunia mencapai 58,7 juta ton (WBA, 2022). Per tahunnya sorgum menghasilkan 51,8 juta ton limbah pertanian (Lang *et al.*, 2019) dan diperkirakan dapat menghasilkan lignoselulosa sebesar 19-47 ton/ha per tahun (Hattori dan Morita, 2010). Sorgum telah ditanam luas di seluruh dunia karena plasma nutfah sorgum beragam dan adaptasinya yang luas. Sorgum dapat digunakan sebagai materi genetik untuk gen terkait biosintesis lignin karena sorgum telah digunakan model genetik, khususnya sebagai referensi dalam penemuan gen dan analisis genom fundamental (Olson *et al.* 2012; Mullet *et al.* 2014).

Jumlah total lignin, struktur dan komposisi lignin sangat bervariasi antar-spesies, jaringan dan tipe sel tanaman (Vanholme, 2019). Wahyuni *et al.* (2019) melaporkan total kandungan lignin dari 30 aksesori sorgum Indonesia. Ketigapuluh aksesori tersebut dibagi ke dalam tiga kelompok, yaitu kelompok total lignin tinggi yang terdiri dari aksesori Konawe Selatan (KS), 4183A, dan Sorgum Malai Mekar (SMM); kelompok total lignin menengah yang terdiri atas aksesori Super 2-300Gy, Super 1 dan Kawali; dan kelompok total lignin rendah, yang terdiri atas aksesori Buleleng Empok (BE), JP, dan Pahat. Urutan aksesori adalah sesuai dengan urutan rangking dari tertinggi ke rendah. Variasi kandungan lignin antar-aksesori sorgum diduga akibat perbedaan ekspresi gen-gen yang berperan dalam biosintesis lignin.

Enzim caffeic acid O-methyltransferase (COMT) mempunyai peranan penting dalam biosintesis lignin. COMT adalah enzim metiltransferase yang bergantung pada S-adenosil metionin untuk metilasi 5-hidroksikoniferil alkohol dan 5-hidroksikoniferil aldehida dalam menghasilkan prekursor monolignol S; sinapil alkohol dan sinapil aldehida (Jung *et al.*, 2012). Pada sorgum, hanya

satu lokus yang mengkode COMT fungsional (*SbCOMT*) yang struktur kristal dan kinetika enzimatisnya telah dijelaskan (Green *et al.*, 2014). Adanya gangguan pada ekspresi COMT dapat menyebabkan penurunan kandungan total lignin. Hal ini telah dibuktikan pada beberapa eksperimen. Saat tanaman jelai mengalami mutasi pada gen *HvCOMT*, maka tanaman mutannya dapat mengalami penurunan kandungan total lignin hingga 14% (Lee *et al.*, 2021).

Pada tanaman sorgum diketahui bahwa gen *Bmr12* (Brown Midrib12) mengkodekan COMT (Saluja *et al.*, 2020). Adanya mutasi *Bmr12* mempengaruhi aktivitas enzim COMT sehingga menyebabkan berkurangnya aktivitas enzim COMT dan terjadinya penurunan kandungan total lignin tanaman sorgum hingga hampir 30% (Tetreault *et al.* 2020). Selain itu, mutasi *Bmr12* juga mengakibatkan penurunan kandungan unit S dan rendahnya unit triclin karena adanya metilasi prekursor triclin, yaitu luteolin dan selgin (Eudes *et al.* 2017). Namun belum ada laporan mengenai profil ekspresi gen *Bmr12* pada sorgum non mutan yang berlignin tinggi dan rendah, serta bagaimana perbandingan urutan basa gen *Bmr12* pada tanaman sorgum berlignin tinggi dan rendah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil ekspresi relatif dari gen *Bmr12* pada aksesori-aksesori sorgum yang tergabung pada kelompok lignin tinggi (KS, 4183A, SMM) dan aksesori-aksesori sorgum kelompok lignin rendah (Pahat, JP, BE), serta peruntukan sekuens dari gen tersebut.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Materi genetik penelitian ini berasal dari enam aksesori sorgum (4183A, Sorgum Malai Mekar (SMM), Konawe Selatan (KS), Buleleng Empok (BE), JP dan Pahat) koleksi dari Pusat Riset Rekayasa Genetika – BRIN. Untuk analisis ekspresi relatif dari gen *Bmr12* digunakan dua bioreplikasi dan tiga replikasi teknis untuk masing-masing aksesori.

