

**ANALISIS SEKUEN INTRON 1 SAMPAI SEBAGIAN EKSON 4 DARI GEN
FERRITIN2 PADA TIGA GENOTIPE PADI (*Oryza sativa* L.) LOKAL
INDRAGIRI HILIR, RIAU**

**Analysis of Sekuen Intron 1 to Part of Ekson 4 from Gen Ferritin2 on Three
Genotypes of ocal Rice (*Oryza sativa* L.) Indragiri Hilir, Riau**

Herman, Yolla Putri Ardila, Fadel Nugraha dan Dewi Indriyani Roslim

Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Kampus Binawidya Km 12,5,
Pekanbaru 28293, Riau, Indonesia. Telp.0761 63273 Ext.106/08137895245

Email: dewiindriyani@unri.ac.id

ABSTRACT

Iron toxicity is one of the limiting factors of rice crop production in lowland area. Iron homeostasis in cell involves the role of ferritin protein. The objective of this study is to analyze portion of first intron to fourth exon sequence of local rice varieties from Indragiri Hilir, Riau Province. Plant material were three local rice genotype, namely Bakung, Siputih, and Serei, and two rice varieties consisted of IR64 (Fe toxicity-sensitive rice variety) and Siam Sintanur (Fe toxicity-tolerant rice variety). Methods include DNA isolation, PCR (Polymerase Chain Reaction), electrophoreses, and sequencing. The DNA sequence was analyzed using BLASTn and ClustalW2 programs. This research got DNA fragments of ferritin2 gene sizing of about 850 bp, 1200 bp, and 1500 bp. Sequence analysis of the 1200 bp DNA fragment showed the presence of 49 SNPs scattered portion of first intron to fourth exon. Bakung rice genotype had very close proximity to Siam Sintanur and Nipponbare compared with IR64, while Serei and Siputih rice genotypes had a great distance to Siam Sintanur and Nipponbare. The result concluded that Bakung rice genotype may be more tolerant to Fe-toxicity than Siputih and Serei.

Keywords: DNA fragment, Ferritin, *Oryza sativa*, PCR, Indragiri Hilir

ABSTRAK

Keracunan besi (Fe) merupakan salah satu faktor yang membatasi produksi tanaman padi di daerah dataran rendah dan tanah gambut bermasalah. Homeostasis ion Fe di dalam sel melibatkan protein ferritin. Penelitian ini bertujuan menganalisis sebagian dari intron satu sampai dengan ekson empat dari gen ferritin pada tiga genotipe padi lokal dari Indragiri Hilir, Provinsi Riau, Indonesia. Ketiga genotipe padi yang digunakan adalah Bakung, Siputih, dan Serei. Dua varietas padi pembandingan yang digunakan adalah IR64 (varietas padi sensitif keracunan Fe) dan Siam Sintanur (varietas padi toleran keracunan Fe). Metode penelitian meliputi isolasi DNA total tanaman padi, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), elektroforesis, dan sekuensing. Data sekuen DNA dianalisis menggunakan program BLASTn dan ClustalW2. Penelitian ini telah memperoleh fragmen DNA dari gen *ferritin2* dengan ukuran sekitar 850 pb, 1200 pb, dan 1500 pb. Analisis sekuen dari fragmen DNA yang berukuran sekitar 1200 pb pada kelima varietas padi yang diuji menunjukkan adanya 49 SNP yang tersebar dari sebagian intron satu sampai dengan sebagian ekson empat. Bakung memiliki jarak yang sangat dekat dengan Siam Sintanur dan Nipponbare dibandingkan dengan IR64. Siputih dan Serei memiliki jarak yang jauh dengan Siam Sintanur dan Nipponbare. Kemungkinan Bakung merupakan genotipe padi yang tahan terhadap keracunan Fe dibandingkan Siputih dan Serei.

