

Isolasi dan Analisis Homologi Gen *Alanine Aminotransferase* pada Tanaman Jelai, Jawawut, Mentimun, dan Tomat (Isolation and Homology Analysis of *Alanine Aminotransferase* Gene of Barley, Foxtail Millet, Cucumber, and Tomato)

Atmitri Sisharmini^{1*}, Aniversari Apriana¹, Tri Joko Santoso¹, Bambang Sapta Purwoko²,
Nurul Khumaida², dan Kurniawan Rudi Trijatmiko¹

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia.
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: atmitrisisharmini@pertanian.go.id, mitri.bm38@gmail.com

²Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti, Kampus IPB Dramaga,
Bogor 16680 Indonesia

Diajukan: 18 Februari 2020; Direvisi: 14 September 2020; Diterima: 22 September 2020

ABSTRACT

Overexpression of *alanine aminotransferase* (*AlaAT*) gene can improve nitrogen use efficiency (NUE) in plants. The previous isolated *AlaAT* genes cannot be freely applied to generate NUE plants due to IPR restriction. Therefore, isolation of the gene from targeted monocot and dicot plants is necessary. The objectives of this study were to isolate *AlaAT* genes from barley, foxtail millet, cucumber, and tomato and analyze their homology to other isolated *AlaAT* genes in sequence databases (gene bank). Total RNA was isolated from roots of barley, foxtail millet, cucumber, and tomato, and then converted into cDNA using reverse transcription method. The cDNA was then cloned into *pGEM®-T Easy* plasmid and the verified clones were sequenced. The amino acid sequences were analyzed for their homologies using Clustal Omega software and phylogenetic tree was constructed. The results showed that the amino acids of *AlaAT* gene from barley was different from *AlaAT* genes of tomato and cucumber with homology level less than 80%. Phylogenetic tree predicted that *AlaAT* genes clustered into three groups with *AlaAT* genes of foxtail millet and barley clustered in one group together with other monocots in group I. *AlaAT* genes derived from dicots clustered into two groups in which *AlaAT* gene of tomato clustered in group II, while that of cucumber was in group III. The identity differences of *AlaAT* gene of tomato and that of cucumber as well as the estimates of the same enzymatic functions can open up enormous opportunities in genetic engineering research for the development of NUE rice.

Keywords: *Alanine aminotransferase* gene, amino acid sequence prediction, dendrogram, homology.

ABSTRAK

Overeksresi gen *alanine aminotransferase* (*AlaAT*) dapat meningkatkan efisiensi penggunaan nitrogen (EPN) pada tanaman. Penggunaan gen *AlaAT* yang telah diisolasi sebelumnya tidak dapat dilakukan secara bebas karena dilindungi HAKI. Oleh karena itu, isolasi gen serupa dari tanaman monokotil dan dikotil target sangat diperlukan. Tujuan penelitian ini ialah mengisolasi gen *AlaAT* dari tanaman jelai (*barley*), jawawut, mentimun, dan tomat serta menganalisis homologi gen *AlaAT* tersebut dengan sekuens gen yang ada pada pangkalan data sekuens (bank gen). RNA diisolasi dari akar tanaman jelai, jawawut, mentimun, dan tomat, lalu diubah menjadi cDNA menggunakan metode transkripsi balik (*reverse transcription*). cDNA kemudian diklon ke dalam plasmid *pGEM®-T Easy* dan klon yang terverifikasi dilanjutkan dengan proses *sequencing*. Sekuens asam amino gen *AlaAT* yang diisolasi dari keempat spesies tanaman dianalisis homologinya dengan perangkat lunak *Clustal Omega*, kemudian pohon filogeni dikonstruksi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa identitas sekuens asam amino gen *AlaAT* jelai berbeda dengan gen *AlaAT* yang diisolasi dari tomat dan mentimun dengan homologi kurang dari 80%. Hasil analisis filogenetik mengklasifikasikan gen *AlaAT* ke dalam tiga grup. Gen *AlaAT* jelai dan jawawut mengelompok dengan gen *AlaAT* tanaman monokotil lainnya pada grup I. Gen *AlaAT* yang diisolasi dari tanaman dikotil mengelompok menjadi dua dengan gen *AlaAT* tomat pada grup II dan gen *AlaAT* mentimun pada grup III. Perbedaan identitas gen *AlaAT* pada tomat dan mentimun dan adanya pendugaan fungsi enzimatis yang sama membuka peluang yang sangat besar bagi penelitian rekayasa genetika untuk perakitan padi EPN.

Kata kunci: Gen *alanine aminotransferase*, prediksi sekuens asam amino, dendrogram, homologi.

PENDAHULUAN

Enzim *alanine aminotransferase* (AlaAT) merupakan *pyridoxal phosphate-dependent* yang mengatalisis reaksi bolak-balik antara piruvat dan glutamat menjadi alanina dan oksoglutarat yang menghubungkan metabolisme karbon primer dengan sintesis berbagai asam amino (McAllister dan Good 2015). Enzim AlaAT terlibat dalam sintesis alanina oleh transaminase piruvat sebagai prekursor asam keto dalam degradasi alanina (Kikuchi et al. 1999).

Gen *AlaAT* termasuk dalam kelompok multigen fosfat piridoksal yang terdapat pada hewan, tumbuhan, alga, ragi, dan bakteri yang berlokasi pada berbagai organ dan kompartemen sel, yaitu sitosol, mitokondria, dan peroksisom (Vedavathi et al. 2004). Aktivitas enzim ini ditemukan pada semua bagian tanaman, tidak hanya pada daun dan akar, tetapi juga pada jaringan lain, seperti endosperma dan bunga (Igarashi et al. 2003). Pola ekspresi AlaAT menunjukkan bahwa enzim ini terlibat dalam reaksi biokimia penting pada seluruh siklus hidup tanaman (Miyashita et al. 2007; Rocha et al. 2010; McAllister et al. 2013).

Gen *AlaAT* terbukti berfungsi dengan baik untuk efisiensi penggunaan nitrogen (EPN) pada tanaman *canola* dan padi (Good et al. 2007; Shrawat et al. 2008). Gen ini menghubungkan reaksi glikolisis dan siklus asam trikarboksilik pada tanaman *Lotus japonicus* (Rocha et al. 2010). Studi gen *AlaAT* dan kerabatnya telah banyak dilakukan. Son dan Sugiyama (1992) telah melakukan pengodean pertama cDNA dari gen *AlaAT* tanaman *millet* (*Panicum miliaceum*) dan penentuan struktur primer enzim tersebut dari sekuens nukleotidanya. Isolasi dan analisis ekspresi gen *AlaAT* tanaman jelai (*Hordeum vulgare*) juga telah dilaporkan (Muench dan Good 1994). Gen *AlaAT* tanaman *Arabidopsis* telah diklon dan dipelajari fungsinya dalam fotorespirasi dan ekspresi gen tersebut yang diinduksi pada kondisi hipoksia (Igarashi et al. 2003; Liepman dan Olsen 2003; Miyashita et al. 2007). Ekspresi gen *AlaAT* pada tanaman lain juga diinduksi oleh kondisi hipoksia (Good dan Crosby 1989; Muench dan Good 1994; Peng et al. 2001; Ricoult et al. 2006) dan oleh cahaya dan N (Son dan Sugiyama 1992; Muench 1998; Rocha et al. 2010; Kendziorek et al. 2012; Xu et al. 2017). Gen *AlaAT* juga terlibat dalam metabolisme N selama pematangan benih padi (Kikuchi et al. 1999).

