

**EKSPRESI GEN *Dehydroascorbate Reductase (DHAR)* AKAR BEBERAPA
VARIETAS PADI (*Oryza sativa* L.) YANG MENDAPAT PERLAKUAN
SIMULASI KEKERINGAN MENGGUNAKAN PEG**



**ISNA ARYUNITA PUTRI
NIM.19032017/2019**

**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2023**

**EKSPRESI GEN *Dehydroascorbate Reductase (DHAR)* AKAR BEBERAPA
VARIETAS PADI (*Oryza sativa* L.) YANG MENDAPAT PERLAKUAN
SIMULASI KEKERINGAN MENGGUNAKAN PEG**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu persyaratan memperoleh gelar Sarjana Sains



**Oleh:
ISNA ARYUNITA PUTRI
NIM.19032017/2019**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2023**

PERSETUJUAN SKRIPSI

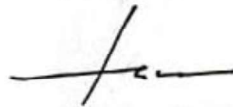
EKSPRESI GEN *Dehydroascorbate Reductase (DHAR)* AKAR BEBERAPA VARIETAS PADI (*Oryza sativa L.*) YANG MENDAPAT PERLAKUAN SIMULASI KEKERINGAN MENGUNAKAN PEG

Nama : Isna Aryunita Putri
NIM : 19032017
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, Mei 2023

Mengetahui:
Ketua Departemen Biologi

Disetujui Oleh:
Pembimbing



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si, M.Biomed
NIP. 19750815 200604 2 001



Dr. Violita, S.Si., M.Si
NIP. 19810704 200801 2 022

PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI

Nama : Isna Aryunita Putri
NIM : 19032017
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

**EKSPRESI GEN *Dehydroascorbate Reductase (DHAR)*
AKAR BEBERAPA VARIETAS PADI (*Oryza sativa L.*) YANG
MENDAPAT PERLAKUAN SIMULASI KEKERINGAN
MENGUNAKAN PEG**

*Dinyatakan lulus setelah dipertahankan di depan Tim Penguji Skripsi
Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Padang*

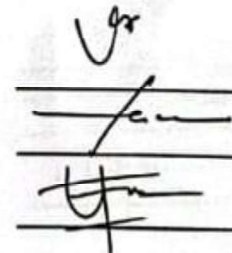
Padang, 2 Mei 2023

Tim Penguji

Tanda tangan

Nama

Ketua : Dr. Violita, S.Si., M.Si
Anggota : Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M. Biomed
Anggota : Afifatul Achyar, S.Si., M, Si



The image shows three handwritten signatures, each written over a horizontal line. The first signature is a stylized 'V' with a flourish. The second signature is a cursive 'D' followed by 'H' and 'P'. The third signature is a cursive 'A' followed by 'A' and 'S'.

SURAT PERNYATAAN TIDAK PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Isna Aryunita Putri

NIM : 19032017

Program Studi : Biologi

Departemen : Biologi

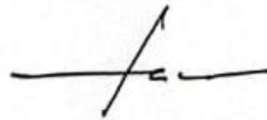
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan bahwa, skripsi saya dengan judul “Ekspresi Gen *Dehydroascorbate Reductase (DHAR)* Akar Beberapa Varietas Padi (*Oryza sativa* L.) yang Mendapat Perlakuan Simulasi Kekeringan Menggunakan PEG” adalah benar hasil karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat orang lain.

Demikianlah pernyataan ini saya buat dengan penuh kesadaran dan rasa tanggung jawab sebagai anggota masyarakat ilmiah.