**Tabel 1.** Nama aksesori, tipe populasi dan asal dari enam aksesori sorgum Indonesia yang digunakan sebagai materi genetik (*Accession names, population types and the origin of six Indonesian sorghums used as genetic material*)

Aksesori sorgum ( <i>Accession of the sorghum</i> )	Tipe populasi ( <i>Population type</i> )	Asal ( <i>Origin</i> )
4183A	Varietas introduksi ( <i>Varieties introduction</i> )	ICRISAT
SMM	Ras local ( <i>Local breed</i> )	Kab. Rote Ndao
KS	Tidak diketahui ( <i>Unknown</i> )	Tidak diketahui ( <i>Unknown</i> )
BE	Aksesori ( <i>Accession</i> )	Kab. Lombok Timur
JP	Tidak diketahui ( <i>Unknown</i> )	Tidak diketahui ( <i>Unknown</i> )
Pahat	Varietas ( <i>Varietas</i> )	Batan

Ket. (Notes): SMM= Sorghum Malai Mekar, KS= Konawe Selatan, BE= Buleleng Empok.

RNA total diisolasi dari 100 mg daun malai pada fase keluarnya malai (*heading stage*) menggunakan Trizol. Pengukuran konsentrasi RNA dilakukan dengan menggunakan NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer. Selanjutnya, RNA total diberi perlakuan DNase I.

Sintesis untai pertama cDNA dilakukan dengan menggunakan SensiFast cDNA Synthesis Kit yang terdiri dari 4 µL 5×TransAmp Buffer, 1 µL reverse transcriptase, 1 µg RNA total dan *nuclease free water* dengan volume total 20 µL. Premix tersebut diamplifikasikan dengan program penempelan primer (25°C, 10 menit), transkripsi balik (42°C, 15 menit), inkubasi (48°C, 15 menit), inaktivasi (85°C, 5 menit) dan pendinginan pada suhu 4°C. Hasil sintesis untai pertama cDNA disimpan di -80°C.

Analisis ekspresi gen *Bmr12* dilakukan menggunakan SensiFast™ SYBR No-Rox Kit dan alat CFX Connect Real-Time PCR. Primer pengamplifikasi gen *Bmr12* adalah primer *forward* 5'-

GCT-CAC-CCC-TAA-CGA-GGA-CGG-3' dan primer *reverse* 5'-GCA-CCG-CGT-CCT-TCA-GGT-AGT-A-3'. Gen  $\alpha$ -tubulin sorgum digunakan sebagai kontrol internal atau gen referensi. Amplifikasi gen tubulin ini dilakukan dengan primer *forward* 5'-AGC-TCT-CTG-TGC-CTG-AAA-TCA-CCA-3' dan primer *reverse* 5'-TTG-AAT-CCA-GTG-GGG-CAC-CAG-TCC-3'. Reaksi amplifikasi terdiri dari 1 kali 2xSensiFAST SYBR No- Rox Mix, 400nM primer *forward* dan 400 nM primer *reverse*, 1  $\mu$ L cDNA dan *nuclease free water* dengan volume total 5  $\mu$ L. Pemrograman amplifikasi tersebut diawali dengan denaturasi awal (95°C, 2 menit), diikuti 40 siklus dari denaturasi (95°C, 5 detik), penempelan primer (60 sampai 65°C, 10 detik) dan ekstensi (72°C, 15 detik). Penghitungan nilai ekspresi relatif dilakukan berdasarkan formulasi  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  yang berasal dari nilai  $C_t$  masing-masing sampel gen atau faktor transkripsi yang dinormalisasi dengan nilai  $C_t$  gen referensi (Livak dan Schmittgen 2001).

Sekuen pengkode gen *Bmr12* diisolasi dengan menggunakan pasangan primer seperti pada Tabel 2. Kondisi PCR yang digunakan adalah: denaturasi awal 95°C selama 3 menit, diikuti oleh 40 siklus dari denaturasi 95°C selama 30 detik, penempelan 62°C selama 30 detik dan ekstensi 72°C selama 1 menit dan diakhiri dengan ekstensi final 72°C selama 7 menit. Amplifikasi untuk isolasi gen dilakukan mengikuti protokol DreamTaq DNA Polymerase. Produk PCR yang dihasilkan diperiksa pada gel agarose 0,8% untuk menilai kualitas produk dan memperkirakan konsentrasi.