Kata kunci: DNA fragment, Ferritin, *Oryza sativa*, PCR, Indragiri Hilir

PENDAHULUAN

Pertanian mempunyai arti yang sangat penting bagi kehidupan manusia. Hal itu disebabkan karena dari pertanian manusia dapat memperoleh sumber makanan penting bagi

kehidupannya, selain dari air, dan udara. Kebutuhan akan makanan semakin meningkat karena populasi manusia terus bertambah (Honggowibowo, 2007). Padi adalah komoditi tanaman pangan serelia penting karena

merupakan makanan pokok hampir setengah penduduk dunia. Sebagian besar beras berasal dari negara berkembang termasuk Indonesia. Luas panen tanaman padi mengalami sedikit penurunan sekitar 7,47%, yaitu dari 156.088 hektar menjadi 145.242 hektar selama tahun 2011. Tahun 2011 produksi beras sebesar 535.788 ton, terdiri dari 481.911 ton beras dari padi sawah dan 53.877 ton beras dari padi ladang (BPS Provinsi Riau, 2011). Sementara itu, Kabupaten Indragiri Hilir dapat menghasilkan beras sebesar 127.482.57 ton dengan kondisi tanah gambut dan rawa-rawa (Pusat Informasi Indragiri Hilir, 2013).

Penurunan produksi beras nasional salah satunya disebabkan oleh semakin berkurangnya luas areal penanaman padi. Berkurangnya luas areal penanaman padi disebabkan oleh adanya konversi tanah sawah untuk kegiatan non pertanian (Widodo *et al.*, 2004) dan oleh karenanya kegiatan pertanian terpaksa dilakukan di tanah marginal, seperti tanah gambut. Sekitar 45% dari luas daratan Provinsi Riau adalah tanah gambut (Muslim dan Kurniawan, 2008). Penanaman padi di tanah gambut menghadapi banyak kendala, antara lain tanah bersifat asam, cekaman genangan, kekeringan, dan keracunan logam berat (Fe, Al, dan Mn).

Salah satu cara untuk menanggulangi masalah keracunan besi adalah dengan menggunakan tanaman yang toleran terhadap keracunan Fe (Marschner, 1995; Utama *et al.*, 2009). Genotipe padi bervariasi dalam hal ketahanannya terhadap cekaman kelebihan Fe. Mekanisme ketahanan padi terhadap keracunan Fe meliputi mekanisme penghindaran terhadap kelebihan Fe, membatasi penyerapan Fe dan translokasi Fe ke tajuk, serta mentolerir konsentrasi Fe yang tinggi di daun. Protein yang terlibat dalam homeostasis Fe di dalam sel adalah protein feritin (da Silvera *et al.*, 2009).

Eksresi gen feritin pada padi yang tahan keracunan Fe lebih tinggi dari pada padi yang sensitif keracunan Fe (da Silvera *et al.*, 2009). Oleh karena itu, sebagai langkah awal pada penelitian ini akan dilakukan analisis sekuen DNA dari gen *feritin2* pada padi lokal dari Indragiri Hilir, Provinsi Riau, lalu membandingkannya dengan padi yang sudah

diketahui toleran keracunan Fe (Siam Sintanur) dan sensitif keracunan Fe (IR64).

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis sekuen DNA dari gen *feritin2* pada daerah sebagian intron satu sampai sebagian ekson empat pada tiga genotipe padi lokal dari Indragiri Hilir, Provinsi Riau.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Genetika, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau dari bulan Februari 2013 sampai dengan Februari 2014.

Bahan tanaman yang digunakan adalah tiga genotipe padi dari Kabupaten Indragiri Hilir, Provinsi Riau (Bakung, Siputih, dan Serei) dan dua varietas padi pembanding, yaitu IR64 (sensitif keracunan Fe) dan Siam Sintanur (toleran keracunan Fe). Primer yang digunakan adalah *Gross_F*: 5'GAA AGG GAA GGA GGT GCT CA3' dan *OsFer_R3*: 5'CGT CAC ACC CTT GAC AGA GT3' yang akan mengamplifikasi daerah terkonservasi dari isoform *feritin2* (Gross *et al.*, 2003).

