

Sekuen Gen Ferritin Parsial pada Varietas Padi dari Provinsi Riau Terkait Homeostasis Fe pada Lahan Rawa Pasang Surut

Partial Ferritin Gene Sequence of Riau Rice Variety Related to Iron Homeostasis on Tidal Wetlands

Dewi Indriyani Roslim^{1*}, Herman¹, Fadel Nugraha¹, Yolla Putri Ardila¹, Ninik Nihayatul Wahibah¹

¹ Jurusan Biologi FMIPA Universitas Riau, Kampus Binawidya Km 12.5, Jl. HR Soebrantas, Panam, Pekanbaru 28293, Riau

^{*}Penulis untuk korespondensi: Tel./Faks. +6276163273/+6276163273
email: zahra_iin@yahoo.com

ABSTRACT

Iron is an essential micronutrient for plant growth and productivity. However, excess Fe is toxic, causing multiple damage to cellular structures. Commonly, tidal wetlands rice variety relative tolerance to waterlogged conditions and excess Fe. Mechanism of plants to tolerate the excess Fe is related to the action of ferritin protein. The objective of this study was to compare partial ferritin gene sequence between riau rice variety with national tidal wetlands rice variety, Siam Sintanur. This research was conducted through DNA extraction with CTAB method, amplification using forward primer OsFer_E5 and reverse primer OsFer_E8, sequencing, sequence analysis using BLAST and ClustalW program. There was a SNP (*single nucleotide polymorphism*) of partial ferritin gene sequence at base-114. IR64 and Siam Sintanur had base-Adenin while Bakung, Siputih, and Serei had base-Citosin at that position. Further investigations need to be done.

Keywords: ferritin gene sequence, iron, rice, tidal wetlands

ABSTRAK

Besi (Fe) merupakan unsur hara mikro esensial yang dibutuhkan tanaman dalam jumlah sedikit. Namun ion Fe akan bersifat meracuni tanaman jika berada dalam konsentrasi berlebih di dalam jaringan tanaman. Umumnya tanaman padi pada lahan rawa pasang surut tahan genangan air dan tahan cekaman kelebihan Fe di tanah. Mekanisme toleransi tanaman terhadap cekaman kelebihan ion Fe tersebut melibatkan protein ferritin. Penelitian ini bertujuan membandingkan perbedaan sekuen gen ferritin parsial antara beberapa genotipe padi lokal Riau dengan varietas padi rawa pasang surut unggul tahan cekaman kelebihan Fe, yaitu Siam Sintanur. Metode penelitian meliputi isolasi DNA dari daun segar tanaman padi menggunakan metode CTAB dan amplifikasi DNA menggunakan primer *forward* OsFer_E5 dan *reverse* OsFer_E8. Program PCR meliputi pra-PCR pada 95°C selama 5 menit, diikuti 35 siklus yang terdiri dari tiga tahap: 95°C selama 30 detik, 56°C selama 30 detik, dan 72°C selama 45 detik. Setelah itu, pasca-PCR pada 72°C selama 10 menit. Produk PCR kemudian disequensing dan disejajarkan. Hasil pensejajaran menunjukkan terdapat satu SNP (*single nucleotide polymorphism*) pada sekuen gen ferritin parsial yang dibandingkan. Varietas padi IR64 dan Siam Sintanur memiliki basa Adenin, sedangkan varietas padi Bakung, Siputih, dan Serei memiliki basa Citosin pada basa ke-114 tersebut.

Kata kunci: gen ferritin, ion Fe, padi, rawa pasang surut

PENDAHULUAN

Ion Fe merupakan unsur hara mikro esensial yang dibutuhkan tanaman dalam jumlah sedikit. Namun Fe akan bersifat meracuni tanaman jika berada dalam konsentrasi berlebih di dalam jaringan tanaman (Guerinot & Yi 1994). Kelebihan penyerapan dan translokasi Fe pada tanaman padi sangat mempengaruhi keseimbangan kation dan anion, mendegradasi klorofil sehingga terjadi *bronzing*, mengganggu penyerapan nutrisi dan tanaman mengalami defisiensi unsur hara seperti P, K, Ca, Mg, dan Zn (Mandal *et al.* 2000). Beberapa genotipe atau varietas padi menunjukkan derajat toleransi yang berbeda-beda terhadap keracunan ion Fe. Padi dataran rendah umumnya lebih toleran terhadap cekaman kelebihan ion Fe dibandingkan padi dataran tinggi (Mandal *et al.* 2004; da Silveira *et al.* 2009). Mekanisme toleransi tanaman selanjutnya sangat dipengaruhi oleh umur tanaman, status nutrisi tanaman, dan lingkungan kimia akar (Mandal *et al.* 2004).