Perunutan sekuen ampikon PCR dilakukan dengan metode Sanger DNA Sequencing menggunakan ABI PRISM 3730xl Genetic Analyzer dari Applied Biosystem dengan 3 kali ulangan. Hasil perunutan mesin Genetic Analyzer dibaca dan diterjemahkan dengan software KB<sup>TM</sup> Basecaller. Hasil akhir runutan gen *Bmr12* dari beberapa galur sorgum tersebut saling dibandingkan dengan referensi gen *Bmr12*, yaitu XM\_002445038 (GenBank, NCBI). Analisis penyejajaran sekuen nukleotida dan protein dilaksanakan dengan menggunakan program Geneious Prime (versi 2019.2.3).

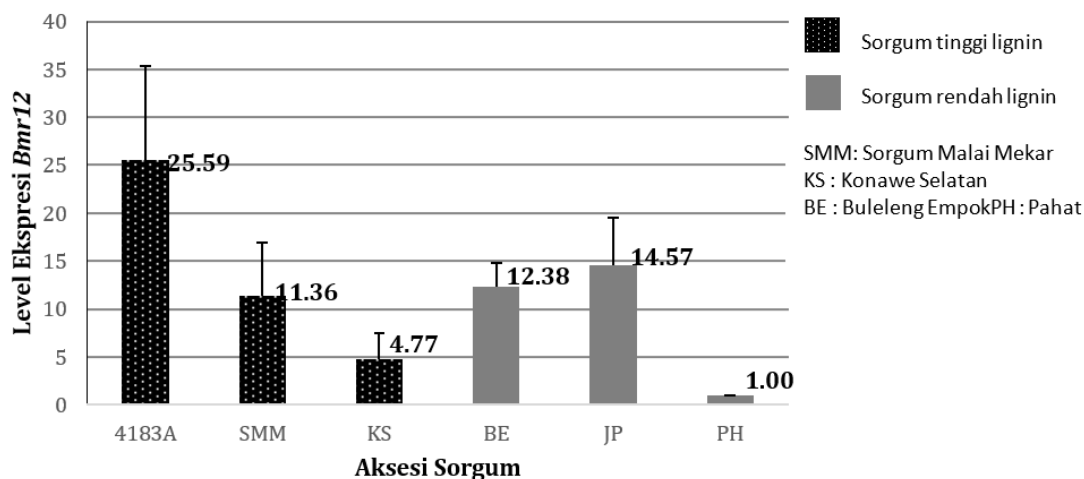
**Tabel 2.** Urutan primer isolasi dan sekuensing gen *Bmr12* (*Primers for Bmr12 gene isolations and suencing*)

Primer (Primary)	Urutan Basa Nitrogen (Nitrogenous base sequence)	Pasangan (Couple)
Forward 1	5'-GCA-GCA-CAC-GCC-AAC-ACT-3'	Pasangan 1 ( <i>Couple 1</i> )
Reverse 1	5'-CAC-TCG-ACG-ACG-ATC-ACC-T-3'	
Forward 2	5'-GCT-TCG-ACG-AGT-CCG-TCT-3'	Pasangan 2 ( <i>Couple 2</i> )
Reverse 2	5'-TAC-TGG-TAC-ATG-GCG-CAG-AG-3'	