Daun padi diambil sepanjang 10-15 cm lalu ditimbang sampai 1,5 gr kemudian dipotong halus, ditambahkan dengan nitrogen cair lalu digerus menggunakan mortar sampai halus. Isolasi DNA dilakukan menggunakan metode CTAB (Saghai-Marooof *et al.* 1984). Kualitas dan kuantitas DNA ditentukan menggunakan teknik elektroforesis pada 1% gel agarose dalam 1x buffer TBE (Tris-Borate-EDTA pH 8.0), tegangan 65 volt selama 30 menit.

Total reaksi PCR yang digunakan sebesar 60 μ L. Program PCR meliputi pra-PCR pada 94° C selama 5 menit, diikuti 35 siklus yang terdiri dari tiga tahap: 94° C selama 45 detik, 56° C selama 45 detik, dan 72° C selama 1 menit 30 detik. Setelah itu, pasca-PCR pada 72° C selama 10 menit. Keberhasilan PCR dideteksi menggunakan 1% gel agarose di dalam 1x buffer TBE (Tris-Borate-EDTA pH 8.0), dengan tegangan 245 volt selama 30 menit. Gel hasil elektroforesis diwarnai dengan 5 μ g/ml etidium bromida, lalu divisualisasi di atas lampu UV (*WiseUv WUV-M20, Daihan Scientific*) dan direkam/foto.

Tabel 1. Hasil Pensejajaran Fragmen DNA dari Lima Genotipe atau Varietas Padi yang Diuji.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Oryza sativa chromosome 12, . BAC OSJNBa0052H10 of library OSJNBa from chromosome 12 of cultivar Nipponbare of ssp. japonica of Oryza sativa (rice), complete sequence	760	760	100%	0.0	100%	BX000494.2
Oryza sativa chromosome 11, . BAC OSJNBa0010K05 of library OSJNBa from chromosome 11 of cultivar Nipponbare of ssp. japonica of Oryza sativa (rice), complete sequence	666	666	100%	0.0	95%	BX000497.1
Oryza sativa (japonica cultivar-group) ferritin (Fer2) mRNA, complete cds	152	326	43%	3e-35	99%	AF519571.1

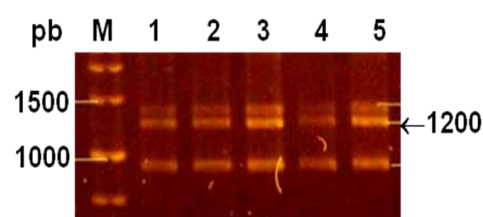
Fragmen DNA parsial dari gen *ferritin2* diurutkan nukleotidanya (*sequencing*). Urutan nukleotida kemudian dianalisis menggunakan program BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul *et al.*, 1997). Analisis SNP menggunakan program BioEdit dan pembuatan dendogram menggunakan metode UPGMA dengan program ClustalW2.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fragmen DNA Parsial dari Gen *Ferritin2*

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah salah satu teknik dalam biologi molekuler untuk memperbanyak jumlah DNA secara *in-vitro* dengan mempergunakan enzim DNA polimerase dan perubahan suhu. Teknik PCR ini memerlukan sampel DNA dengan kuantitas 100 ng/ μ l dan kualitas 1,6-2,0. Keberhasilan PCR dideteksi dengan elektroforesis pada gel agarosa. Elektroforesis adalah memisahkan atau memigrasikan fragmen DNA pada matriks berpori di bawah pengaruh medan listrik. Ukuran fragmen ditentukan dengan cara membandingkan mobilitas fragmen DNA dengan DNA *Ladder* yang telah diketahui ukurannya. Pada penelitian ini, digunakan pasangan primer Gross_F dan OsFer_R3 yang telah dirancang berdasarkan daerah dari ekson 1 sampai sebagian ekson 4 dari gen *ferritin2*. Pasangan primer tersebut dirancang berdasarkan sekuen DNA parsial dari gen *ferritin2* kultivar padi Nipponbare, dan produk PCR yang dihasilkan seharusnya berukuran 1238 pb. Akan tetapi, Produk PCR dari kelima varietas

