



Analisis Sebagian Sekuen Gen *Ferritin2* pada Padi (*Oryza sativa* L.) Indragiri Hilir, Riau

Analysis of Partial Gene Sequence Ferritin2 on Rice Plants (Oryza sativa L.) Indragiri Hilir, Riau

✉ Fadel Nugraha, Dewi Indriyani Roslim, Yolla Putri Ardilla, Herman

DOI: 10.15294/biosaintifika.v6i2.3102

Biologi Dept., Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Riau University, Indonesia

Info Artikel

Diterima Mei 2014
Disetujui Juli 2014
Dipublikasikan September 2014

Keywords:

Indragiri Hilir; ferritin2 gene; Fe; Oryza sativa; Riau

Abstrak

Ion Fe bebas sangat beracun bagi tanaman, karena dapat membentuk radikal bebas di dalam sel. Walaupun demikian, tanaman memiliki mekanisme untuk mempertahankan homeostasis Fe di dalam sel yang melibatkan protein ferritin. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis dan membandingkan sekuen nukleotida gen *ferritin2* dari dua genotipe padi lokal (Bakung dan Serei) dari Indragiri Hilir, Riau dengan varietas padi rawa unggul tahan cekaman kelebihan Fe (Siam Sintanur), padi unggul tidak tahan cekaman kelebihan Fe (IR64), dan data sekuen nukleotida kultivar Nipponbare. Metode penelitian meliputi isolasi DNA total dari daun segar tanaman padi menggunakan metode CTAB dan amplifikasi DNA (PCR) menggunakan primer OsFer_F3 (*forward*) dan Gross_R (*reverse*). Produk PCR kemudian disekuensing dan disejajarkan. Pada penelitian ini telah diperoleh fragmen dari gen *ferritin2* dari kelima genotype atau varietas padi yang diuji, yang berukuran sekitar 1200 pb. Analisis pensejajaran menunjukkan terdapat 56 SNP (*single nucleotide polymorphism*) pada sekuen nukleotida gen *ferritin2* tersebut. Bakung menunjukkan kedekatan yang tinggi dengan Nipponbare, diikuti dengan IR64, Siam Sintanur, dan Serei. Kemungkinan Bakung merupakan genotipe padi lokal dari Indragiri Hilir, Riau yang tahan cekaman kelebihan Fe.

Abstract

Free Fe ions are highly toxic to plants, because it can form free radicals in the cells. However, plants have mechanisms to maintain Fe homeostasis in the cells involving ferritin proteins. This study was aimed to analyze and to compare the nucleotide sequence of ferritin2 gene in two local rice genotypes (namely Bakung and Serei) from Indragiri Hilir, Riau and in Fe overload-tolerant rice variety (Siam Sintanur), Fe overload-sensitive rice variety (IR64), as well as the nucleotide sequence of Nipponbare rice cultivar. The research methods consisted of DNA isolation from fresh leaves of rice plants using CTAB method and DNA amplification (PCR) using a couple of primers, OsFer_F3 (forward) and Gross_R (reverse). The PCR products were then sequenced and aligned. DNA fragments of ferritin2 gene with length of approx. 1200 bp were obtained from those four rice varieties or genotypes tested. Alignment revealed 56 SNPs (single nucleotide polymorphisms) in the ferritin2 gene sequences. Bakung showed close distance with Nipponbare, followed by IR64, Siam Sintanur, and Serei. It was suggested that Bakung was Fe overload-tolerant local rice genotype from Indragiri Hilir, Riau.

© 2014 Universitas Negeri Semarang

✉ Alamat korespondensi:
Kampus Bina Widya, Jl. HR Soebrantas, Panam, Pekanbaru 28293, Riau,
Indonesia E-mail: dewiindriyani@unri.ac.id

p-ISSN 2085 - 191X
e-ISSN 2338-7610

PENDAHULUAN

Beras memegang peranan penting dalam kehidupan manusia di belahan bumi ini karena merupakan makanan utama sekitar 35% penduduk dunia (Mehraban *et al.* 2008). Kebutuhan atau konsumsi beras di Indonesia mencapai 90 % dari jumlah penduduk yang ada. Bertambahnya jumlah penduduk dari waktu ke waktu membuat kebutuhan beras sebagai pangan pokok utama di Indonesia menjadi meningkat. Sementara itu telah terjadi penurunan produksi padi tahun 2013 sebesar 72.021 ton (14,06%) dibandingkan produksi tahun 2012. Penurunan produksi padi terjadi karena adanya penurunan luas panen sebesar 23.182 hektar atau 16,10%. Produksi tersebut belum mencukupi kebutuhan penduduk di Provinsi Riau karena kebutuhan konsumsi beras penduduk Riau sebesar 659.610 ton/ha (BPS Provinsi Riau 2013). Oleh karena itu, dibutuhkan suatu solusi sebagai jalan keluar bagi permasalahan ini, salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah dengan cara membuka lahan persawahan baru.