Penelitian overekspresi gen *AlaAT* jelai pada beberapa tanaman telah dilaporkan, di antaranya *canola* (Good et al. 2007), padi (Shrawat et al. 2008), *Arabidopsis* (McAllister dan Good 2015), dan tebu (Snyman et al. 2015). Overekspresi gen *AlaAT* jelai

(*HvAlaAT*) pada tanaman *canola* yang dikendalikan oleh promotor spesifik jaringan (*btg26*) (Good et al. 2007; Good dan Beatty 2011) dan pada tanaman padi dengan promotor *OsAnt1* (homolog dari *btg26*) menyebabkan hasil dan biomassa meningkat, jumlah anakan menjadi lebih banyak, tanaman lebih lebat, dan terjadi peningkatan total N dan asam amino, seperti glisina (Gln), glutamin (Glu), dan asparagina (Asn) (Shrawat et al. 2008). Shrawat et al. (2008) telah berhasil memperbaiki EPN pada tanaman padi dengan memanipulasi bagian hilir jalur metabolismenya. Tanaman yang dapat mengambil dan memproses N untuk asimilasi secara lebih efisien akan mengefisienkan penggunaan pupuk N yang berimplikasi pada pengurangan biaya produksi dan ramah lingkungan (Hashimoto et al. 2007). Hasil penelitian ini sangat bermanfaat bagi pengembangan tanaman pangan dengan merekayasa peningkatan EPN.

Hak atas kekayaan intelektual (HAKI) terkait dengan penemuan gen *AlaAT* pada jelai dan tanaman monokotil telah dilisensi oleh *Arcadia Bioscience Inc.* (Good et al. 2012). Penggunaan gen tersebut pada perakitan tanaman transgenik yang efisien dalam penggunaan N akan mengalami kendala karena menggunakan hak paten pihak lain. Berdasarkan hal tersebut, perlu dilakukan isolasi gen *AlaAT* dari tanaman monokotil lain dan tanaman dikotil yang belum pernah dilakukan. Informasi tentang kesamaan sekuens gen dan asam amino gen *AlaAT* tersebut berguna untuk mendapatkan identitas gen yang diisolasi. Pemilihan tanaman monokotil dan dikotil sebagai sumber gen *AlaAT* didasarkan pada tersedianya data sekuens gen di pangkalan data sekuens (bank gen) *National Center for Biotechnology Information* (NCBI 1988). Tanaman jawawut (*Setaria italica*), mentimun (*Cucumis sativus*), dan tomat (*Solanum lycopersicum*) dipilih sebagai sumber gen *AlaAT* karena belum pernah diteliti fungsinya terkait dengan sifat EPN pada tanaman. Sekuens gen *AlaAT* tersebut dapat diperoleh dengan menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool Protein* (BLASTp) dengan sekuens asam aminonya pada jelai sebagai acuan (Muench dan Good 1994).

Tujuan penelitian ini ialah mengisolasi gen *AlaAT* dari tanaman jelai (*barley*), jawawut, mentimun, dan tomat, serta menganalisis homologi gen *AlaAT* tersebut dengan sekuens gen yang ada pada pangkalan data sekuens (bank gen). Informasi ini berguna untuk menentukan identitas gen *AlaAT* terutama pada tanaman dikotil, yaitu tomat dan mentimun, sehingga dapat digunakan sebagai alternatif sumber gen target pada perakitan tanaman padi yang

efisien dalam penggunaan N tanpa terhalang HAKI dari pihak lain.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen), Bogor, Jawa Barat dari bulan November 2015 sampai dengan Maret 2016.

Materi Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan ialah akar tanaman jelai varietas Tae-kang bori koleksi bank gen milik *Laboratory of Crop Molecular Breeding, Department of Plant Science, College of Agriculture and Life Sciences (CALS), Seoul National University (SNU)*, Korea Selatan; jawawut varietas lokal Nusa Tenggara Timur koleksi bank gen BB Biogen; tomat varietas Intan koleksi Balitsa; mentimun varietas Roberto dari *Chia Tai Seeds Co.*

Isolasi RNA dan Sintesis cDNA

Isolasi RNA dilakukan dari jaringan akar tanaman jelai, jawawut, tomat, dan mentimun yang diperlakukan pada kondisi hipoksia (Muench dan Good 1994). Perlakuan hipoksia dilakukan dengan cara merendam tanaman dengan larutan Yoshida kira-kira setengah tinggi tanaman. Selanjutnya, dilakukan pemberian minyak goreng setinggi 1 cm pada permukaan atas larutan Yoshida. Perlakuan ini dilakukan selama 48 jam. RNA total tanaman diisolasi dari 100 mg jaringan akar dengan menggunakan prosedur dari *RNeasy® Plant Mini Kit* (QIAGEN, Jerman). RNA total yang diperoleh selanjutnya digunakan sebagai cetakan untuk pembentukan cDNA.

RNA diperlakukan dengan DNaseI sebelum digunakan untuk sintesis cDNA. Pembentukan cDNA dari RNA dilakukan dengan menggunakan enzim *reverse transcriptase* (Promega, AS). Campuran reaksi yang disiapkan untuk sintesis cDNA terdiri atas 1 µg sampel RNA ditambahkan dengan 0,5 µl oligo dT dan ddH₂O hingga volume akhir 18 µl. Setelah itu, campuran dimasukkan ke dalam mesin PCR *T100™ Thermal Cycler* (Bio-Rad, AS) dengan tahapan pemanasan awal, yaitu inkubasi pada 65°C selama 10 menit, lalu didinginkan pada 5°C. Setelah selesai, campuran disimpan di dalam es. Tahapan dilanjutkan dengan transkripsi balik (*reverse transcription/RT*) dengan campuran reaksi 5 µl bufer RT, 0,5 µl RNase, 1 µl dNTPs 2 mM, 0,5 µl RTase, dan 18 µl sampel RNA. Campuran dimasukkan ke dalam mesin PCR dengan tahapan inkubasi pada 42°C selama 50 menit, pada

65°C selama 10 menit, dan didinginkan pada 50°C. Setelah selesai, sampel cDNA disimpan pada -20°C. cDNA yang diperoleh digunakan sebagai cetakan untuk analisis PCR menggunakan primer spesifik gen *AlaAT* (Tabel 1) yang didesain dengan perangkat lunak *Primer3Plus* berdasarkan homologi sekuens asam amino gen *AlaAT* jelai.

Penyisipan Fragmen Gen *AlaAT* ke dalam Vektor Kloning *pGEM®-T Easy*

Analisis PCR untuk mengamplifikasi gen *AlaAT* dilakukan dengan volume campuran reaksi PCR sebanyak 20 µl yang mengandung bufer PCR 1×, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 100 µM, primer *forward* dan *reverse* masing-masing 0,5 µM, 5 µl cDNA gen *AlaAT*, dan 1 unit Taq DNA polimerase. Program PCR yang digunakan ialah denaturasi permulaan pada 94°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri atas denaturasi pada 94°C selama 60 detik, penempelan primer pada 55–60°C selama 45 detik, dan elongasi pada 72°C selama 1,5 menit. Hasil PCR kemudian diseparasi pada gel agarosa 1% dengan tegangan listrik 100 volt selama 1 jam. Pewarnaan DNA dilakukan dengan merendam gel di dalam larutan etidium bromida. Pengamatan dilakukan di bawah sinar UV dengan bantuan *ChemiDoc™ EQ Imaging System* (Bio-Rad, AS).