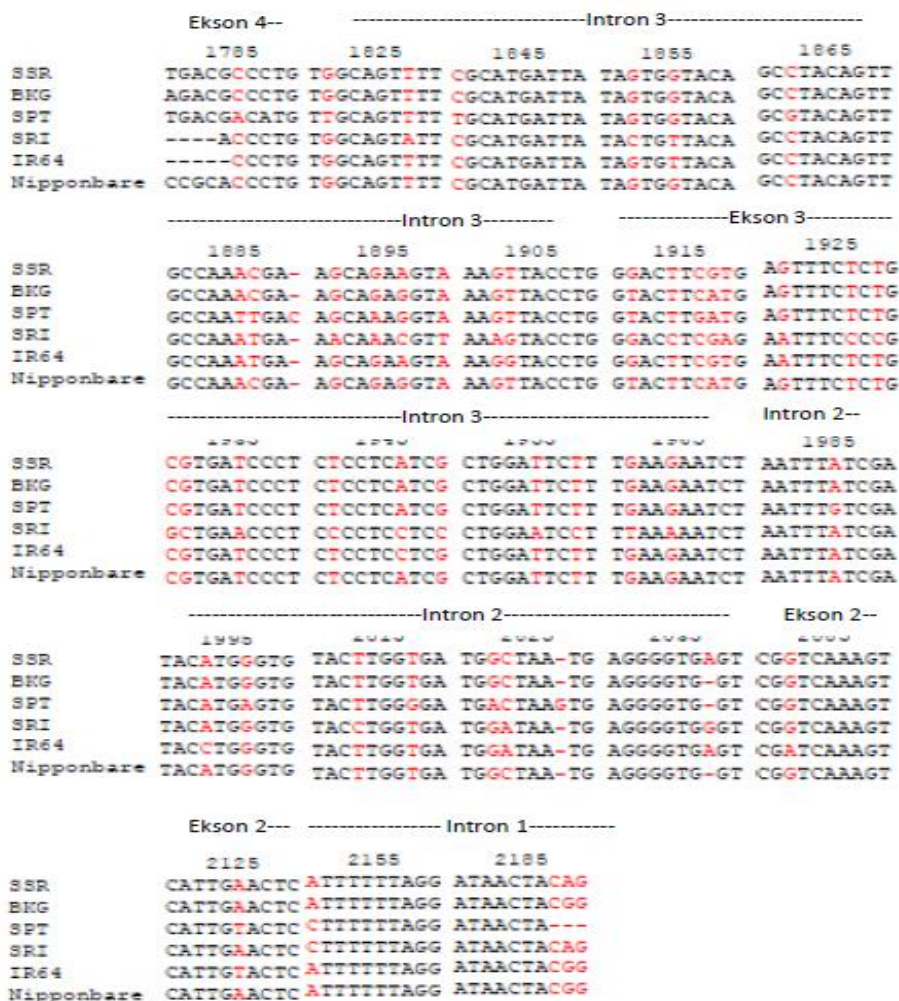
padi yang diuji memiliki fragmen berukuran sekitar 850 pb, 1200, dan 1500 pb (Gambar 1).



Gambar 1. Fragmen DNA parsial dari gen *ferritin2* pada lima genotipe atau varietas padi. Keterangan: (M) 1 kb DNA *Ladder* (*Thermo Scientific*), (1) IR64, (2) Siam Sintanur, (3) Bakung, (4) Siputih, dan (5) Serei.

Single Nucleotide Polymorphism (SNP) pada Fragmen DNA Parsial dari Gen *Ferritin2* pada Padi Lokal Indragiri Hilir.