Pada tingkat molekuler, mekanisme toleransi tanaman terhadap cekaman kelebihan ion Fe tersebut salah satunya melibatkan protein ferritin. Protein ferritin berperan penting dalam mempertahankan keseimbangan ion Fe di dalam jaringan tanaman. Protein ferritin merupakan protein multimerik berbentuk bola yang mampu menampung 4500 atom Fe dalam bentuk yang tersedia bagi tanaman tetapi tidak toksik (Briat *et al.* 2006), dan banyak terdapat di palstid serta mitokondria (Zancani *et al.* 2007). Analisis sekuen gen ferritin telah dilakukan pada tanaman *Arabidopsis thaliana* dan *Zea mays* (Petit *et al.* 2001).

Pada tanaman padi, aksi protein ferritin dalam menjaga keseimbangan ion Fe di dalam sel bergantung pada genotipe atau varietas. Genotipe atau varietas padi yang tahan cekaman kelebihan Fe akan mengeskpresikan protein ferritin dalam jumlah lebih banyak dibandingkan genotipe atau varietas padi yang tidak tahan cekaman kelebihan Fe (Mandal *et al.* 2004; da Silveira *et al.* 2009). Dua gen ferritin telah diidentifikasi pada tanaman padi spesies *Oryza glaberrima*, yaitu *OsFer1* dan *OsFer2* (Gross *et al.* 2003). Peran penting ferritin dalam mekanisme toleransi tanaman padi terhadap cekaman kelebihan Fe telah dibuktikan pada penelitian yang dilakukan da Silveira *et al.* (2009) menggunakan varietas padi yang tahan (EPAGRI) dan tidak tahan cekaman kelebihan Fe (BR-IRGA 409). Gen *OSFer1* dan *OsFer2* memiliki kemiripan dengan gen ferritin dari jagung berurut-turut sebesar 82% dan 81%. Gen *OsFer1* terletak pada kromosom 11 dan memiliki panjang sekuen penyandi sebesar 756 pb, sedangkan gen *OsFer2* terletak pada kromosom 12 dan panjang sekuen penyandi sebesar 768 pb (Gross *et al.* 2003).

Perbedaan derajat ketahanan antara genotipe atau varietas padi yang tahan dan tidak tahan terhadap cekaman kelebihan Fe dapat dideteksi secara molekuler dengan menganalisis sekuen nukleotida gen ferritin dan ekspresi gen penyandi protein ferritin. Analisis sekuen gen ferritin pada beberapa genotipe padi lokal Riau belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan membandingkan perbedaan sekuen gen ferritin parsial antara beberapa genotipe padi lokal Riau dengan varietas padi rawa pasang surut unggul tahan cekaman kelebihan Fe, yaitu Siam Sintanur, dan padi unggul tidak tahan cekaman kelebihan Fe (IR64).

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman. Penelitian dilakukan di rumah kaca dan laboratorium Genetika Jurusan Biologi FMIPA Universitas Riau. Bahan tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah tiga genotipe padi lokal Riau yang telah dieksplorasi dari Indragiri Hilir, yaitu Bakung, Siputih, dan Serei (Wahibah *et al.* 2012). Varietas pembanding yang digunakan

adalah varietas padi Siam Sintanur sebagai varietas padi yang tahan cekaman kelebihan Fe dan IR64 sebagai varietas padi yang tidak tahan cekaman kelebihan Fe. Kedua varietas diperoleh dari Balai Besar Penelitian Tanaman Padi Kebun Percobaan Tanaman Padi Muara, Bogor, Jawa Barat.

Metode penelitian yang dilakukan meliputi: sterilisasi biji padi, menanam padi, isolasi DNA total padi, PCR (*polymerase chain reaction*), elektroforesis, sekuensing, dan analisis sekuen.