Permasalahan yang muncul pada lahan sawah bukaan baru terutama pada lahan gambut yang mendominasi wilayah Riau adalah kandungan Fe yang tinggi dan dapat menyebabkan terjadinya keracunan Fe^{2+} , defisiensi hara, kerusakan sel-sel akar tanaman dan defisit air yang pada akhirnya dapat menyebabkan terhambatnya pertumbuhan tanaman. Hambatan pertumbuhan pada lahan sawah bukaan baru ini semakin meningkat terutama pada kondisi terendam air, salah satu contohnya di daerah Kabupaten Indragiri Hilir, Riau yang merupakan daerah rawa pasang surut. Pada lahan rawa pasang surut sebagian besar tanah-tanah berkembang dari bahan induk yang kaya senyawa pirit (FeS_2) dan tanah yang terbentuk disebut Tanah Sulfat Masam. Drainase pada lahan rawa pasang surut menyebabkan senyawa pirit yang terkandung di dalam tanah menjadi teroksidasi (Zhang & Luo, 2002), yaitu Fe^{3+} akan di ubah menjadi Fe^{2+} (Ismunadji & Roechan 1988; Harjadi & Yahya 1988; Rengel 2000) sehingga akan meracuni tanaman, dan menurunkan kelarutan hara esensial sehingga

tanaman mengalami defisiensi hara K, P, Ca, dan n.

Salah satu alternatif untuk menanggulangi permasalahan pada lahan-lahan ini adalah dengan memanfaatkan tanaman yang tahan terhadap cekaman lingkungan. Tanaman yang toleran terhadap cekaman lingkungan mempunyai kemampuan untuk beradaptasi secara morfologi, fisiologi, dan agronomi (Pellet *et al.* 1995; Utama *et al.* 2009).

Zat besi (Fe) merupakan elemen penting bagi berbagai aktivitas seluler. Sebagai contoh, Fe memainkan peran penting dalam rantai transpor elektron di mitokondria yang menghasilkan sebagian besar ATP dalam proses fosforilasi oksidatif. Semua enzim yang terlibat dalam reaksi tersebut membutuhkan Fe sebagai kofaktor enzim. Akan tetapi, ion Fe bebas terutama dalam jumlah yang sangat banyak akan sangat beracun bagi tanaman karena dapat membentuk radikal bebas di dalam sel. Walaupun demikian, tanaman memiliki mekanisme untuk mempertahankan homeostasis Fe di dalam sel dan jaringannya. Mekanisme ini melibatkan protein ferritin.

Aktivitas protein ferritin ini juga bergantung pada genotipe padi. Genotipe padi yang tahan cekaman kelebihan Fe akan mengeskpresikan protein ferritin dalam jumlah yang lebih banyak dibandingkan genotipe padi yang tidak tahan cekaman kelebihan Fe (Mandal *et al.* 2004; Da Silveira *et al.* 2009). Perbedaan kemampuan genotipe padi dalam mengekspresikan protein ferritin tersebut pada tingkat molekuler dapat dideteksi dengan terlebih dahulu menganalisis sekuen nukleotida gen *ferritin*.

Analisis sekuen nukleotida gen *ferritin* pada beberapa genotipe padi lokal Riau, terutama dari Kabupaten Indragiri Hilir belum pernah dilakukan. Diperkirakan bahwa genotipe padi yang berasal dari Indragiri Hilir memiliki ketahanan terhadap cekaman kelebihan Fe pada daerah rawa pasang surut. Analisis ini sangat penting untuk mendukung program pemuliaan tanaman padi dalam menghasilkan varietas padi unggul yang tahan terhadap cekaman kelebihan Fe sehingga dapat meningkatkan efisiensi penanaman dan produktivitas padi itu sendiri. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan analisis untuk

membandingkan sekuen nukleotida gen *ferritin2* dari dua genotipe padi lokal (Bakung dan Serei) dari Indragiri Hilir, Riau dengan varietas padi rawa unggul tahan cekaman kelebihan Fe (Siam Sintanur), padi unggul tidak tahan cekaman kelebihan Fe (IR64), dan data sekuen nukleotida kultivar Nipponbare.

METODE

Tahap-tahapan penelitian yang dilakukan meliputi: sterilisasi, pengecambahan, dan penanaman biji padi; isolasi DNA total; PCR (*polymerase chain reaction*); elektroforesis; sekuensing; dan analisis data nukleotida.

Sterilisasi Biji Padi

Biji-biji padi yang akan ditanam disterilisasi terlebih dahulu mengikuti prosedur seperti yang dilakukan oleh Roslim *et al.* (2010), selanjutnya dikecambahkan di atas kertas merang yang lembab lalu diinkubasi di tempat yang gelap. Benih padi yang sudah berkecambah selanjutnya dipilih 5 kecambah per genotipe atau varietas padi untuk ditanam.