Fragmen gen *AlaAT* yang sesuai dengan ukuran ampikon yang benar kemudian dipurifikasi dengan menggunakan *QIAquick® Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Jerman) dan disisipkan ke dalam vektor kloning *pGEM®-T Easy* (Promega, AS). Verifikasi plasmid rekombinan dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi yang sesuai, yaitu *BamHI* dan *KpnI*. Plasmid rekombinan yang benar kemudian ditransformasikan ke *Escherichia coli* DH5α dengan metode *heat shock* (Sambrook et al. 1989). Plasmid-plasmid rekombinan yang diperoleh dikirim ke perusahaan *1st BASE* untuk proses *sequencing*.

Analisis Homologi Gen *AlaAT* Jelai, Jawawut, Tomat, dan Mentimun

Sekuens nukleotida dan asam amino homologi gen *AlaAT* jelai, jawawut, tomat, dan mentimun diperoleh dari pangkalan data sekuens (NCBI 1988) dengan menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide* (BLASTn) dan BLASTp (Altschul et al. 1997) dengan sekuens asam amino gen *AlaAT* jelai sebagai rujukan. Perangkat lunak *Clustal Omega* (Madeira et al. 2019) kemudian digunakan untuk menganalisis penyejajaran urutan prediksi asam amino gen *AlaAT* empat spesies tanaman tersebut.

Analisis Filogenetik Gen *AlaAT* pada Berbagai Spesies Tanaman Monokotil dan Dikotil

Analisis filogenetik gen *AlaAT* dilakukan dengan membandingkan sekuens asam amino gen *AlaAT* empat spesies tanaman tersebut dengan sekuens asam amino gen *AlaAT* berbagai spesies tanaman lainnya yang diperoleh dari pangkalan data sekuens (NCBI 1988) dengan menggunakan program BLASTp (Altschul et al. 1997) dengan sekuens asam amino gen *AlaAT* jelai sebagai rujukan. Analisis ini melibatkan gen *AlaAT* yang berasal dari 29 spesies tanaman yang dipilih secara acak dan mewakili kelompok tanaman monokotil (padi, jagung, dan golongan rumput-rumputan) dan kelompok tanaman dikotil (antara lain dari famili Solanaceae, Cucurbitaceae, dan Brassicaceae). Perangkat lunak *Clustal Omega* (Madeira et al. 2019) kemudian digunakan untuk menganalisis penyejajaran urutan prediksi asam amino produk PCR dari fragmen gen *AlaAT* jelai dengan asam amino gen *AlaAT* kelompok tanaman tersebut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi Gen Kandidat *AlaAT* dan Penyejajaran Sekuens Nukleotidanya

Sekuens nukleotida lengkap gen *AlaAT* yang diisolasi dari empat spesies tanaman, yaitu jelai, jawawut, tomat, dan mentimun, yang digunakan pada penelitian ini diperoleh melalui penelusuran sekuens asam amino (BLASTp) pada situs NCBI (1988). Jelai dan jawawut mewakili kelompok tanaman monokotil, sedangkan tomat dan mentimun mewakili kelompok tanaman dikotil.

Informasi yang diperoleh dari hasil penelusuran ialah nomor akses gen *AlaAT* yang kemudian dipilih secara acak. Hasil urutan nukleotida gen *AlaAT* yang didapatkan kemudian digunakan untuk perancangan sekuens primer spesifik gen *AlaAT* tersebut (Tabel 1).

Amplifikasi PCR gen *AlaAT* yang diisolasi dari jelai, jawawut, tomat, dan mentimun masing-masing menghasilkan amplicon dengan ukuran sekitar 1.558 bp, 1.628 bp, 1.755 bp, dan 1.565 bp (Gambar 1) sesuai dengan ukuran amplicon target primernya (Tabel 1). Amplicon gen *AlaAT* jelai varietas Tae-kang bori mempunyai ukuran 1.558 bp dengan ukuran *open reading frame* (ORF) yang sama dengan ukuran ORF sekuens rujukan gen *AlaAT* jelai varietas Himalaya (NCBI 1988).

Penyisipan Fragmen Gen *AlaAT* ke dalam Vektor Kloning dan Verifikasi DNA Rekombinan

Analisis *direct PCR* terhadap koloni tunggal bakteri yang diduga membawa DNA rekombinan (vektor *pGEM®-T Easy* + fragmen gen kandidat *AlaAT*) dilakukan dengan menggunakan primer M13. Hasil *direct PCR* menunjukkan bahwa terdapat tiga koloni dari lima koloni yang dianalisis yang menunjukkan positif membawa DNA rekombinan, yaitu mengandung sisipan fragmen gen kandidat *AlaAT* (Gambar 2A). Hasil PCR positif diindikasikan dengan terbentuknya fragmen DNA berukuran sekitar 1.900 bp yang merupakan gabungan ukuran fragmen *pGEM®-T Easy* (300 bp) dan gen kandidat *AlaAT* (sekitar 1.600 bp).

Analisis pemotongan (*digest*) merupakan cara validasi yang banyak digunakan untuk memastikan bahwa gen target telah terintegrasi, baik ke dalam vektor kloning maupun vektor ekspresi. Indikasi keberhasilan subkloning dibuktikan dengan proses validasi melalui pemotongan DNA plasmid dengan enzim restriksi yang sudah umum dilakukan. Pemotongan plasmid DNA rekombinan dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi *EcoRI*. DNA rekombinan yang membawa sisipan gen *AlaAT* ditunjukkan dengan terbentuknya dua fragmen DNA setelah pemotongan tersebut (Gambar 2B). Dua fragmen DNA yang dihasilkan berukuran sekitar 3.000 bp yang merupakan vektor kloning *pGEM®-T Easy*

Tabel 1. Akses gen *AlaAT* empat spesies tanaman, primer yang didesain berdasarkan urutan nukleotida untuk mengamplifikasi gen kandidat *AlaAT*, dan ukuran amplicon dan ORF gen *AlaAT*.

Nama gen	Tanaman	Nomor akses gen	Sekuens primer yang didesain	Ukuran amplicon/ORF (bp)
<i>HvAlaAT</i>	Jelai/barley (<i>Hordeum vulgare</i>)	CAA81231.1	F: 5'-GCGGATCCGAAGATACTCGCTGCTCTGC-3' R: 5'-GCGGTACCAACCAAGAACGCCTACGAAA-3'	1.558/1.448
<i>SiAlaAT</i>	Jawawut (<i>Setaria italica</i>)	XM_004983042.1	F: 5'-GCTTAATTAATGTTCCGTGCTGAGAAGCAA-3' R: 5'-GCGGTACCGGAAGGCGCCTCTACAGAAA-3'	1.628/1.448
<i>LeAlaAT</i>	Tomat (<i>Solanum lycopersicum</i>)	XM_004235479.1	F: 5'-GCGGATCCGTGCGCTCGATTTATGCGAA-3' R: 5'-GCGGTACCTACCCCACTCCTTAGCC-3'	1.755/1.727
<i>CsAlaAT</i>	Mentimun (<i>Cucumis sativus</i>)	XM_004141685.1	F: 5'-GCGGATCCCGGTACACCACCAACTCTT-3' R: 5'-GCGGTACC TGCACCTTTGATACGCAGGA-3'	1.565/1.446

ORF = *open reading frame*, bp = *base pair*.