Sterilisasi Biji Padi. Biji padi yang akan dikecambahkan terlebih dahulu disterilisasi permukaan mengikuti prosedur seperti yang dilakukan oleh Roslim *et al.* (2010). Benih padi yang sudah disterilisasi selanjutnya dipilih 10 kecambah per genotipe atau varietas padi untuk ditanam.

Isolasi DNA Total. Isolasi DNA total dilakukan empat minggu setelah tanam atau setelah tanaman menghasilkan minimal 4 helai daun. Prosedur isolasi DNA menggunakan metode CTAB (Saghai-Marooof *et al.* 1984). Kualitas dan kuantitas DNA diukur menggunakan spektrofotometer dan 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.

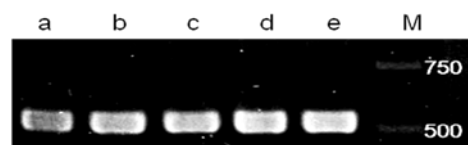
Polymerase Chain Reaction (PCR). PCR dilakukan menggunakan sepasang primer, yaitu forward 5’ AAC AGG TGG CAT CAA GGT 3’ dan reverse 5’ GGT TGG TTC ATT CAC TCC 3’ yang akan mengamplifikasi daerah terkonservasi dari isoform ferritin (Gross *et al.* 2003) pada ekson 5 dan ekson 8. Total reaksi PCR yang digunakan sebesar 50 μL. Program PCR meliputi pra-PCR pada 95°C selama 5 menit, diikuti 35 siklus yang terdiri dari tiga tahap: 95°C selama 30 detik, 56°C selama 30 detik, dan 72°C selama 45 detik. Setelah itu, pasca-PCR pada 72°C selama 10 menit.

Hasil amplifikasi lalu dimigrasikan pada 1,2 % gel agarose dalam 1x buffer TBE, pada 65 volt selama 1 jam. Gel hasil elektroforesis diwarnai dengan 5 μg/ml etidium bromida, visualisasi di atas lampu UV (*WiseUv WUV-M20, Daihan Scientific*), dan direkam/foto.

Sekuensing dan Analisis Data. Hasil PCR dari setiap genotipe atau varietas padi kemudian diurutkan nukleotidanya (*sequencing*) lalu dianalisis urutan nukleotidanya menggunakan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul *et al.* 1997) dan ClustalW menggunakan perangkat lunak BioEdit.

HASIL

Produk PCR. Proses amplifikasi pada DNA dari kelima genotipe atau varietas padi yang diuji menghasilkan fragmen DNA berukuran 505 pb (Gambar 1).



Gambar 1. Fragmen gen ferritin parsial pada lima varietas padi (a-e). Keterangan: (a) IR64, (b) Siam Sintanur, (c) Bakung, (d) Siputih, (e) Serei, dan (M) 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

Sekuen Gen Ferritin Parsial. Analisis pensejajaran menggunakan program BLAST menunjukkan bahwa fragmen DNA yang diperoleh merupakan bagian dari gen ferritin padi yang totalnya berukuran 3,4 kb (Tabel 1). Analisis pensejajaran menggunakan program ClustalW terhadap fragmen OsFer parsial tersebut mendapatkan satu SNP (*single nucleotide polymorphism*) pada basa ke-114. Varietas padi IR64 dan Siam Sintanur memiliki basa Adenin, sedangkan varietas padi Bakung, Siputih, dan Serei memiliki basa Cytosin pada posisi basa ke-114 tersebut (Gambar 2).

Tabel 1. Kesejajaran fragmen DNA dari lima varietas padi yang diuji dengan gen ferritin padi.

Deskripsi	Total skor	E-value	Max identity	Aseki
Oryza sativa chromosome 11. BAC OSJNBa0032J07 of library OSJNBa from chromosome 11 of cultivar Nipponbare of ssp. japonica of Oryza sativa (rice), complete sequence	922	0,0	100%	BX000501.4
Oryza sativa chromosome 11. BAC OSJNBa0010K05 of library OSJNBa from chromosome 11 of cultivar Nipponbare of ssp. japonica of Oryza sativa (rice), complete sequence	922	0,0	100%	BX000497.1
Oryza sativa chromosome 12. BAC OSJNBa0052H10 of library OSJNBa from chromosome 12 of cultivar Nipponbare of ssp. japonica of Oryza sativa (rice), complete sequence	890	0,0	99%	BX000494.2
Oryza sativa Japonica Group Os11g0106700 (Os11g0106700) mRNA, partial cds	541	8e-82	100%	NM_001189374.1
Oryza sativa (japonica cultivar-group) ferritin (Fer1) mRNA, complete cds	541	8e-82	100%	AF519570.1
Oryza sativa Japonica Group Os12g0106000 (Os12g0106000) mRNA, complete cds	530	3e-80	100%	NM_001072468.1
Oryza sativa (japonica cultivar-group) ferritin (Fer2) mRNA, complete cds	535	3e-80	100%	AF519571.1