Isolasi DNA Total

Isolasi DNA total dilakukan setelah tanaman padi berumur empat minggu atau setelah tanaman menghasilkan minimal 4 helai daun. Isolasi DNA total dilakukan menggunakan metode CTAB (Saghai-Marooof *et al.* 1984).

Elektroforesis

Kualitas dan kuantitas DNA total dan DNA hasil amplifikasi (PCR) diukur menggunakan elektroforesis pada 1% gel agarose dalam 1x buffer TBE (Tris-Borate-EDTA pH 8.0), tegangan 65 volt selama 30 menit. Larutan DNA total disimpan pada suhu -20°C sedangkan larutan DNA kerja dengan konsentrasi 100 ng/μl disimpan di suhu 4°C.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Proses PCR dilakukan menggunakan sepasang primer, yaitu OsFer_F3 (forward) 5'-GAA TCC AGC GAT GAG GAG AG-3' dan Gross_R (reverse) 5'-CTT CGT TGA GAG TGA ATT CC-3' yang akan mengamplifikasi daerah terkonservasi dari isoform 2 gen *ferritin* pada daerah ekson 3 sampai

sebagian ekson 6 (Gross *et al.* 2003). Pasangan primer tersebut dirancang berdasarkan sekuen gen *ferritin2* dari kultivar padi Nipponbare. Fragmen yang dihasilkan dari hasil PCR ini diharapkan memiliki ukuran 1260 pasang basa.

Total reaksi PCR yang digunakan sebesar 50 μL. Program PCR meliputi pra-PCR pada 95°C selama 5 menit, diikuti 35 siklus yang terdiri dari tiga tahap: tahap pertama denaturasi dengan suhu 95°C selama 45 detik, tahap kedua *annealing* dengan suhu 56°C selama 45 detik, dan tahap ketiga *extension* dengan suhu 72°C selama 1 menit 30 detik. Setelah itu, pasca-PCR pada 72°C selama 10 menit.

Sekuensing dan Analisis Data

Produk PCR dari setiap genotipe atau varietas padi kemudian diurutkan nukleotidanya (*sequencing*) lalu dianalisis menggunakan program BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool nucleotide*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul *et al.* 1997) untuk mengidentifikasi apakah fragmen yang diperoleh merupakan bagian dari gen *ferritin* atau tidak. Program aplikasi ClustalW pada perangkat lunak BioEdit (*Version 7.0.0*) digunakan untuk analisis *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP). Program ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) digunakan untuk analisis kemiripan dan ketidakmiripan, dengan membuat matriks jarak dan pohon kekerabatan (dendogram).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Molekul DNA Total Padi

Setelah dilakukan proses isolasi DNA, tahapan selanjutnya yang harus dilakukan sebelum melakukan amplifikasi DNA atau memasuki tahap PCR adalah pengecekan kualitas dan kuantitas DNA. Hal ini dilakukan dengan metode elektroforesis. Elektroforesis merupakan teknik untuk memisahkan fragmen DNA berdasarkan atas ukuran (berat molekul) dan struktur fisik molekulnya. Gel yang biasa digunakan adalah agarosa. Elektroforesis gel agarosa dapat dilakukan untuk memisahkan sampel DNA dengan ukuran dari beberapa ratus hingga 20.000 pasang basa (bp). Prinsip kerja dari elektroforesis berdasarkan pergerakan partikel-partikel

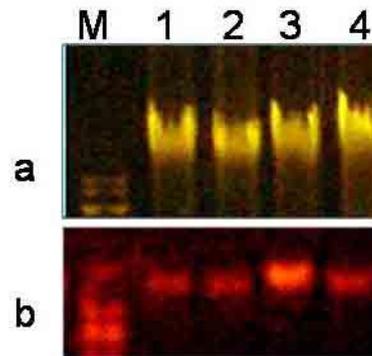
bermuatan negatif (anion), seperti DNA, akan bergerak menuju kutub positif, sedangkan partikel-partikel bermuatan positif (kation) akan bergerak menuju kutub negatif. Makin kecil ukuran molekulnya maka makin cepat laju migrasinya, karena matriks gel mengandung jaringan kompleks berupa pori-pori sehingga partikel-partikel tersebut dapat bergerak melalui matriks. Ukuran fragmen DNA dapat diperkirakan dengan membandingkan laju migrasinya dengan laju migrasi fragmen-fragmen molekul DNA standar (DNA ladder) yang telah diketahui ukurannya.

Visualisasi DNA selanjutnya dilakukan menggunakan paparan sinar ultraviolet setelah terlebih dahulu ditambahkan larutan etidium bromida pada gel dalam pembuatannya. Cara lain untuk melihat visualisasi DNA adalah gel direndam di dalam larutan etidium bromida sebelum dipaparkan di atas sinar ultraviolet. Secara kasar, visualisasi pita-pita DNA pada gel dapat digunakan untuk menaksir konsentrasi DNA total, yaitu membandingkan pita-pitanya dengan DNA ladder. Untuk lebih akuratnya dalam menentukan konsentrasi dan kemurnian DNA yang diperoleh adalah dengan menggunakan spektrofotometer UV.