## HASIL

### Analisis Ekspresi Relatif Gen *Bmr12* pada Enam Aksesori Sorgum

Analisis pola ekspresi gen *Bmr12* diambil dari materi genetik aksesori sorgum KS, 4183A, SMM, Buleleng Empok, JP dan Pahat. Aksesori sorgum KS, 4183A, dan SMM mewakili sorgum berlignin tinggi, sedangkan Buleleng Empok, JP, dan Pahat mewakili sorgum berlignin rendah. Meskipun demikian, ternyata pola ekspresi relatif gen *Bmr12* dari keenam aksesori tersebut berbeda dengan kisaran tinggi rendahnya kandungan lignin (Tabel 1). Ekspresi relatif gen yang dimaksud adalah jumlah ekspresi gen *Bmr12* pada masing-masing aksesori yang dibandingkan dengan jumlah ekspresi gen referensi, yang dalam hal ini digunakan gen  $\alpha$ -Tubulin yang berasal dari *house keeping gene*. Aksesori KS adalah aksesori dengan kandungan total lignin tertinggi, namun dari kelompok sorgum berlignin tinggi, level ekspresi relatif *Bmr12* dari KS adalah yang terendah (4,77 kali lipat). Sedangkan 4183A sebagai rangking kedua, mempunyai level ekspresi yang tertinggi (25,59 kali lipat). Level ekspresi *Bmr12* pada SMM (11,36), yang merupakan aksesori berlignin tinggi, hampir sama dengan level ekspresi pada aksesori Buleleng Empok (BE, 12,38) dan JP (14, 57) yang berasal dari kelompok sorgum berlignin rendah. Level ekspresi relatif gen *Bmr12* terkecil dimiliki oleh aksesori Pahat, yang juga mempunyai kandungan total lignin terendah di antara enam aksesori lainnya.



**Gambar 1.** Hasil analisis qRT-PCR level ekspresi gen *Bmr12* pada 6 aksesori sorgum (4183A, SMM, KS, BE, JP dan Pahat) yang dikuantifikasi dengan ekspresi dari gen referensi  $\alpha$ -Tubulin. Angka menunjukkan nilai rata-rata dari dua ulangan biologi dan tiga ulangan teknik. (*qRT-PCR analysis of Bmr12 genes expression level from six sorghum accessions (4183A, SMM, KS, BE, JP and Pahat) quantified by  $\alpha$ -Tubulin expression level as gene reference. Values show average of two biological replications and three technical replications*).

#### Analisis Penyejajaran Gen *Bmr12* pada Empat Aksesori Sorgum

Hasil dari isolasi sekuen pengkode (*coding sequence, CDS*) gen *Bmr12* dari aksesori 4183A, KS, Buleleng Empok dan Pahat dirunut sekuen nukleotidanya untuk selanjutnya dilakukan penyejajaran sekuen pengkode masing-masing aksesori. Gen *Bmr12* dari aksesori 4183A, Buleleng Empok dan Pahat tidak menunjukkan adanya variasi genetik saat disejajarkan dengan gen referensi (XM\_002445038, NCBI) (Gambar 2). Sedangkan, penyejajaran dengan sekuen dari aksesori KS memperlihatkan adanya variasi genetik. Variasi genetik ini dapat terjadi karena adanya substitusi basa nukleotida. Pada aksesori KS ini terjadi lima substitusi yang terdiri dari dua transisi dan tiga transversi. Substitusi transisi terjadi pada posisi 266 (A266G) dan 676 (G676A), keduanya berasal dari kelompok purin. Substitusi transversi pada aksesori KS ini terjadi pada posisi 420 (G420C), 675 (C675G), 905 (C905G).