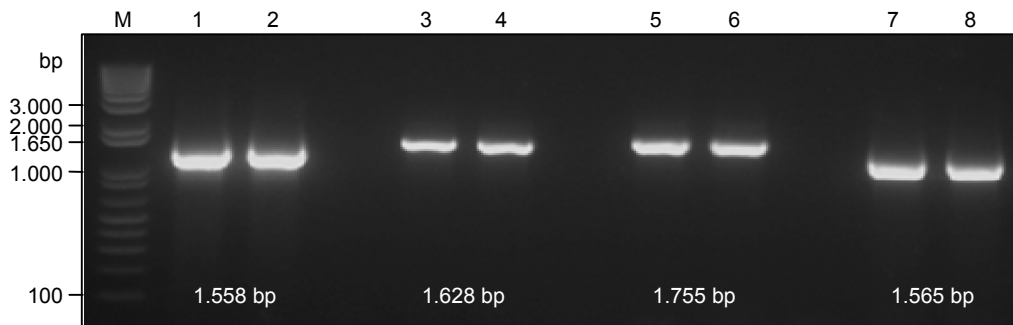
dan sekitar 1.600 bp yang merupakan fragmen gen kandidat *AlaAT*. Hasil validasi ini sejalan dengan penelitian sebelumnya, analisis pemotongan plasmid rekombinan yang terkonfirmasi positif menghasilkan fragmen berukuran 3.000 bp yang merupakan plasmid *pGEM®-T Easy* dan 1.200 bp yang merupakan fragmen gen kandidat *OsWRKY76* (Apriana et al. 2011).

Analisis Sequencing Fragmen Gen *AlaAT*

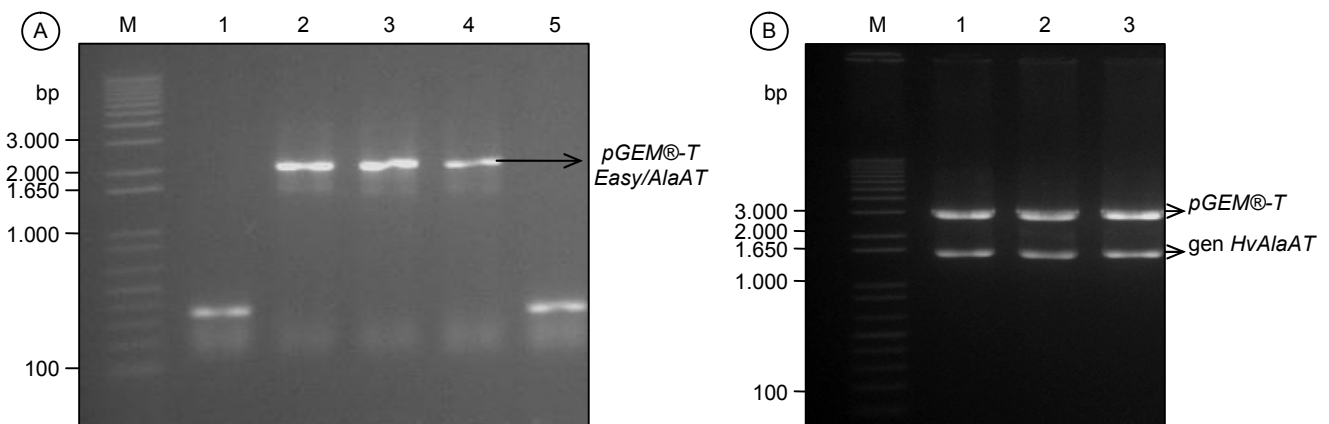
Hasil pengurutan nukleotida menunjukkan bahwa gen *AlaAT* yang diisolasi dari jelai, jawawut, tomat, dan mentimun mempunyai homologi 100% dengan sekuens rujukan (data tidak ditampilkan). Hasil ini menunjukkan bahwa fragmen DNA yang diperoleh dari amplifikasi PCR menggunakan primer spesifik merupakan gen *AlaAT* yang dimaksud karena menunjukkan homologi sekuens nukleotida sesuai

dengan nomor akses yang telah dirujuk (Tabel 1). Fragmen gen kandidat *AlaAT* yang didapatkan menunjukkan tidak ada bagian nukleotida yang mengalami delesi, insersi, dan substitusi sehingga diprediksi tidak mengalami perubahan susunan atau urutan asam aminonya.

Urutan nukleotida gen *AlaAT* jelai, jawawut, tomat, dan mentimun kemudian digunakan untuk memprediksi susunan asam aminonya. Hasil penyejajaran urutan asam amino gen *AlaAT* empat spesies tanaman tersebut menunjukkan kesamaan dengan sekuens rujukannya. Hasil penyejajaran urutan asam amino gen *AlaAT* jelai hasil isolasi dengan sekuens rujukan menunjukkan homologi 100% (Gambar 3). Gen *AlaAT* jelai varietas Tae-kang bori mempunyai jumlah asam amino (482 aa) yang identik dengan gen *AlaAT* jelai varietas Himalaya (NCBI 1988) dan gen *AlaAT* jelai cv. Leduc (Muench dan Good 1994).



Gambar 1. Elektroforegram hasil amplifikasi gen kandidat *AlaAT* dari cDNA jaringan akar tanaman target menggunakan primer spesifik gen *AlaAT*. M = marker (1 kb plus DNA ladder), 1 dan 2 = ampikon gen kandidat *AlaAT* dari jelai, 3 dan 4 = ampikon gen kandidat *AlaAT* dari jawawut, 5 dan 6 = ampikon gen kandidat *AlaAT* dari tomat, 7 dan 8 = ampikon gen kandidat *AlaAT* dari mentimun. Angka di bawah pita DNA menunjukkan ukuran ampikon setiap gen kandidat *AlaAT* hasil amplifikasi dari empat spesies tanaman yang dianalisis.



Gambar 2. Produk *direct PCR* klon *pGEM®-T Easy/AlaAT* dan hasil pemotongan fragmen *pGEM®-T Easy* dan gen kandidat *AlaAT* dengan enzim restriksi *EcoRI*. (A) Elektroforegram hasil analisis *direct PCR* menggunakan pasangan primer M13 dengan koloni bakteri sebagai cetakan. PCR positif mengindikasikan keberhasilan proses kloning gen *AlaAT* ke dalam vektor *pGEM®-T Easy* sehingga terbentuk DNA rekombinan. M = marker (1 kb plus DNA ladder), 1 dan 5 = koloni bakteri yang tidak mengandung DNA rekombinan, 2-4 = koloni bakteri yang positif mengandung DNA rekombinan. (B) Elektroforegram hasil verifikasi pemotongan plasmid rekombinan (vektor *pGEM®-T Easy/AlaAT* jelai [*HvAlaAT*]) dengan enzim restriksi *EcoRI*. M = marker (1 kb plus DNA ladder), 1-3 = DNA rekombinan hasil ligasi antara vektor *pGEM®-T Easy* dan gen *HvAlaAT*.

Berdasarkan kesamaan jumlah prediksi asam amino dan tidak adanya perubahan dalam hal susunan atau urutan asam aminonya, diduga gen tersebut juga mempunyai homologi dalam hal fungsi enzimatisnya.

Analisis Homologi Gen *AlaAT* Jelai, Jawawut, Tomat, dan Mentimun

Sekuens asam amino gen *AlaAT* yang diisolasi dari jelai, jawawut, tomat, dan mentimun dapat digunakan untuk menentukan identitas tiap-tiap gen tersebut. Penyejajaran sekuens asam amino gen *AlaAT* empat spesies tanaman tersebut dengan perangkat lunak *Clustal Omega* menunjukkan adanya sekuens asam amino yang terkonservasi (*conserved sequences*) (Gambar 4). Identitas sekuens gen *AlaAT* keempat spesies tanaman menunjukkan bahwa gen *AlaAT* mentimun mempunyai kesamaan identitas sekitar 78% dengan tiga gen *AlaAT* lainnya (Tabel 2). Sementara itu, gen *AlaAT* jelai memiliki kesamaan identitas genetik yang tinggi dengan gen *AlaAT* jawawut, yaitu sekitar 91,48%. Kedua spesies tanaman ini termasuk kelompok tanaman monokotil. Kesamaan identitas yang cukup tinggi di antara tanaman tersebut diduga juga menunjukkan adanya kesamaan fungsi gennya. Hal ini seperti yang dijelaskan oleh Todd et al. (2001) bahwa adanya variasi fungsi gen ditentukan oleh semakin rendahnya tingkat kesamaan identitas gen.