Pada penelitian ini, DNA total dari keempat genotipe atau varietas padi menunjukkan hasil yang baik, yang ditandai dengan pita hasil elektroforesis yang terlihat utuh atau tidak *smear*. Tebalnya pita DNA yang terlihat menunjukkan bahwa konsentrasi DNA total padi yang diperoleh pada penelitian ini cukup tinggi, yaitu berkisar 1500-3000 ng/ μ l. Setelah diperkirakan konsentrasi DNA total padi, lalu dilakukan pengenceran sampai 100 ng/ μ l (Gambar 1). Penyamaan konsentrasi DNA total pada setiap sampel sangat penting untuk keperluan PCR.

Pengenceran DNA total menggunakan buffer TE atau buffer yang digunakan untuk melarutkan DNA pada saat akhir isolasi. Setelah masing-masing sampel DNA total padi diencerkan, dan sebelum digunakan untuk proses amplifikasi, terlebih dahulu dicek kembali kualitas dari DNA total yang telah diencerkan. Visualisasi DNA hasil pengenceran menunjukkan hasil yang berbeda dari DNA total yang sebelumnya (Gambar 1), yaitu pada DNA hasil pengenceran ukuran atau pita sudah terlihat seragam yang menandakan konsentrasi

DNA telah sama dan siap digunakan untuk proses PCR.



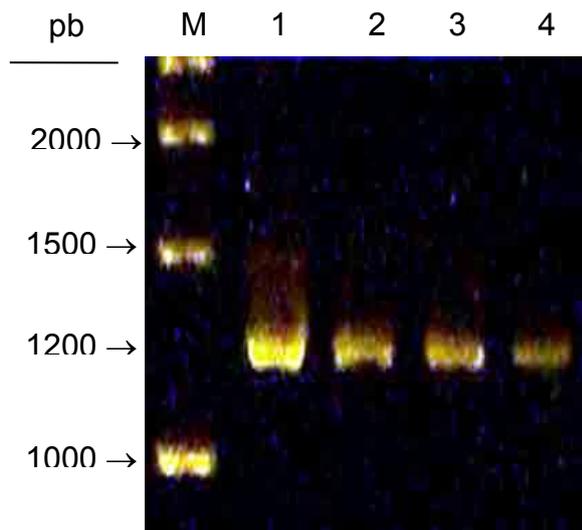
Gambar 1. Profil pita DNA total padi. Keterangan: Hasil elektroforesis DNA total padi yang belum diencerkan (a) dan yang sudah diencerkan menjadi kira-kira 100 ng/ μ l (b) (M) *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (ThermoScientific), (1) IR64, (2) Siam Sintanur, (3) Bakung, dan (4) Serei.

Fragmen DNA dari Gen *Ferritin2*

Polimerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro*. Teknik ini pertama kali dikembangkan oleh Karry Mullis pada tahun 1985. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam. Komponen-komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah DNA cetakan; sepasang primer, yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA cetakan; dNTPs (*deoxynucleotide triphosphates*); buffer PCR; magnesium klorida (MgCl₂); dan enzim DNA polimerase. Proses PCR terdiri dari beberapa tahap yaitu: (1) pra-PCR, (2) denaturasi DNA cetakan, (3) penempelan primer pada DNA cetakan (*annealing*), (4) pemanjangan primer (*extension*), dan (5) pemantapan (*postextension*). Tahap (2) sampai dengan (4) merupakan tahapan berulang (siklus), yakni pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA. Untai ganda DNA cetakan dipisahkan dengan menaikkan suhu, kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberikan waktu pada primer agar menempel pada daerah tertentu dari DNA target. Enzim DNA polimerase digunakan untuk memperpanjang primer dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan buffer yang sesuai. Umumnya

keadaan ini dilakukan antara 20-40 siklus. Jumlah target DNA yang diinginkan akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat (Newton & Graham 1994).

Amplifikasi pada keempat sampel DNA padi menghasilkan satu fragmen yang berukuran sekitar 1200 pb (Gambar 2). Hal ini menandakan bahwa proses PCR dengan menggunakan primer OsFer_F3 dan Gross_R berjalan dengan baik meskipun terdapat ketebalan pita yang berbeda. Fragmen DNA dari Serei terlihat lebih tipis dibandingkan pada IR64, Siam Sintanur, dan Bakung. Namun, tebal atau tipisnya pita tidak berpengaruh terhadap kemampuan dari masing-masing genotipe padi dalam mengekspresikan protein ferritin dikarenakan molekul yang dianalisis adalah fragmen DNA bukan mRNA. Tebal atau tipisnya pita DNA berpengaruh terhadap proses pengurutan nukleotida (*sequencing*).