	65	75	85	95	105	115
Siam Sintanur	AGCTGCATGA	TCCCATGGAT	GGAAGAAACG	AAACCTACTA	CTGCCCTTCA	CACAGTCTCC
Bakung	AGCTGCATGA	TCCCATGGAT	GGAAGAAACG	AAACCTACTA	CTGCCCTTCA	CACCGTCTCC
Siputih	AGCTGCATGA	TCCCATGGAT	GGAAGAAACG	AAACCTACTA	CTGCCCTTCA	CACCGTCTCC
Serei	AGCTGCATGA	TCCCATGGAT	GGAAGAAACG	AAACCTACTA	CTGCCCTTCA	CACCGTCTCC
IR64	AGCTGCATGA	TCCCATGGAT	GGAAGAAACG	AAACCTACTA	CTGCCCTTCA	CACAGTCTCC

Gambar 2. Posisi SNP pada kelima varietas padi yang diuji.

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini telah diperoleh fragmen gen ferritin parsial dari lima genotipe atau varietas padi yang diuji, yaitu varietas padi yang tahan cekaman kelebihan Fe (Siam Sintanur), tidak tahan cekaman kelebihan Fe (IR64), dan tiga genotipe padi lokal Riau (Bakung, Siputih, dan Serei). Urutan nukleotida dari fragmen tersebut memiliki kesamaan 100% dengan gen ferritin padi.

Genotipe padi yang tahan cekaman kelebihan Fe tentunya memiliki mekanisme yang baik dalam mempertahankan keseimbangan ion Fe di dalam jaringannya dibandingkan genotipe padi yang tidak tahan kelebihan Fe (da Silveira *et al.* 2009). Perbedaan derajat ketahanan kedua genotipe padi tersebut pada tingkat molekuler salah satunya dapat dideteksi dengan menganalisis sekuen dari gen penyandi protein ferritin. Pada penelitian ini dijumpai satu SNP pada sekuen dari gen penyandi protein ferritin, yaitu pada posisi basa ke-114. Akan tetapi SNP tersebut belum dapat membedakan derajat ketahanan terhadap cekaman kelebihan Fe pada varietas atau genotipe padi yang diuji, karena varietas padi yang tahan cekaman kelebihan Fe, yaitu Siam Sintanur, dan varietas padi yang tidak tahan cekaman kelebihan Fe, yakni IR64, memiliki basa yang sama (Adenin) pada posisi SNP tersebut. Genotipe padi lokal Riau, yakni Bakung, Siputih, dan Serei memiliki basa Cytosin pada posisi SNP tersebut.

Analisis SNP penting untuk mendapatkan penanda molekuler yang dapat digunakan untuk *marker assisted selection* (MAS) (Arus & Moreno-Gonzalez 1993). Seleksi tanaman dapat dipercepat jika penanda molekuler untuk MAS sudah ditemukan dan sekali penanda molekuler untuk MAS telah teridentifikasi maka akan sangat membantu untuk program pemuliaan tanaman (Collard & Mackill 2008).

Penelitian selanjutnya masih perlu dilakukan untuk mendapatkan sekuen utuh dari gen ferritin, sehingga dapat diidentifikasi tipe gen ferritin yang diperoleh pada penelitian ini, apakah tipe ferritin 1 (OsFer1) atau ferritin 2 (OsFer2), dan juga kemungkinan SNP lainnya yang dapat membedakan antara genotipe padi yang tahan dan tidak tahan cekaman kelebihan Fe. Selain itu, analisis fisiologi terkait ketahanan tanaman padi yang diuji terhadap cekaman kelebihan Fe dan analisis ekspresi dari gen penyandi protein ferritin pada tingkat RNA juga sangat diperlukan sehingga mekanisme toleransi tanaman padi terhadap cekaman kelebihan Fe dapat diungkap.