Analisis Filogenetik Gen *AlaAT* pada Berbagai Spesies Tanaman Monokotil dan Dikotil

Hasil analisis filogenetik yang melibatkan protein gen *AlaAT* 29 spesies tanaman lainnya dari pangkalan data sekuens (NCBI 1988) menunjukkan bahwa gen *AlaAT* yang diisolasi dari jelai, jawawut, tomat, dan mentimun mengelompok pada grup yang berbeda (Gambar 5). Gen *AlaAT* jelai dan jawawut mempunyai jarak genetik yang relatif dekat dibanding dengan gen *AlaAT* tomat dan mentimun. Protein *AlaAT* jelai dan jawawut berada dalam satu grup dengan protein *AlaAT* kelompok tanaman monokotil (Gambar 5). Sementara itu, protein *AlaAT* tomat terletak pada grup yang berbeda dengan protein *AlaAT* mentimun, meskipun keduanya merupakan tanaman dikotil. Protein *AlaAT* tomat mengelompok dengan protein *AlaAT* tanaman dari famili Solanaceae, seperti cabai dan kentang. Sementara, protein *AlaAT* mentimun mengelompok dengan protein *AlaAT* tanaman dari famili Cucurbitaceae, yaitu *C. melo*, dan tanaman *Prunus* dari famili Rosaceae.

Informasi hasil analisis filogenetik tersebut menunjukkan bahwa gen *AlaAT* dari kelompok tanaman monokotil, termasuk gen *AlaAT* jelai, memiliki persentase persamaan identitas yang berbeda dengan gen *AlaAT* dari kelompok tanaman dikotil. Matriks persentase persamaan identitas antara gen *HvAlaAT* dengan gen *CsAlaAT* dan *LeAlaAT* kurang dari 80% (Tabel 3). Perbedaan yang ada antara kelompok tanaman monokotil dan dikotil sejalan dengan hasil

HvAlaAT_R	MAATVAVDNLPKVLKCEYAVRGEIIVHAQRLQEQLKTPGSLPFDEILYCNIGNPQSLG	60
HvAlaAT_K	MAATVAVDNLPKVLKCEYAVRGEIIVHAQRLQEQLKTPGSLPFDEILYCNIGNPQSLG	60
HvAlaAT_R	QQPVTFFREVLALCDHPDLLQREEIKTLFSADSIKQILAMIPGRATGAYSHSQGIK	120
HvAlaAT_K	QQPVTFFREVLALCDHPDLLQREEIKTLFSADSIKQILAMIPGRATGAYSHSQGIK	120
HvAlaAT_R	LRDAIASGIASRDGFANADDIFLTDGASPGVHLMQLLIRNEKDGILVPIQYPLYSAS	180
HvAlaAT_K	LRDAIASGIASRDGFANADDIFLTDGASPGVHLMQLLIRNEKDGILVPIQYPLYSAS	180
HvAlaAT_R	IALHGGALVPYYLNESTGWGLETSVKKQLEDARSRGINVRALVVINPGNPTGQVLAEN	240
HvAlaAT_K	IALHGGALVPYYLNESTGWGLETSVKKQLEDARSRGINVRALVVINPGNPTGQVLAEN	240
HvAlaAT_R	QYDIVKFCCKNEGLVLLADEVYQENIYVDNKKFHSFKKIVRSLGYGEEDLPLVSYQSVSKG	300
HvAlaAT_K	QYDIVKFCCKNEGLVLLADEVYQENIYVDNKKFHSFKKIVRSLGYGEEDLPLVSYQSVSKG	300
HvAlaAT_R	YYGECGRGGYFEITGFSAPVREQIYKIASVNLCSNITGQILASLVMNPPKASDESAYSY	360
HvAlaAT_K	YYGECGRGGYFEITGFSAPVREQIYKIASVNLCSNITGQILASLVMNPPKASDESAYSY	360
HvAlaAT_R	KAEKDGIILASLARRAKALEHAFNKLEGITCNEAEGAMYVFPQICLPQKAI EAAKAANKAP	420
HvAlaAT_K	KAEKDGIILASLARRAKALEHAFNKLEGITCNEAEGAMYVFPQICLPQKAI EAAKAANKAP	420
HvAlaAT_R	DAFYALRRLLESTGIVVPGSGFGQVPGTWHFRCTILPQEDKIPAVISRFTVFHEAFMSEY	480
HvAlaAT_K	DAFYALRRLLESTGIVVPGSGFGQVPGTWHFRCTILPQEDKIPAVISRFTVFHEAFMSEY	480
HvAlaAT_R	RD	482
HvAlaAT_K	RD	482
	**	

Gambar 3. Hasil penyejajaran sekuens asam amino prediksi dari gen *AlaAT* jelai (*HvAlaAT_K*) dengan sekuens rujukan (*HvAlaAT_R*) yang diperoleh dari pangkalan data sekuens (NCBI 1988) dengan nomor akses CAA81231.1.

penelitian McAllister et al. (2013) yang mempelajari homologi gen AlaAT berdasarkan urutan sekuens asam aminonya pada tanaman Arabidopsis, Medicago truncanula, dan jelai. Hasil analisis homologi tersebut menunjukkan bahwa gen AlaAT

Arabidopsis dan M. truncanula (keduanya termasuk tanaman dikotil) mengelompok dalam grup yang berbeda dengan gen AlaAT jelai (tanaman monokotil).

Gen AlaAT termasuk dalam superfamili aminotransferase atau transaminase, yaitu sekelom-

Tabel 2. Matriks persentase identitas asam amino gen AlaAT yang diisolasi dari mentimun (CsAlaAT), tomat (LeAlaAT), jelai (HvAlaAT), dan jawawut (SiAlaAT).

Table with 5 columns: Gene Name, CsAlaAT, LeAlaAT, HvAlaAT, SiAlaAT. Rows show pairwise identity percentages between CsAlaAT, LeAlaAT, HvAlaAT, and SiAlaAT.