Gambar 2. Fragmen DNA dari gen *ferritin2*. Keterangan: (M) *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (*ThermoScientific*), (1) IR64, (2) Siam Sintanur, (3) Bakung, dan (4) Serei.

Sekuen DNA dari Fragmen Gen *Ferritin2*

Fragmen DNA dari gen *ferritin2* pada keempat varietas atau genotipe padi yang diuji, yaitu IR64, Siam Sintanur, Bakung, dan Serei berhasil diurutkan nukleotidanya. Untuk memastikan bahwa fragmen DNA yang telah diurutkan nukleotidanya termasuk ke dalam bagian dari gen *ferritin2* maka dilakukan analisis pensejajaran menggunakan program BLASTn.

Analisis pensejajaran dengan menggunakan program BLASTn menunjukkan bahwa fragmen DNA yang diperoleh pada keempat varietas atau genotipe padi merupakan bagian dari gen *ferritin2* padi yang totalnya berukuran 3,407 pb (Tabel 1). Hasil analisis BLASTn menunjukkan bahwa sekuen yang dianalisis memiliki kemiripan dengan salah satu fragmen DNA yang terdapat di klon BAC OSJNBa0052H10 padi. Klon tersebut terletak di kromosom 12 dari kultivar padi Nipponbare. Kemiripannya ditunjukkan dengan *Max score* sebesar 100%, *Query cover* sebesar 100%, *E value* sebesar $2e-156$, dan nilai *ident* sebesar 95%.

Klon BAC OSJNBa0052H10 padi merupakan vektor klon BAC yang mengandung sekuen gen *ferritin2*. Hasil analisis juga menunjukkan kemiripan yang tinggi (nilai *ident* sebesar 100%) dengan mRNA dari gen *ferritin2* kultivar padi Japonica, namun untuk nilai *Max score*, *Query cover*, dan *E-value* memiliki nilai yang kecil. Hal ini karena sekuen nukleotida yang dianalisis pada penelitian ini merupakan DNA. Pada Tabel 1 juga ditemukan bahwa gen *ferritin2* terletak pada kromosom sebelas yang menunjukkan bahwa gen *ferritin* memiliki dua isoform, isoform 1 dan 2. Isoform 1 terletak pada kromosom 11 dan isoform 2 terletak pada kromosom 12.

Pada tabel hasil analisis BLASTn, *item* atau *record* diurutkan berdasarkan tingkat homologinya dengan sekuen yang dianalisis, dimulai dari tingkat yang paling tinggi hingga tingkat paling rendah. Parameter yang paling akurat dilihat dari *E-value*, semakin kecil *E-value* maka semakin tinggi tingkat homologinya. Secara singkat, *E-value* adalah tingkat probabilitas secara statistik suatu *record* untuk memiliki kemiripan dengan *query* yang dianalisis atau dapat juga diartikan sebagai persentase kesalahan. Parameter lain adalah *Max score* yang menunjukkan nilai kesamaan (*identik*) pasang basa dan *Ident (Max identify)* yang menunjukkan persentase keakuratan identifikasi. Semakin tinggi nilai kedua parameter ini maka semakin tinggi tingkat homologinya. Sementara itu, *asesi* merupakan nomor aksesori atau penomoran khusus bagi tiap *record*. *Query cover* menunjukkan persentase sampel yang terpakai di dalam analisis BLASTn.

Tabel 1. Kesejajaran fragmen DNA dari empat varietas padi yang diuji dengan gen *ferritin* dari padi kultivar Nipponbare

Deskripsi	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident	Asesi
<i>Oryza sativa</i> chromosome 12, BAC OSJNBa0052H10 of library OSJNBa from chromosome 12 of cultivar Nipponbare of ssp. japonica of <i>Oryza sativa</i> (rice), complete sequence	554	554	100%	2e-156	95%	BX000494.2
<i>Oryza sativa</i> Japonica Group cDNA clone:001-206-C10, full insert sequence	284	284	60%	5e-75	90%	AK106026.1
<i>Oryza sativa</i> chromosome 11, BAC OSJNBa0032J07 of library OSJNBa from chromosome 11 of cultivar Nipponbare of ssp. Japonica of <i>Oryza sativa</i> (rice), complete sequence	235	235	53%	2e-60	88%	<u>BX000501.4</u>
<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) ferritin (<i>Fer2</i>) mRNA, complete cds	118	118	18%	5e-25	100%	AF519571.1

Tabel 2. Posisi SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) pada fragmen gen *ferritin2*.