Consensus	<b>CTCCTCGCCTCCTACGACGTCGTGAAGTGCCAGATGGAGGACAAGGACGGCAAGTACGAG</b>	300
4183A	CTCCTCGCCTCCTACGACGTCGTGAAGTGCCAGATGGAGGACAAGGACGGCAAGTACGAG	300
BE	CTCCTCGCCTCCTACGACGTCGTGAAGTGCCAGATGGAGGACAAGGACGGCAAGTACGAG	300
KS	CTCCTCGCCTCCTACGACGTCGTGAAG <b>G</b> TGCCAGATGGAGGACAAGGACGGCAAGTACGAG	300
PH	CTCCTCGCCTCCTACGACGTCGTGAAGTGCCAGATGGAGGACAAGGACGGCAAGTACGAG	300
XM_002445038	CTCCTCGCCTCCTACGACGTCGTGAAGTGCCAGATGGAGGACAAGGACGGCAAGTACGAG	300
Consensus	<b>ATGGCCGCCCTCGCGCTCATGAACCAGGACAAGGTCCTCATGGAGAGCTGGTACTACCTG</b>	420
4183A	ATGGCCGCCCTCGCGCTCATGAACCAGGACAAGGTCCTCATGGAGAGCTGGTACTACCTG	420
BE	ATGGCCGCCCTCGCGCTCATGAACCAGGACAAGGTCCTCATGGAGAGCTGGTACTACCTG	420
KS	ATGGCCGCCCTCGCGCTCATGAACCAGGACAAGGTCCTCATGGAGAGCTGGTACTACCT <b>G</b>	420
PH	ATGGCCGCCCTCGCGCTCATGAACCAGGACAAGGTCCTCATGGAGAGCTGGTACTACCTG	420
XM_002445038	ATGGCCGCCCTCGCGCTCATGAACCAGGACAAGGTCCTCATGGAGAGCTGGTACTACCTG	420
Consensus	<b>TCCCACATCAGGGGCGTCAACTTCGACCTCCCCACGTGATCTCCGAGGCGCCGCCGTTT</b>	720
4183A	TCCCACATCAGGGGCGTCAACTTCGACCTCCCCACGTGATCTCCGAGGCGCCGCCGTTT	720
BE	TCCCACATCAGGGGCGTCAACTTCGACCTCCCCACGTGATCTCCGAGGCGCCGCCGTTT	720
KS	TCCCACATCAGGGG <b>GAT</b> CAACTTCGACCT <b>CCC</b> GCACGTGATCTCCGAGGCGCCGCCGTTT	720
PH	TCCCACATCAGGGGCGTCAACTTCGACCTCCCCACGTGATCTCCGAGGCGCCGCCGTTT	720
XM_002445038	TCCCACATCAGGGGCGTCAACTTCGACCTCCCCACGTGATCTCCGAGGCGCCGCCGTTT	720
Consensus	<b>GTGACCACCGACGCCGTCCCCAAGGCGCAGGGCGTGTTCATGTGACATGATCATGCTC</b>	960
4183A	GTGACCACCGACGCCGTCCCCAAGGCGCAGGGCGTGTTCATGTGACATGATCATGCTC	960
BE	GTGACCACCGACGCCGTCCCCAAGGCGCAGGGCGTGTTCATGTGACATGATCATGCTC	960
KS	GTGA <b>G</b> CACCGACGCCGTCCCCAAGGCGCAGGGCGTGTTCATGTGACATGATCATGCTC	960
PH	GTGACCACCGACGCCGTCCCCAAGGCGCAGGGCGTGTTCATGTGACATGATCATGCTC	960
XM_002445038	GTGACCACCGACGCCGTCCCCAAGGCGCAGGGCGTGTTCATGTGACATGATCATGCTC	960

4183= akses 4183A, BE= akses Buleleng Empok, KS= akses KS, PH= akses Pahat, XM\_002445038= gen referensi *Bmr12* (XM\_002445038, NCBI)

**Gambar 2.** Hasil penyandingan sekuen pengkode (CDS) gen *Bmr12* tanaman sorgum yang berasal dari akses 4183A, BE, KS dan Pahat dengan program Geneious Prime menunjukkan lima (5) titik perbedaan pada galur KS. (*Alignments result of Bmr12 sequences from 4183A, BE, KS and Pahat sorghum accessions. Black highlights on accessions' sequence show changes of nucleotides.*)

Saat sekuen pengkode *Bmr12* tersebut ditranslasikan dan sekuen asam aminonya disejajarkan, dapat dilihat bahwa hanya terdapat tiga variasi asam amino pada sekuen asam amino akses KS (Gambar 3). Perubahan atau substitusi asam amino yang terjadi adalah Lisin (K) menjadi Arginin (R) atau K89R, Valin (V) menjadi Isoleusin (I) atau V226I, dan Treonin (T) menjadi Serin (S) atau T302S. Selain itu, terdapat dua asam amino yang tidak mengalami perubahan walaupun mempunyai kodon yang berbeda, yaitu Leusin pada posisi 140 (L-140) yang mempunyai kodon CTG dan CTC (kodon dari KS), dan Glisin pada posisi 225 (G-225) yang mempunyai kodon GGC dan GGG (kodon dari KS).

Pada protein *Bmr12* terdapat empat *binding site*(s) dan satu *active site*. Dari penyandingan asam amino penyusun protein *Bmr12* dari keempat akses tidak terlihat adanya variasi asam amino pada situs *binding site* dan *active site*. Sehingga dapat dipastikan bahwa pada keempat akses tersebut protein *Bmr12* bersifat aktif.



regulasi *Bmr12* pada aksesori SMM dan KS sehingga level ekspresinya lebih sedikit dari pada JP dan Buleleng Empok.