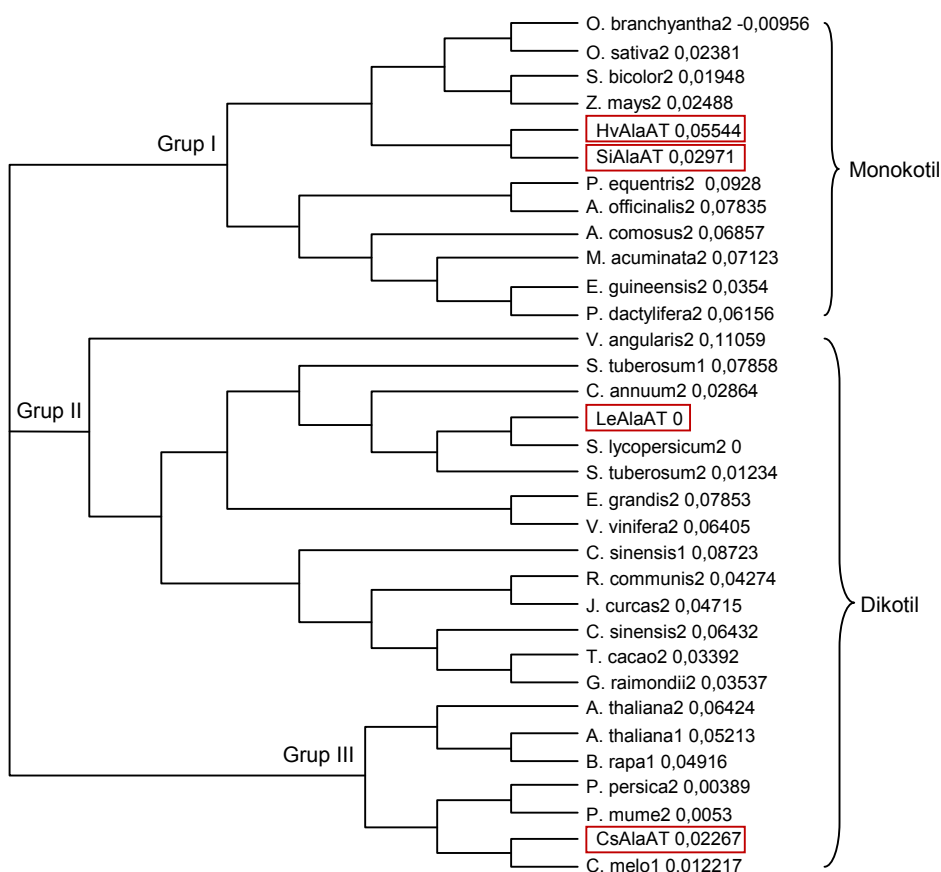
Large sequence alignment table showing amino acid sequences for CsAlaAT, LeAlaAT, HvAlaAT, and SiAlaAT. Conserved motifs are highlighted in grey, and a specific lysine residue is highlighted in red. Conservation markers (* and :) are used to denote positions.

Gambar 4. Hasil analisis penyejajaran asam amino gen AlaAT mentimun (CsAlaAT), tomat (LeAlaAT), jelai (HvAlaAT), dan jawawut (SiAlaAT). Warna abu-abu menunjukkan motif conserved pada aminotransferase kelas I, warna merah menunjukkan residu lisin yang penting untuk mengikat (binding) pyridoxal 5'-phosphate (P5'P/PLP). * (bintang) = posisi yang mempunyai residu tunggal dan sangat terkonservasi, : (titik dua) = konservasi antargrup yang mempunyai karakteristik yang sangat mirip, . (titik) = konservasi antargrup yang mempunyai karakteristik hampir mirip.

pok enzim yang mengatalisis interkonversi asam amino dan *oxoacid* dengan transfer gugus amino. Kelompok aminotransferase yang paling besar ialah *aspartate aminotransferase* (AST) yang disebut juga *glutamate oxaloacetate transaminase* (GOT) dan *alanine aminotransferase* (AlaAT) yang disebut juga *glutamate pyruvate transaminase* (GPT). *Pyridoxal 5'-phosphate* (P5'P/PLP) berfungsi sebagai koenzim dalam reaksi transfer amino. Reaksi transfer amino melibatkan *2-oxoglutarate* dan *L-glutamate* yang masing-masing berfungsi sebagai akseptor dan donor kelompok amino (NCBI 1988). Domain terkonservasi yang terdapat pada gen *AlaAT* termasuk dalam superfamili aminotransferase kelas I (Jehsen dan Gu 1996) yang ditunjukkan dengan warna abu-abu

(Gambar 4). Klasifikasi tersebut ditentukan oleh struktur domain utama yang tidak selalu dapat diidentifikasi fungsinya (Todd et al. 2001). Hasil analisis penyejajaran asam amino pada keempat motif aminotransferase menunjukkan matriks persentase identitas yang bervariasi (Tabel 3).

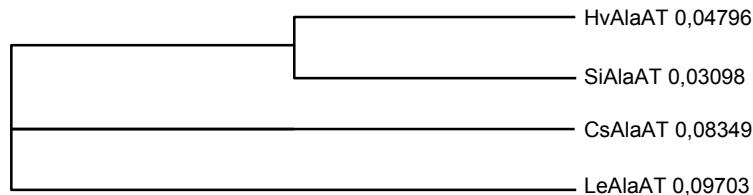
Persentase identitas motif aminotransferase pada gen *AlaAT* menunjukkan persamaan identitas gen *AlaAT* tanaman monokotil antara jelai dan jawawut sebesar 92,11%, sedangkan antara jelai dan tanaman dikotil mentimun dan tomat masing-masing sebesar 79,71% dan 77,65%. Dendrogram filogenetik keempat gen *AlaAT* berdasarkan motif aminotransferase menunjukkan adanya dua kelompok yang terpisah antara tanaman monokotil



Gambar 5. Dendrogram filogenetik berdasarkan sekuens prediksi asam amino (protein) gen *AlaAT* dari cDNA mentimun (*CsAlaAT*), tomat (*LeAlaAT*), jelai (*HvAlaAT*), dan jawawut (*SiAlaAT*), serta 29 protein *AlaAT* berbagai spesies tanaman yang diperoleh dari pangkalan data sekuens (NCBI 1988). Protein *AlaAT* dari cDNA mentimun, tomat, jelai, dan jawawut ditandai dengan kotak merah. *O. branchyantha2* = *Oryza branchyantha* AlaAT2, *O. sativa2* = *O. sativa* AlaAT2, *S. bicolor2* = *Sorghum bicolor* AlaAT2, *Z. mays2* = *Zea mays* AlaAT2, *P. equestris2* = *Phalaenopsis equestris* AlaAT2, *A. officinalis2* = *Asparagus officinalis* AlaAT2, *A. comosus2* = *Ananas comosus* AlaAT2, *M. acuminata2* = *Musa acuminata* AlaAT2, *E. guineensis2* = *Elaeis guineensis* AlaAT2, *P. dactylifera2* = *Phoenix dactylifera* AlaAT2, *V. angularis2* = *Vigna angularis* AlaAT2, *S. tuberosum1* = *Solanum tuberosum* AlaAT1, *C. annum2* = *Capsicum annum* AlaAT2, *S. lycopersicum2* = *S. lycopersicum* AlaAT2, *S. tuberosum2* = *S. tuberosum* AlaAT2, *E. grandis2* = *Euclayptus grandis* AlaAT2, *V. vinifera2* = *Vitis vinifera* AlaAT2, *C. sinensis1* = *Camellia sinensis* AlaAT1, *R. communis2* = *Ricinus communis* AlaAT2, *J. curcas2* = *Jatropha curcas* AlaAT2, *C. sinensis2* = *C. sinensis* AlaAT2, *T. cacao2* = *Theobroma cacao* AlaAT2, *G. raimondii2* = *Gossypium raimondii* AlaAT2, *A. thaliana2* = *Arabidopsis thaliana* AlaAT2, *A. thaliana1* = *A. thaliana* AlaAT1, *B. rapa1* = *Brassica rapa* AlaAT1, *P. persica2* = *Prunus persica* AlaAT2, *P. mume2* = *P. mume* AlaAT2, *C. melo1* = *Cucumis melo* AlaAT1.

Tabel 3. Matriks persentase identitas motif aminotransferase pada gen *AlaAT* yang diisolasi dari jelai (*HvAlaAT*), jawawut (*SiAlaAT*), tomat (*LeAlaAT*), dan mentimun (*CsAlaAT*).

	<i>HvAlaAT</i>	<i>SiAlaAT</i>	<i>CsAlaAT</i>	<i>LeAlaAT</i>
<i>HvAlaAT</i>	100,00	-	-	-
<i>SiAlaAT</i>	92,11	100,00	-	-
<i>CsAlaAT</i>	79,71	80,70	100,00	-
<i>LeAlaAT</i>	77,65	80,06	81,95	100,00

**Gambar 6.** Dendrogram filogenetik berdasarkan prediksi sekuens asam amino pada motif aminotransferase gen *AlaAT* yang diisolasi dari jelai (*HvAlaAT*), jawawut (*SiAlaAT*), tomat (*LeAlaAT*), dan mentimun (*CsAlaAT*).