Tipe fragmen	Panjang fragmen (pb)	Panjang fragmen yang diteliti (pb)	Rentang posisi relatif fragmen (pb)	Jumlah SNP (buah)
E3	61	19	1483-1501	7
I3	99	99	1502-1600	10
E4	91	89	1601-1691	3
I4	751	58	1692-1749	9
I4		13	2430-2442	
E5	65	65	2443-2507	8
I5	126	126	2508-2633	14
E6	73	28	2634-2661	5
Jumlah =				56

Setelah dilakukan analisis pensejajaran dengan program BLASTn, selanjutnya dilakukan analisis SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) melalui pensejajaran nukleotida. Analisis SNP merupakan pola yang menunjukkan perubahan komposisi nukleotida di sekuen DNA pada satu posisi tertentu. Perubahan nukleotida dapat berupa duplikasi, insersi, dan substitusi satu nukleotida. Perubahan nukleotida di dalam sebuah

gen akan mempengaruhi proses transkripsi, translasi, dan fungsi protein yang disandikannya. Analisis pensejajaran sekuen nukleotida memperoleh 56 SNP yang terletak di daerah ekson dan intron dari keempat varietas atau genotipe padi yang dianalisis (Tabel 2). Kelima puluh enam SNP tersebut terletak di antara nukleotida ke-1485 sampai dengan 2655 (Gambar 3).

IR64 Siam Sintanu
	1485 1495 1505 1515 1545 1555
	GAGGAAATA TGAAGGACCA GGTAACCTTTA GCTCTGCTTC TGTATGCTGT ACCACTTTAA
	CGGAAACTCA TGAAGTACCA GGTA-CTTTA CCTCTGCTTC TGTAGGCTGT ACCACTATAA
IR64 Siam Sintanu
	1565 1595 1615 1625 1685 1705
	TCATGCGCCC TCTTCTTTGT GTGGAGGCGG GGTGCGGGTC TGCCGTTGTA CTTCAGCTT
	TCATGCGCCC TCTTCTTTGT GTGGAGGCGG GGTGCGGGTC TGCC-TTGTA CTTCAGCTT
IR64 Siam Sintanu
	1715 1725 1735 1745 2435 2445
	GTCCTATTAT CTCTTATGTT TTTTATTCCA TGGTATATGT GCTTGTGATT TCAGCT-ATG
	GTCCTATTAT CTCTTATGTT TTTTATTCCA TGGTATATGT GCTTGTGATT TCAGCT-ATG
IR64 Siam Sintanu
	2455 2465 2475 2545 2585 2595
	GAGTTGGCCT TGGCTCTCGA AAAGCTTGTA AATGCTGAAC AACTATTTTT GAAAAGAAAT
	GAGTTGGCCT TGGCTCTCGA AAAGCTTGTA AATGCTGAAC AACTATTTTT GAAAAGAAAT
IR64 Siam Sintanu
	2625 2635 2645 2655
	GTGTTGCCGT GAATCAACCA GGTG-CATC- AAGGTGCAA-
	GTGTTGCCGT GAATCAACCA GGTGGCATCC AAGGTGCAA-

Gambar 3. Posisi SNP pada keempat varietas padi yang diuji dan pada kultivar Nipponbare.

Ke-56 SNP tersebut belum dapat membedakan derajat ketahanan terhadap cekaman kelebihan Fe pada varietas atau genotipe padi yang diuji, karena terdapat banyak SNP antara varietas atau genotipe padi sehingga tidak terlihat secara spesifik perbedaan nukleotida antara varietas atau genotipe padi yang diuji. Misalnya pada padi yang tahan cekaman kelebihan Fe, yaitu Siam Sintanur masih terdapat banyak nukleotida yang sama dengan IR64 yang tidak toleran terhadap cekaman kelebihan Fe.

Jika sekuen nukleotida atau sekuen asam amino suatu protein dari dua organisme yang dibandingkan memiliki kemiripan, maka kedua sekuen tersebut diduga diturunkan dari sekuen nenek moyang yang sama (*common ancestor*). Analisis pensejajaran sekuen nukleotida akan menunjukkan di mana posisi sekuen yang tidak

berubah atau terkonservasi dan mana yang berubah atau bervariasi dan berkembang menjadi berbeda dari nenek moyang yang sama.

Tujuan dari analisis pensejajaran adalah mencocokkan urutan nukleotida yang homolog, yang mempunyai nenek moyang yang sama (Kemena & Notredame 2009). Hasil analisis pensejajaran dapat dimanfaatkan untuk berbagai macam aplikasi, seperti mengidentifikasi residu dengan struktur yang *analog* atau yang mempunyai fungsi yang serupa atau untuk mengkonstruksi pohon filogenetik (Blackshields *et al.* 2006; Edgar & Batzoglou 2006; Notredame 2007).