Pencarian genotipe padi yang telah beradaptasi dengan baik pada lahan rawa pasang surut dengan kandungan Fe yang meracuni tanaman, sangat berguna bagi petani pada lahan rawa pasang surut itu sendiri dan juga lahan gambut ‘bermasalah’ yang kini banyak dijumpai di Provinsi Riau, serta untuk mengatur strategi merakit varietas padi unggul yang berproduksi tinggi dan tahan cekaman kelebihan Fe. Lahan gambut ‘bermasalah’ merupakan tanah gambut yang telah berubah akibat kebakaran atau dibakar, telah diolah kemudian diterlantarkan, dan pembuatan drainase yang dalam dan kemudian diterlantarkan. Kandungan pirit atau Fe yang banyak terdapat di lapisan tanah mineral di bawah lapisan gambut ‘bermasalah’ terangkat ke atas sehingga konsentrasinya untuk terserap oleh tanaman semakin meningkat (Agus & Subiksa 2008).

KESIMPULAN

Penelitian telah mendapatkan fragmen gen ferritin parsial berukuran 505 pb pada kelima varietas padi yang diuji. Terdapat satu SNP (*single nucleotide polymorphism*) pada basa ke-114. Varietas padi IR64 dan Siam Sintanur memiliki basa Adenin, sedangkan

varietas padi Bakung, Siputih, dan Serei memiliki basa Cytosin pada posisi basa ke-114 tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian didanai oleh BOPTN Universitas Riau tahun anggaran 2013. Terima kasih kepada Bapak Sularjo, SP atas penyediaan benih padi.

DAFTAR PUSTAKA

- Agus F, Subiksa IGM. 2008. *Lahan Gambut: Potensi untuk Pertanian dan Aspek Lingkungan*. Bogor: Balai Penelitian Tanah dan World Agroforestry Centre (ICRAF).
- 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.
- Arus P, Moreno-Gonzalez. 1993. Marker assisted selection. Di dalam: *Plant Breeding*. London:Chapman & Hall
- Briat JF, Cellier F, Gaymard F. 2006. Ferritins and iron accumulation in plant tissues. In Barton LL, Abadia J (ed.), *Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganismes*. New York: Springer.
- Collard BCY, Mackill DJ. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil Trans R Soc B* 363:557–572. doi:10.1098/rstb.2007.2170.
- 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.
- Gross J, Stein RJ, Fett-Neto AG, Fett JP. 2003. Iron homeostasis related genes in rice. *Genet and Mol Biol* 26:477-497.
- Guerinot ML, Yi Y. 1994. Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol* 104:815-820.
- Mandal AB & Roy B. 2000. Development of Fe tolerant rice somaclones through in vitro screening. In *4th Intl Rice Genet Symp*. Philippines: IRRI.
- 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.
- Petit JM, van Wuytswinkel O, Briat JF, Lobréaux S. 2001. Characterization of an iron-dependent regulatory sequence involved in the transcriptional control of *AtFer1* and *ZmFer1* plant ferritin genes by iron. *J Biol Chem* 276:5584-5590.
- Roslim DI, Miftahudin, Suharsono U, Aswidinnoor H, Hartana A. 2010. Karakter root growth sebagai parameter toleransi aluminium pada tanaman padi. *Jurnal Natur Indonesia* 13(1):82-88.
- Saghai-Maroo 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.
- Wahibah NN, Herman, Roslim DI. 2012. Evaluasi karakter fenotipik dan upaya pengembangan tanaman padi lokal melalui persilangan dan mutasi buatan. Laporan Penelitian Berbasis Laboratorium Genetika.

Prosiding Seminar Nasional Lahan Suboptimal “Intensifikasi Pengelolaan Lahan Suboptimal dalam Rangka Mendukung Kemandirian Pangan Nasional”, Palembang 20-21 September 2013
ISBN 979-587-501-9

Zancani M, Peresson C, Patui S, Tubaro F, Vianello A, Macri F. 2007. Mitochondrial ferritin distribution among plant organs and its involvement in ascorbate-mediated iron uptake and release. *Plant Sci* 173:182-189.