(jelai dan jawawut) dan dikotil (tomat dan mentimun) (Gambar 6). Todd et al. (2001) menyatakan bahwa persamaan identitas sekuens asam amino sekitar 30% secara signifikan menunjukkan adanya variasi fungsi protein. Berdasarkan adanya persamaan identitas sekuens pada motif aminotransferase keempat spesies tanaman yang cukup tinggi (77,65–92,11%), diduga enzim tersebut mempunyai fungsi yang sama.

Asam amino penting yang diidentifikasi pada motif aminotransferase adalah residu lisin pada posisi ke-299 yang termasuk dalam sekuens terkonservasi. Residu ini dianggap penting dalam menyediakan ikatan *aldimine* yang diperlukan untuk mengikat (*binding*) PLP (Muench dan Good 1994). Residu lisin pada keempat gen *AlaAT* yang diisolasi teridentifikasi pada posisi yang berbeda. Residu lisin pada gen *AlaAT* jawawut (*SiAlaAT*) teridentifikasi pada posisi yang sama dengan jelai (*HvAlaAT*), sedangkan pada tomat (*LeAlaAT*) dan mentimun (*CsAlaAT*) masing-masing berada pada posisi ke-392 dan ke-305 (Gambar 4). Posisi residu katalitik antarsumber gen dapat bervariasi, meskipun peran fungsionalnya sama (Todd et al. 2001). Pengikatan PLP pada gen *AlaAT* teridentifikasi pada keempat spesies tanaman.

Enzim yang bergantung pada PLP diklasifikasikan berdasarkan jenis reaksi, kisaran substrat, kesamaan urutan, dan fitur struktural. Sistem klasifikasi ini banyak digunakan mengelompokkan enzim berdasarkan jenis reaksi dan substrat. Namun, hal ini tidak berkorelasi dengan klasifikasi secara filogenetik dan konservasi struktural (Palacio 2019). Kesamaan fungsional suatu enzim tidak hanya dilihat dari kesamaan sekuens asam aminonya saja, namun yang lebih penting adalah kesamaan struktur situs aktif,

kekhususan substrat, fungsi, dan lipatan tiga dimensi (Catanzaro et al. 2014). Sementara itu, peneliti lain melakukan penelitian fungsi enzim *AlaAT* pada beberapa sumber gen *AlaAT* dengan melihat laju kinetik reaksinya (McAllister et al. 2013). Perbedaan sumber enzim dan prosedur pemurnian dapat berpengaruh terhadap perilaku enzimatik dan laju kinetiknya. PLP yang teridentifikasi pada gen *AlaAT* keempat spesies tanaman tersebut diduga mempunyai fungsi yang identik dengan gen *AlaAT* jelai yang telah dipelajari fungsinya terkait dengan sifat EPN (Shrawat et al. 2008). Enzim ini merupakan penghubung antara asimilasi nitrogen dan metabolisme karbon yang introduksinya ke tanaman transgenik akan meningkatkan hasil panen (Duff et al. 2012).

Analisis fungsi gen terkait dengan sifat EPN diperlukan untuk memastikan bahwa gen kandidat *AlaAT* tersebut mempunyai fungsi yang sama, yaitu dengan melakukan studi rekayasa genetika pada tanaman model atau tanaman lainnya. Identitas gen *AlaAT* terutama pada tanaman tomat dan mentimun yang telah didapatkan dan diprediksi fungsi enzimnya yang identik dengan gen *AlaAT* jelai diharapkan dapat memunculkan fenotipe EPN. Aplikasi gen tersebut dapat digunakan untuk merakit padi EPN melalui teknik rekayasa genetika tanpa terhalang oleh klaim HAKI dari pihak lain.

KESIMPULAN

Gen *AlaAT* jelai, jawawut, tomat, dan mentimun telah diisolasi. Sekuens nukleotida dan asam amino gen-gen tersebut mempunyai homologi 100% dengan sekuens gen *AlaAT* rujukan. Homologi asam amino gen *AlaAT* jelai dengan gen *AlaAT* tomat, mentimun,

dan jawawut berturut-turut 77,75%, 75,68%, dan 91,48%. Identitas motif aminotransferase gen *AlaAT* tanaman monokotil antara jelai dan jawawut sebesar 92,11%. Sementara, identitas motif aminotransferase gen *AlaAT* antara jelai dan tanaman dikotil mentimun dan tomat masing-masing sebesar 79,71% dan 77,65%. Analisis filogenetik membagi gen *AlaAT* menjadi tiga grup. Gen *AlaAT* jawawut dan jelai berada pada grup I bersama gen *AlaAT* tanaman monokotil lainnya. Gen *AlaAT* tanaman dikotil terbagi menjadi dua dengan gen *AlaAT* tomat berada pada grup II dan gen *AlaAT* mentimun pada grup III. Gen *AlaAT* hasil penelitian ini perlu diverifikasi potensinya untuk perakitan varietas tanaman padi EPN.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai melalui anggaran DIPA Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian RI dengan No. Kode DIPA 1798.201.052.A. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Dr. Reflinur atas bantuannya dalam memfasilitasi permintaan benih jelai varietas Taekang bori kepada bank gen milik *Laboratory of Crop Molecular Breeding, Department of Plant Science, CALS, SNU, Korea Selatan*. Terima kasih juga disampaikan kepada Bapak Heri Hersusatio dan Ibu Nuryati atas bantuan teknisnya selama penelitian berlangsung.

KONTRIBUTOR PENULISAN

AS: kontributor utama, menyusun konsep penelitian, melakukan penelitian, menganalisis data, dan menulis manuskrip. AA: kontributor anggota, melakukan penelitian. TJS: kontributor anggota, menganalisis data. BSP dan NK: kontributor anggota, mengembangkan konsep penelitian dan melakukan supervisi penelitian. KRT: kontributor anggota, penanggung jawab penelitian, mengembangkan konsep penelitian, dan melakukan supervisi penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. [Online] 25 (17), 3389–3402. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389> [Diakses 29 Oktober 2015].

Apriana, A., Sisharmini, A., Enggarini, W., Sudarsono, Khumaida, N. & Trijatmiko, K.R. (2011) Introduksi

konstruk over-ekspresi kandidat gen *OsWRKY76* melalui *Agrobacterium tumefaciens* pada tanaman padi Nipponbare. *Jurnal AgroBiogen*, 7 (1), 19–27.