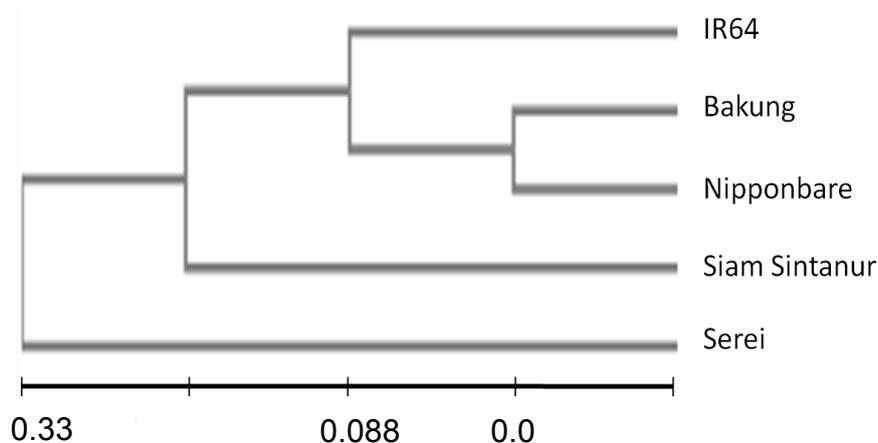
Sekuen nukleotida dari keempat genotipe atau varietas padi yang diuji dan kultivar padi Nipponbare kemudian dianalisis lebih lanjut untuk membuat matriks jarak (Tabel 3) dan matriks jarak tersebut lalu digunakan untuk membuat pohon

kekerabatan (dendrogram) (Gambar 4). Nilai pada matriks jarak menunjukkan bahwa genotipe padi Serei memiliki nilai jarak yang paling jauh dengan

kultivar padi Nipponbare, sementara Bakung memiliki jarak yang paling dekat dengan kultivar padi Nipponbare.

Tabel 3. Matriks jarak berdasarkan metode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Average*)

	IR64	Siam Sintanur	Bakung	Serei	Nipponbare
IR64	0.000				
Siam Sintanur	0.531	0.000			
Bakung	0.176	0.388	0.000		
Serei	0.750	0.625	0.667	0.000	
Nipponbare	0.176	0.380	0.000	0.653	0.000



Gambar 4. Dendrogram berdasarkan sekuen nukleotida dari gen *ferritin2* pada lima genotipe atau varietas padi.

Nipponbare merupakan kultivar padi pembanding yang tahan terhadap kelebihan Fe. Hal ini telah dibuktikan oleh Wu *et al.* (2014) yang menjelaskan bahwa Nipponbare memiliki skor bronzing daun yang lebih rendah setelah diberi cekaman kelebihan Fe selama 2 sampai 5 hari dan memiliki biomassa akar yang lebih rendah dibandingkan dengan varietas padi Kasalath. Kultivar padi Kasalath sangat sensitif terhadap cekaman kelebihan Fe, walaupun konsentrasi Fe yang diberikan sangat kecil.

Varietas padi nasional yang digunakan sebagai pembanding adalah Siam Sintanur dan IR64. Siam Sintanur cocok ditanam pada daerah dataran rendah yang banyak mengandung logam Fe, karena varietas padi ini tahan terhadap cekaman kelebihan Fe (Suprihatno *et al.* 2009). Siam Sintanur dirilis sebagai varietas padi nasional unggul oleh Balai Besar Penelitian Tanaman Padi (BBPTP) pada tahun 2001. Varietas padi IR64 termasuk yang tidak tahan terhadap cekaman

kelebihan Fe. Suryadi (2012) menjelaskan varietas padi IR64 masuk ke dalam golongan padi yang tidak tahan cekaman kelebihan Fe setelah dilakukan pengujian secara hidroponik pada tingkat cekaman 750 ppm Fe selama dua minggu di sawah KP Taman Bogo, Lampung.

Kesamaan atau ketidaksamaan sekuen nukleotida dari gen *ferritin2* dapat digunakan sebagai langkah awal untuk menentukan derajat ketahanan tanaman padi terhadap cekaman kelebihan Fe. Genotipe padi yang memiliki ketahanan terhadap cekaman kelebihan Fe akan memiliki mekanisme yang baik dalam mempertahankan keseimbangan ion Fe di dalam selnya dibandingkan dengan genotipe padi yang tidak tahan terhadap cekaman kelebihan Fe, dan ini melibatkan protein ferritin (da Silveira *et al.* 2009).

Pada penelitian ini, Bakung memiliki jarak yang paling dekat dengan Nipponbare. Kemungkinan Bakung merupakan genotipe padi

lokal dari Indragiri Hilir, Riau yang tahan terhadap cekaman kelebihan Fe. Sebaliknya, Serei kemungkinan merupakan genotipe padi yang tidak tahan terhadap cekaman kelebihan Fe karena memiliki jarak yang paling jauh dari Nipponbare. Verifikasi lebih lanjut, baik secara hidroponik maupun menanamnya di tanah yang mengandung Fe tinggi, sangat diperlukan untuk memastikannya.