Padang, 2 Mei 2023

Mengetahui:
Kepala Departemen Biologi



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si, M.Biomed
NIP. 19750815 200604 2 001

Saya yang menyatakan



Isna Aryunita Putri
NIM.19032017

**EKSPRESI GEN *Dehydroascorbate Reductase (DHAR)* AKAR BEBERAPA
VARIETAS PADI (*Oryza sativa* L.) YANG MENDAPAT PERLAKUAN
SIMULASI KEKERINGAN MENGGUNAKAN PEG**

Isna Aryunita Putri

ABSTRAK

Padi merupakan salah satu tanaman yang paling banyak ditanam di Indonesia yang dikonsumsi sebagai sumber karbohidrat. Salah satu permasalahan utama yang menjadi kendala dalam pengelolaan lahan pertanian adalah ketersediaan air yang sangat sedikit serta fluktuasi kadar air tanah yang besar. Kekurangan air tersebut akan menyebabkan cekaman kekeringan pada tanaman. Salah satu respon tanaman mengatasi hal tersebut yaitu dengan membentuk enzim antioksidan. Salah satu enzim antioksidan yang berperan dalam mengatasi radikal bebas adalah *Dehydroascorbate reductase (DHAR)* yang dapat mempertahankan tanaman dari cekaman kekeringan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sekuen primer spesifik dan suhu annealing optimum untuk amplifikasi gen DHAR dan untuk mengetahui tingkat ekspresi gen DHAR pada akar beberapa varietas padi yang mendapat perlakuan simulasi kekeringan menggunakan PEG.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan mengamati ekspresi gen *Dehydroascorbate Reductase (DHAR)* pada 3 varietas padi (toleran, moderat, sensitif). Metode ini memerlukan primer *forward* dan *reverse* yang spesifik terhadap gen target untuk amplifikasi gen. Primer tersebut didesain dengan menggunakan Primer Quest kemudian dianalisis dengan menggunakan Geneious Prime. Optimasi suhu annealing dilakukan dengan metode gradient PCR. Ekspresi gen dianalisis dengan membandingkan nilai ekspresi gen kontrol dan perlakuan.

Hasil desain primer dengan kriteria terbaik yaitu primer *Forward* DHAR 5'- GTACCCAACCCCGTCTCTTG -3' dan *Reverse* DHAR 5'- TGGTAGAGCTTTGGTGCCAG -3' dengan ukuran produk 228 bp, dan hasil optimasi suhu annealing terbaik dalam mengamplifikasi gen *DHAR* adalah 60°C. Serta hasil analisis menunjukkan bahwa varietas toleran dan moderat mengalami penurunan sedangkan pada varietas sensitif mengalami peningkatan.

Kata kunci : Cekaman kekeringan, Ekspresi gen DHAR, ROS, Realtime-PCR

DEHYDROASCORBATE REDUCTASE GENE EXPRESSION (DHAR) OF SEVERAL RICE VARIETIES (*Oryza sativa* L.) THAT RECEIVED DROUGHT SIMULATION TREATMENT USING PEG

Isna Aryunita Putri

ABSTRACT

Rice is one of the most widely grown crops in Indonesia which is consumed as a source of carbohydrates. One of the main problems that become obstacles in the management of agricultural land is the availability of very little water and large fluctuations in soil water content. Lack of water will cause drought stress on plants. One of the plant responses to overcome this is by forming antioxidant enzymes. One of the antioxidant enzymes that plays a role in overcoming these free radicals is Dehydroascorbate reductase (DHAR) which can defend plants from drought stress. This study aims to determine the specific primer sequence and optimum annealing temperature for DHAR gene amplification and to determine the expression level of DHAR gene in the roots of several rice varieties that received drought simulation treatment using PEG.

This research is an experimental study by observing the expression of the Dehydroascorbate Reductase (DHAR) gene in 3 varieties of rice (tolerant, moderate, sensitive). This method requires forward and reverse primers that are specific to the target gene for gene amplification. The primer was designed using Primer Quest and then analyzed using Geneious Prime. Optimization of the annealing temperature was carried out using the gradient PCR method. Gene expression was analyzed by comparing the expression values of control and treatment genes.

The results of the primer designs with the best criteria were Forward DHAR 5'-GTACCCAACCCCGTCTCTTG -3' and Reverse DHAR 5'-TGGTAGAGCTTTGGTGCCAG -3' primers with a product size of 228 bp, and the best annealing temperature optimization results in amplifying the DHAR gene was 60°C. The results of the analysis showed that the tolerant and moderate varieties experienced a decrease, while the sensitive varieties experienced an increase.