- Catazaro, J., Caprez, A., Guru, A., Swanson, D. & Powers, R. (2014) Functional evolution of PLP-dependent enzymes based on active site structural similarities. *Proteins*. [Online] 82 (10), 2597–2608. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1002/prot.24624> [Diakses 21 November 2019].
- Duff, S.M.G., Rydel, T.J., McClerren, A.L., Zhang, W., Li, J.Y., Sturman, E.J., Halls, C., Chen, S., Zeng, J., Peng, J., Kretzler, C.N. & Evdokimov, A. (2012) The enzymology of alanine aminotransferase (AlaAT) isoforms from *Hordeum vulgare* and other organisms, and the HvAlaAT crystal structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. [Online] 528 (1), 90–101. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.06.006> [Diakses 21 November 2019].
- Good, A.G. & Beatty, P. (2011) Biotechnological approaches to improving nitrogen use efficiency in plants: Alanine aminotransferase as a case study. In: Hawkesford, M.J. & Barraclough, P. (eds.) *The molecular and physiological basis of nutrient use efficiency in crops*. New Jersey, John Wiley & Sons, pp. 165–191.
- Good, A.G. & Crosby, W.L. (1989) Anaerobic induction of alanine aminotransferase in barley root tissue. *Plant Physiology*. [Online] 90 (4), 1305–1309. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1104/pp.90.4.1305> [Diakses 16 September 2019].
- Good, A.G., DePauw, M., Kridl, J.C., Theodoris, G. & Shrawat, A.K. (2012) *Nitrogen-efficient monocot plants*. [Online] Arcadia Biosciences Inc. United States patent number: US 8,288,611 B2. Tersedia pada: <https://app.dimensions.ai/downloads/patents?ucid=US-8288611-B2> [Diakses 29 Oktober 2015].
- Good, A.G., Johnson, S.J., De Pauw, M., Carrol, R.T., Savidov, N., Vidmar, J., Lu, Z., Taylor, G. & Stroehrer, V. (2007) Engineering nitrogen use efficiency with alanine aminotransferase. *Canadian Journal of Botany*. [Online] 85 (3), 252–262. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1139/B07-019> [Diakses 16 September 2019].
- Hashimoto, M., Herai, Y., Nagaoka, K. & Kouno, K. (2007) Nitrate leaching in granitic regosol as affected by N uptake and transpiration by corn. *Soil Science and Plant Nutrition*. [Online] 53 (3), 300–309. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00134.x> [Diakses 3 Oktober 2019].
- Igarashi, D., Miwa, T., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K. & Ohsumi, C. (2003) Identification of photorespiratory *glutamate:glyoxylate aminotransferase* (GGAT) gene in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. [Online] 33 (6), 975–987. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01688.x> [Diakses 16 September 2019].
- Jehsen, R.A. & Gu, W. (1996) Evolutionary recruitment of biochemical specialized subdivisions of family I within

- the protein superfamily of *aminotransferase*. *Journal of Bacteriology*. [Online] 178 (8): 2161-2171. Tersedia pada: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8636014> [Diakses 21 November 2019].
- Kendziorek, M., Paszkowski, A. & Zagdańska, B. (2012) Differential regulation of *alanine aminotransferase* homologues by abiotic stresses in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Plant Cell Reports*. [Online] 31 (6), 1105–1117. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1231-2> [Diakses 3 Oktober 2019].
- Kikuchi, H., Hirose, S., Toki, S., Akama, K. & Takaiwa, F. (1999) Molecular characterization of a gene for alanine aminotransferase from rice (*Oryza sativa*). *Plant Molecular Biology*. [Online] 39 (1), 149–159. Tersedia pada: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1006156214716> [Diakses 3 Oktober 2019].
- Liepmann, A.H. & Olsen, L.J. (2003) Alanine aminotransferase homologs catalyze the glutamate:glyoxylate aminotransferase reaction in peroxisomes of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. [Online] 131 (1), 215–227. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1104/pp.011460> [Diakses 3 Oktober 2019].
- Madeira, F., Park, Y.M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A.R.N., Potter, S.C., Finn, R.D. & Lopez, R. (2019) The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*. [Online] 47 (W1), W636–W641. Tersedia pada: <https://academic.oup.com/nar/article/47/W1/W636/5446251> [Diakses 29 Juli 2019].
- McAllister, C.H. & Good, A.G. (2015) Alanine aminotransferase variants conferring diverse NUE phenotypes in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*. [Online] 10 (4), e0121830. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121830> [Diakses 3 Oktober 2019].
- McAllister, C.H., Facette, M., Holt, A. & Good, A.G. (2013) Analysis of the enzymatic properties of a broad family of alanine aminotransferases. *PLoS ONE*. [Online] 8 (2), e55032. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055032> [Diakses 16 September 2019].
- Miyashita, Y., Dolferus, R. & Ismond, K.P. (2007) Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. [Online] 49 (6), 1108–1121. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.03023.x> [Diakses 16 September 2019].
- Muench, D.G. & Good, A.G. (1994) Hypoxically inducible barley alanine aminotransferase: cDNA cloning and expression analysis. *Plant Molecular Biology*. [Online] 24 (3), 417–427. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1007/BF00024110> [Diakses 29 Oktober 2015].
- Muench, D.G., Christopher, W.E. & Good, A.G. (1998) Cloning and expression of a hypoxic and nitrogen inducible maize *alanine aminotransferase* gene. *Physiologia Plantarum*. [Online] 503–512. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1030409.x> [Diakses 3 Oktober 2019].
- NCBI (1988) *National Center for Biotechnology Information*. [Online] National Library of Medicine, Bethesda (MD), USA. Tersedia pada: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [Diakses 29 Oktober 2015].
- Palacio, C. (2019) *Omega transaminases: Discovery, characterization and engineering*. Thesis. Rijksuniversiteit Groningen.
- Peng, H.P., Chan, C.S., Shih, M.C. & Yang, S.F. (2001) Signaling events in the hypoxic induction of *alcohol dehydrogenase* gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. [Online] 126 (2), 742–749. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.742> [Diakses 3 Oktober 2019].
- Ricoult, C., Echeverria, L.O., Cliquet, J.B. & Limami, A.M. (2006) Characterization of *alanine aminotransferase (AlaAT)* multigene family and hypoxic response in young seedlings of the model legume *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*. [Online] 57 (12), 3079–3089. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1093/jxb/erl069> [Diakses 3 Oktober 2019].
- Rocha, M., Sodek, L., Licausi, F., Hameed, M.W., Dornelas, M.C. & Van Dongen, J.T. (2010) Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*. [Online] 152 (3), 1501–1513. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1104/pp.109.150045> [Diakses 16 September 2019].
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2nd edition. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shrawat, A.K., Carrol, R.T., DePauw, M., Taylor, G.J. & Good, A.G. (2008) Genetic engineering of improved nitrogen use efficiency in rice by the tissue-specific expression of *alanine aminotransferase*. *Plant Biotechnology Journal*. [Online] 6 (7), 722–732. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00351.x> [Diakses 3 Oktober 2019].
- Snyman, S.J., Hajari, E., Watt, M.P., Lu, Y. & Kridl, J.C. (2015) Improved nitrogen use efficiency in transgenic sugarcane: Phenotypic assessment in a pot trial under low nitrogen conditions. *Plant Cell Reports*. [Online] 34 (5), 667–669. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1768-y> [Diakses 3 Oktober 2019].
- Son, D. & Sugiyama, T. (1992) Molecular cloning of an alanine aminotransferase from NAD-malic enzyme type C4 plant *Panicum miliaceum*. *Plant Molecular Biology*. [Online] 20 (4), 705–713. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1007/BF00046455> [Diakses 16 September 2019].
- Todd, A.E., Orengo, C.A. & Thornton, M. (2001) Evolution of function in protein superfamilies, from a structural perspective. *Journal of Molecular Biology*. [Online] 307 (4), 1113–1143. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4513> [Diakses 21 November 2019].

Vedavathi, M., Girish, K.S. & Kumar, M.K. (2004) Isolation and characterization of cytosolic alanine aminotransferase isoforms from starved rat liver. *Molecular and Cellular Biochemistry*. [Online] 267 (1–2), 13–23. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000049354.55955.12> [Diakses 16 September 2019].

Xu, Z., Ma, J., Qu, C., Hu, Y., Hao, B., Sun, Y., Liu, Z., Yang, H., Yang, C., Wang, H., Li, Y. & Liu, G. (2017) Identification and expression analyses of the *alanine aminotransferase (AlaAT)* gene family in poplar seedlings. *Scientific Reports*. [Online] 7 (April), 1–13. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1038/srep45933> [Diakses 3 Oktober 2019].