Varietas padi IR64 dan Nipponbare memiliki jarak yang lebih dekat dibandingkan Siam Sintanur dan Nipponbare. Hal ini kemungkinan karena belum seluruh sekuen nukleotida gen *ferritin2* yang dianalisis. Penelitian ini baru menganalisis sekuen nukleotida dari sebagian ekson tiga sampai dengan sebagian ekson enam dan ini belum cukup untuk menggambarkan derajat ketahanan genotipe atau varietas padi terhadap cekaman kelebihan Fe. Oleh karena itu verifikasi lebih lanjut dengan menganalisis seluruh sekuen nukleotida gen *ferritin2* juga harus dilakukan.

SIMPULAN

Data penelitian diperoleh fragmen gen *ferritin2* parsial berukuran sekitar 1200 pb pada keempat varietas atau genotipe padi yang diuji. Sebanyak 56 SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) telah terdeteksi pada daerah ekson tiga sampai dengan sebagian ekson enam. Salah satu genotipe padi lokal Indragiri Hilir, yaitu Bakung kemungkinan memiliki sifat tahan terhadap cekaman kelebihan Fe. Sebaliknya, genotipe padi Serei kemungkinan tidak tahan terhadap cekaman kelebihan Fe.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh BOPTN Universitas Riau tahun anggaran 2013 atas nama Dr. Dewi Indriyani Roslim. Terima kasih kepada Bapak Sularjo, SP atas penyediaan benih padi.

DAFTAR PUSTAKA

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.

- [BPS] Badan Pusat Statistik Provinsi Riau. (2013). *Data statistik pertanian tanaman pangan (Riau dalam angka)*. Pekanbaru: Kantor Wilayah Riau.
- Blackshields G, IM Wallace, M. Larkin & D.G. Higgins. (2006). Analysis and comparison of benchmarks for multiple sequence alignment. *Silico Biol* 6:321-339.
- da Silveira VC, Fadanelli C, Sperotto RA, Stein RJ, Basso LA, Santos DS, Junior IDSV, Dias JF, Fett JP. (2009). Role of ferritin in the rice tolerance to iron overload. *Sci Agric (Piracicaba, Braz)* 66 (4):549-555.
- Edgar RC, S Batzoglou. (2006). Multiple sequence alignment. *Curr Opin Struct Biol* 6:368-373.
- Gross J, Stein RJ, Fett-Neto AG, Fett JP. (2003). Iron homeostasis related genes in rice. *Genet and Mol Biol* 26:477-497.
- Kemena C & Notredame C. (2009). Upcoming challenges for multiple sequence alignment methods in the highthroughputera. *Bioinformatics* 25:2455-2465.
- Mandal AB, Basu AK, Roy B, Sheeja TE, Roy T. (2004). Genetic management for increased tolerance to aluminium and iron toxicities in rice - A review. *Indian J Biotechnol* 3:359-368.
- Mehraban P, Zadeh AA, Sadeghipour HR. (2008). Iron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) under different potassium nutrition. *Asian J of Plant Sci* 1-9.
- Newton CR, Graham A. (1994). *PCR*. UK: Bios Scientific Publisher.
- Notredame C. (2007). Recent evolutions of multiple sequence alignment algorithms. *PLoS Comput Biol* 3:E123.
- Pellet DM, Grunes DL, Kochian LV. (1995). Organic acid exudation as an aluminum tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta*. 196:788-795.
- Rengel Z. (2000). *Mineral nutrition of crops, fundamental mechanisms and implications*. Binghamton: Food Production Press.
- Roslim DI, Miftahudin, Suharsono U, Aswidinnoor H, Hartana A. (2010). Karakter root re-growth sebagai parameter toleransi aluminium pada tanaman padi. *Jurnal Natur Indonesia* 13(1):82-88.
- Saghai-Marooof MA, Solimah KM, Jorgensen RA, Allard RW. (1984). Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci* 81:8014-8018.
- Suprihatno B, Darajat A, Satoso, Baehaki, Widiarta, Setyono A, Indrasari DS, Lesmana. (2009). *Deskripsi Varietas Padi*. Subang: Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Departemen Pertanian.
- Suryadi D. (2012). Penapisan galur-galur padi (*Oryza sativa* L.) populasi RIL F7 hasil persilangan antara

- varietas IR64 dan Hawara Bunar terhadap cekaman besi. *Tesis*. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Utama MZH, W Haryoko, R. Munir, Sunadi. (2009). Penapisan varietas padi toleran salinitas pada lahan rawa di Kabupaten Pesisir Selatan. *J Agronomi Indonesia* 37 (2):101-106.
- Wu LB, Shhadi Y, Gregorio G, Matthus E, Becker M, Frei M. 2014. Genetic and physiological analysis of tolerance to acute iron toxicity in rice. *Rice* 7:8. <http://www.thericejournal.com/content/7/1/8>
- Zhang J, Luo S. (2002). A case study on the relationship between sulfur forms and acidity in acid sulphate soils (ASS). 17th WCCS 14-21 August 2002. *Thailand.Paper* 1048:1-5.