Tingkat ekspresi gen terkait lignin pada tanaman kedelai secara signifikan dipengaruhi oleh kondisi naungan, salinitas dan kekeringan dengan interaksi antara lingkungan cahaya dan variasi (Liu *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2021). Pada saat eksperimen berlangsung tanaman eksperimen ditanam pada rumah kaca yang beratap dan berdinding setengah terbuka, alih-alih ditanam di rumah kaca tanpa atap dan tanpa dinding. Sehingga dimungkinkan tanaman eksperimen mengalami kekurangan cahaya, atau mendapatkan tekanan naungan. Hal tersebut kemungkinan mempunyai pengaruh pada penurunan level ekspresi gen *Bmr12* pada aksesori-aksesori yang termasuk kelompok sorgum berlignin tinggi (SMM dan KS).

Analisis penyejajaran gen *Bmr12* dilakukan pada 2 aksesori sorgum yang berasal dari kelompok lignin tinggi (4183A dan KS) serta 2 aksesori sorgum yang berasal dari kelompok lignin rendah (Buleleng Empok dan Pahat). Dari masing-masing kelompok lignin, diambil aksesori yang merupakan varietas terdaftar (4183A dan Pahat) dan aksesori yang tidak diketahui atau berupa aksesori lokal (KS dan Buleleng Empok). Hasil penyejajaran urutan sekuen pengkode *Bmr12* memperlihatkan adanya variasi genetik pada sekuen yang berasal dari aksesori KS saat dibandingkan dengan gen referensinya (XM\_002445038). Variasi genetik ini dapat terjadi karena adanya substitusi basa nukleotida. Pada aksesori KS ini terjadi lima substitusi yang terdiri dari dua transisi dan tiga transversi. Rasio substitusi transversi terhadap transisi adalah 1:0,67. Hal ini menunjukkan bahwa ada bias di mana substitusi pada sekuen ini lebih cenderung ke arah transisi dari pada transversi. Rasio substitusi ini cukup unik karena biasanya rasio substitusi transisi lebih banyak dari pada transversi. Hal ini dikarenakan nukleotida lebih mudah untuk digantikan basa lain yang strukturnya mirip, yakni yang berasal dari kelompok yang sama (Song *et al.*, 2019). Substitusi transisi di aksesori KS hanya terjadi pada kelompok purin, dari basa nitrogen Adenin (A) ke basa nitrogen Glisin (G) atau sebaliknya; dan tidak ada transisi dari kelompok basa pirimidin. Transisi bisa terjadi karena deaminasi Tiga substitusi transversi pada sekuen pengkode *Bmr12* dari aksesori KS terjadi baik dari kelompok purin, yaitu basa Guanin (G) menjadi basa Sitosin (C) dari kelompok pirimidin, atau sebaliknya. Namun, substitusi transversi ini hanya terjadi pada basa nitrogen dengan 3 ikatan hidrogen (G dan C), tidak terjadi pada basa nitrogen dengan dua ikatan hidrogen (A dan T).

Penyejajaran hasil translasi dari sekuen pengkode gen *Bmr12*, memperlihatkan adanya substitusi tiga asam amino pada sekuen yang berasal dari aksesori KS, yaitu K89R, V226I, T302S. Setelah ditelusuri kembali menggunakan Blast-P, ditemukan bahwa sekuen peptida COMT dari KS sama dengan sekuen peptida COMT dari genotip IS11861 (JX202550). Genotip ini mempunyai substitusi tiga asam amino yang sama, yaitu K89R, V226I, T302S (Gorthy *et al.*, 2013). Genotip IS11861 dikoleksi dari Zambia dan oleh ICRISAT (*International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics*) diidentifikasi sebagai galur baru sorgum *brown midrib* yang reaksi alelik dan kontrol genetiknya tidak diketahui pemanfaatannya (Vangala *et al.*, 2020); sebagaimana tidak adanya informasi mengenai asal usul aksesori KS.