Fragmen DNA dari kelima varietas atau genotipe padi yang berukuran sekitar 1200 pb kemudian diurutkan nukleotidanya. Urutan basa nukleotida lalu dianalisis menggunakan program pensejajaran BLASTn. Analisis pensejajaran menunjukkan bahwa fragmen DNA yang diuji merupakan bagian *gen Ferritin2* yang totalnya berukuran 3,4 kb (Tabel 1). Analisis SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) selanjutnya dilakukan pada sekuen DNA dari kelima varietas atau genotipe padi tersebut. Analisis SNP untuk menentukan perubahan nukleotida pada satu posisi tertentu. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa SNP terletak pada sebagian daerah dari intron satu sampai



Keterangan: SSR= Siam Sintanur, BKG= Bakung, SP = Siputih, SRI= Serei.

Gambar 2. Posisi SNP pada Kelima Varietas Padi yang Diuji.

sebagian daerah dari ekson empat (Gambar 2) dan jumlah SNP yang terdeteksi adalah 49 (Tabel 2).

Keempat puluh sembilan SNP selanjutnya digunakan untuk membuat matriks jarak (Tabel

3) dan dendogram (Gambar 3) antara varietas padi yang diuji dengan sekuen gen *ferritin2* yang terdapat pada kultivar padi Nipponbare.

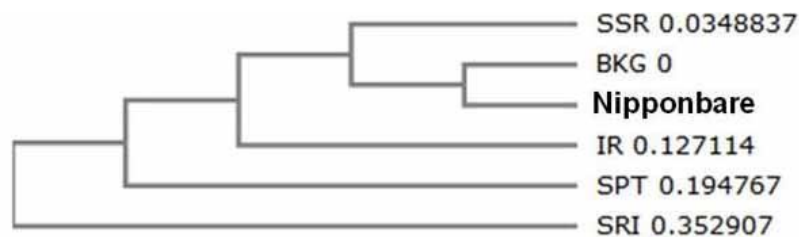
Dendogram menunjukkan bahwa varietas padi Siam Sintanur dan genotipe padi Bakung

Tabel 2. Posisi SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) pada Sekuen DNA Parsial dari Gen *ferritin2* pada Kultivar Padi Nipponbare.

Tipe fragmen	Rentang posisi relatif fragmen (pb)	Panjang fragmen (pb)	Panjang fragmen yang diteliti (pb)	Jml SNP (buah)
I1	1218-1276	706	86	5
E2	1277-1360	84	84	2
I2	1361-1440	80	80	12
E3	1441-1501	61	61	19
I3	1502-1600	99	99	10
E4	1601-1627	91	27	1
Jumlah				49

Tabel 3. Matriks Jarak Genetik Berdasarkan Metode UPGMA Antara Kelima Genotipe Atau Varietas Padi yang Diuji dengan Kultivar Padi Nipponbare.

	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)
Siam Sintanur (A)	0.000					
Bakung (B)	0.070	0.000				
Siputih (C)	0.395	0.326	0.000			
Serei (D)	0.659	0.698	0.884	0.000		
IR64 (E)	0.205	0.279	0.512	0.591	0.000	
Nipponbare (F)	0.070	0.000	0.326	0.698	0.279	0.000



Gambar 3. Dendrogram Lima Genotipe atau Varietas Padi yang Diuji dengan Kultivar Padi Nipponbare.

memiliki jarak yang sangat dekat dengan kultivar padi Nipponbare dibandingkan tiga varietas atau genotipe padi lainnya. Kemungkinan genotipe padi Bakung toleran keracunan Fe. Dua genotipe padi Indragiri Hilir lainnya, yaitu Siputih dan Serei, memiliki jarak yang sangat dekat dengan IR64 dibandingkan dengan varietas padi Siam Sintanur yang merupakan varietas padi yang sensitif keracunan Fe. Kemungkinan genotipe padi Siputih dan Serei tidak tahan terhadap keracunan Fe.

Menurut Suprihatno *et al.* (2009) varietas padi Siam Sintanur baik ditanam pada daerah dataran rendah yang banyak mengandung logam Fe, karena varietas padi ini toleran terhadap cekaman kelebihan atau keracunan Fe. Varietas padi Siam Sintanur merupakan padi yang dilepas pada tahun 2001 oleh BBPTP. Varietas padi IR64 merupakan padi yang sensitif keracunan Fe. Suryadi (2012) menjelaskan bahwa pada metode penapisan secara hidroponik pada tingkat cekaman 750 ppm Fe selama dua minggu di sawah (di Kebun Percobaan Taman Bogo, Lampung) menunjukkan bahwa varietas padi IR64 tergolong varietas padi yang sensitif keracunan Fe.

KESIMPULAN

Penelitian ini telah memperoleh fragmen DNA dari gen *ferritin2* dengan ukuran sekitar 850 pb, 1200 pb, dan 1500 pb. Analisis sekuen dari fragmen DNA yang berukuran sekitar 1200 pb pada kelima varietas padi yang diuji menunjukkan adanya 49 SNP yang tersebar dari sebagian intron satu sampai dengan sebagian ekson empat. Bakung memiliki jarak yang sangat dekat dengan Siam Sintanur dan Nipponbare dibandingkan dengan IR64. Siputih dan Serei memiliki jarak yang jauh dengan Siam Sintanur dan Nipponbare. Kemungkinan Bakung merupakan genotipe padi yang tahan terhadap keracunan Fe dibandingkan Siputih dan Serei.

DAFTAR PUSTAKA

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- BPS Provinsi Riau. 2011. Data Statistik Pertanian Tanaman Pangan Provinsi Riau. Pekanbaru.
- da Silveira V. C., C. Fadanelli, R. A. Sperotto, R. J. Stein, L. A. Basso, D. S. Santos, I.

- D. S. V. Junior, J. F Dias, and J. P. Fett. 2009. Role of Ferritin in the Rice Tolerance to Iron Overload. *Sci Agric (Piracicaba, Braz)*, 66(4):549-555.
- Gross, J., R. J. Stein, A. G. Fett-Neto, and J. P. Fett. 2003. Iron Homeostasis Related Genes in Rice. *Genet and Mol Biol*, 26:477-497.
- Honggowibowo, A. S. 2009. Sistem Pakar Diagnosa Penyakit Tanaman Padi Berbasis Web dengan Forward dan Backward Chaining. *Telmonika*. 7(3):187-194.
- Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Second edition. Academic Press Inc., Sandiego.
- Muslim dan S. Kurniawan. 2008. Fakta Hutan dan Kebakaran: 2002-2007. Jaringan Kerja Penyelamat Hutan Riau. Pekanbaru.
- Pusat Informasi Indragiri Hilir. 2013. *Online* pada: <http://infoinhil.com/html/>., Diakses Tanggal 13 Oktober 2013.
- Saghai-Marooif, M. A, K. M. Solimah, R. A. Jorgensen, and R. W Allard. 1984. Ribosomal DNA Spacer Length Polymorphism in Barley: Mendelian Inheritance, Chromosomal Location and Population Dynamics. *Proc Natl Acad Sci*, 81:8014-8018.
- Suprihatno, B., A. Daradjat, Satoto, Baehaki, Widiarta, A. Setyono dan D. S. Indrasari, Lesmana. 2009. Deskripsi Varietas Padi. Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Departemen Pertanian, Subang.
- 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 Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor (tidak dipublikasi).
- Utama. M. Z. H., W. Haryoko, R. Munir, dan Sunadi. 2009. Penapisan Varietas Padi Toleran Salinitas pada Lahan Rawa di Kab. Pesisir Selatan. *Jurnal Agronomi Indonesia*, 37(2):101-106.
- Widodo, M. Chozin, dan Mahmudin. 2004. Hubungan Pertumbuhan dan Hasil Beberapa Kultivar Padi Lokal Pada Tanah Gambut dengan Pemberian Dolomit. *Jurnal Ilmu-ilmu Pertanian Indonesia*, 6(2):75-82.