Lima titik substitusi yang terjadi pada sekuen *Bmr12* aksesori KS diperkirakan tidak mempengaruhi level ekspresi gen *Bmr12*, yang berfungsi sebagai gen COMT. Penelusuran posisi sisi pengikatan (*binding site*) dan sisi aktif (*active site*) dari sekuen peptida COMT pada aksesori KS, tidak memperlihatkan adanya substitusi asam amino pada sisi-sisi pengikatan dan sisi aktif protein COMT. Adanya substitusi asam amino treonin ke serin (T302S) yang terletak pada domain O-metiltransferase, tidak membuat fenotip COMT berubah, karena treonin dan serin termasuk asam amino polar yang kecil dan substitusi tersebut termasuk substitusi terkonservasi yang banyak ditemukan (Gorthy *et al.*, 2013). Sehingga dapat diartikan bahwa protein COMT aksesori KS ini tetap dapat digunakan pada biosintesis lignin tanaman aksesori tersebut.

## KESIMPULAN

Pada enam aksesori sorgum (KS, 4183A, SMM, Buleleng Empok, JP dan Pahat) level ekspresi gen *Bmr12* (*SbCOMT*) tidak selaras dengan pengelompokan kandungan total lignin. Hal ini diperkirakan karena adanya faktor lingkungan, seperti tekanan naungan yang mempengaruhi level



ekspresi gen tersebut. Gen *Bmr12* (*SbCOMT*) mempunyai variasi genetik yang berasal dari aksesori KS. Namun variasi genetik tersebut diperkirakan tidak mengubah fungsi gen *Bmr12* (*SbCOMT*) pada proses sintesis lignin. Gen *Bmr12* (*SbCOMT*) pada aksesori KS sama dengan gen *SbCOMT* yang berasal dari sorgum genotipe IS11861.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Proyek SATREPS “The Project for Producing Biomass Energy and Material Through Revegetation of Alang-alang (*Imperata cylindrica*) Fields”.

## KONTRIBUSI PENULIS

VEW: Merancang alur penelitian, mengumpulkan data penelitian, membuat konsep naskah, memperbaiki naskah akhir; SWA: merancang alur penelitian, membimbing proses penelitian, memperbaiki naskah akhir; TM: membimbing proses penelitian, memperbaiki naskah akhir; TU: PI dari proyek kegiatan penelitian, membimbing proses penelitian, memperbaiki naskah akhir; SN: PI dari sub-kegiatan penelitian, merancang alur penelitian, membimbing proses penelitian, memperbaiki naskah akhir.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bajpai, P. 2017. *Carbon fibre from lignin*. Springer Nature. Singapore. pp. 77
- Bout, S. and Vermerris, W., 2003. A candidate-gene approach to clone the sorghum Brown midrib gene encoding caffeic acid O-methyltransferase. *Molecular genetics and genomics*, 269, pp.205-214. doi: 10.1007/s00438-003-0824-4
- Eudes, A., Dutta, T., Deng, K., Jacquet, N., Sinha, A., Benites, V. T., Baidoo, E.E.K., Richel, A., Sattler, S.E., Northern, T.R., Singh, S., Simmons, B.A. & Loque, D. (2017). *SbCOMT* (*Bmr12*) is involved in the biosynthesis of tricetin-lignin in sorghum. *PLoS one*, 12(6). doi:
- Green, A.R., Lewis, K.M., Barr, J.T., Jones, J.P., Lu, F., Ralph, J., Vermerris, W., Sattler, S.E. and Kang, C., 2014. Determination of the structure and catalytic mechanism of Sorghum bicolor caffeic acid O-methyltransferase and the structural impact of three brown midrib12 mutations. *Plant physiology*, 165(4), pp.1440-1456. doi: 10.1371/journal.pone.0178160
- Gorthy, S., Mayandi, K., Faldu, D. and Dalal, M., 2013. Molecular characterization of allelic variation in spontaneous brown midrib mutants of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Molecular breeding*, 31, pp.795-803. doi: 10.1007/s11032-012-9834-4
- Hattori, T. and Morita, S., 2010. Energy crops for sustainable bioethanol production; which, where and how? *Plant Production Science*, 13(3), pp.221-234. doi: 10.1626/pps.13.221
- Jung, J.H., Fouad, W.M., Vermerris, W., Gallo, M. and Altpeter, F., 2012. RNAi suppression of lignin biosynthesis in sugarcane reduces recalcitrance for biofuel production from lignocellulosic biomass. *Plant biotechnology journal*, 10(9), pp.1067-1076. doi: 10.1111/j.1467-7652.2012.00734.x
- Lang, A., Bradley, D., Gauthier, G. 2019. Global Bioenergy Statistics, World Bioenergy Association. <https://www.greengrowthknowledge.org/research/global-bioenergy-statistics-2019>
- Lee, J.H., Won, H.J., Hoang Nguyen Tran, P., Lee, S.M., Kim, H.Y. and Jung, J.H., 2021. Improving lignocellulosic biofuel production by CRISPR/Cas9-mediated lignin modification in barley. *GCB Bioenergy*, 13(4), pp.742-752. doi: 10.1111/gcbb.12808
- Liang, S., Xu, S., Qu, D., Yang, L., Wang, J., Liu, H., Xin, W., Zou, D. and Zheng, H., 2022. Identification and functional analysis of the caffeic acid O-methyltransferase (COMT) gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), p.8491. doi: 10.3390/ijms23158491
- Liu, W.G., Ren, M.L., Liu, T., Du Y.L., Zhao, T., ZH, Liu, X.M., Liu, J., Hussain, S., Yang, W.Y. 2018. Effect of shade stress on lignin biosynthesis in soybean stems. *Journal of integrative agriculture*, 17(7), pp.1594-1604. doi: 10.1016/S2095-3119(17)61807-0

- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25(4):402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Mullet, J., Morishige, D., McCormick, R., Truong, S., Hilley, J., McKinley, B., Anderson, R., Olson, S.N., and W. Rooney. 2014. Energy Sorghum—a genetic model for the design of C4 grass bioenergy crops. *Journal of Experimental Botany* 65(13), pp. 3479–3489. doi: 10.1093/jxb/eru229
- Olson, S.N., Ritter, K., Rooney, W., Kemanian, A., McCarl, B.A., Zhang, Y., Hall, S., Packer, D., and J. Mullet. 2012. High biomass yield energy sorghum: developing a genetic model for C4 grass bioenergy crops. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 6(6), pp. 640–655. doi: 10.1002/bbb.1357
- Saluja, M., Zhu, F., Yu, H., Walia, H. and Sattler, S.E., 2021. Loss of COMT activity reduces lateral root formation and alters the response to water limitation in sorghum brown midrib (bmr) 12 mutant. *New Phytologist*, 229(5), pp.2780-2794. doi: 10.1111/nph.17051
- Song, Y., Chen, Y., Lv, J., Xu, J., Zhu, S. and Li, M., 2019. Comparative chloroplast genomes of Sorghum species: sequence divergence and phylogenetic relationships. *BioMed Research International*, 2019. doi: 10.1155/2019/5046958
- Tetreault, H. M., Gries, T., Palmer, N. A., Funnell-Harris, D. L., Sato, S., Ge, Z., Sarath, G., & Sattler, S. E. (2020). Overexpression of ferulate 5-hydroxylase increases syringyl units in sorghum bicolor. *Plant Molecular Biology*, 1-17. doi: 10.1007/s11103-020-00991-3
- Umezawa T. 2018. Lignin modification in planta for valorization. *Phytochemistry review* 17(6), pp. 1305–1327. doi:c10.1007/s11101-017-9545-x
- Vangala, S., Jaganathan, J.K., Manohar Rao, D. and Are, A.K., 2020. Studies on the inheritance of brown midrib trait and allelic relationships among BMR mutants in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Indian Journal of Pure & Applied Bioscience*, 8, pp.221-227. doi: 10.18782/2582-2845.7563
- Vanholme R, De Meester B, Ralph J, Boerjan W. 2019. Lignin biosynthesis and its integration into metabolism. *Current opinion in biotechnology*. 56: 230-239. doi: 10.1016/j.copbio.2019.02.018
- [WBA]. World Bioenergy Association. 2022. Global Bioenergy Statistic 2022. <https://www.worldbioenergy.org/uploads/221223%20WBA%20GBS%202022.pdf>
- Xu, Z., Zhang, D., Hu, J., Zhou, X., Ye, X., Reichel, K.L., and W. Shi. 2009. Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom. *BMC bioinformatics*. 10(11), pp 1–15. doi: 10.1186/1471-2105-10-S11-S3
- Zhang, X., Chen, B., Wang, L., Ali, S., Guo, Y., Liu, J., Wang, J., Xie, L. and Zhang, Q., 2021. Genome-wide identification and characterization of caffeic acid o-methyltransferase gene family in soybean. *Plants*, 10(12), p.2816. doi: 10.3390/plants10122816