Keywords: Drought stress, DHAR Gene expression, ROS, Realtime PCR

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi yang berjudul “Ekspresi Gen *Dehydroascorbate Reductase* Akar Beberapa Varietas Padi yang Mendapat Perlakuan Simulasi Kekeringan Menggunakan PEG”. Sholawat beserta salam semoga senantiasa tersampaikan kepada Nabi Muhammad SAW. Penulisan skripsi ini bertujuan untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Sarjana Sains Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada:

1. Ibu Dr. Violita, M.Si. selaku dosen pembimbing skripsi dan sekaligus pembimbing akademik yang telah memberikan waktu, nasehat, saran, pikiran dan tenaga untuk membimbing dalam melaksanakan kegiatan penelitian dan mengarahkan penulis sehingga bisa menyelesaikan skripsi.
2. Bapak Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si, Biomed.. selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran dalam penulisan skripsi.
3. Ibu Afifatul Achyar, M.Si. selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran, serta waktu dan tenaga dalam proses penelitian penulis.
4. Ibu Dra. Des M., MS. Selaku dosen penasehat akademik yang selalu memberikan saran dan nasehat selama masa perkuliahan.
5. Bapak/Ibu staff departemen biologi yang telah membantu untuk kelancaran penulisan skripsi ini.

6. Kedua orang tua saya tercinta bapak Hariyanto dan Ibu Sri Wahyuni atas kasih sayang, cinta, dan dukungan, serta doa yang senantiasa mengiringi langkah dalam penulisan skripsi ini.
7. Kakak tersayang Ika Haryuningtyas dan adik Nindi Cahya Ningrum atas dukungan dan doa yang diberikan demi kelancaran penulis selama masa perkuliahan.
8. Keluarga besar yang senantiasa memberikan doa serta dukungan.
9. Teman-teman tim penelitian saya yaitu Annisa Khaira, Jumatul Hafisah, Nelfi Yulita, Nella Fauziah, Nurul Hasanah, Rezi Nabillah, dan Wina Ayunanda terima kasih atas dukungan, bantuan dan kerja samanya.
10. Teman-teman Biologi Sains 2019 yang selalu memberikan doa serta dukungannya.
11. Semua pihak yang telah ikut berpartisipasi dan memberikan bantuan demi lancarnya penulisan skripsi ini.

Semoga bantuan yang Bapak/Ibu serta rekan-rekan berikan bernilai ibadah dan mendapatkan pahala dari Allah SWT. Penulis berharap skripsi ini bisa memberikan manfaat bagi setiap orang yang membacanya.

Padang, 15 Mei 2023

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK.....	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
BAB I.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah	5
C. Tujuan Penelitian.....	5
D. Hipotesis Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
E. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II.....	7
A. Tanaman Padi	7
B. Cekaman Kekeringan.....	9
C. Dehydroascorbate reductase	10
D. Polyethylene glycol (PEG).....	12
E. Quantitative Real-time PCR	13
BAB III	14
A. Jenis Penelitian	14
B. Waktu dan Lokasi Penelitian	14
C. Alat dan Bahan	14
D. Rancangan penelitian.....	15
E. Prosedur penelitian.....	16
F. Analisis ekspresi gen.....	23
G. Analisis data.....	24
BAB IV	25
A. Hasil Penelitian.....	25
B. Pembahasan.....	27
BAB V.....	32
A. Kesimpulan	32
B. Saran.....	32

DAFTAR PUSTAKA33
LAMPIRAN.....38

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kombinasi perlakuan varietas padi dan PEG 6000.....	15
2. Nama varietas padi yang digunakan dan informasinya.....	17
3. Komponen reaksi gen DHAR real-time qPCR	22
4. Siklus amplifikasi cDNA akar padi gen DHAR dengan qPCR	22
5. Komponen reaksi RT-PCR untuk House Keeping gene	23
6. Profil siklus amplifikasi cDNA akar padi gen DHAR dengan qPCR.....	23
7. Parameter primer yang dipilih.....	25

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Skema peran DHAR dalam daur ulang askorbat	11
2. Hasil optimasi suhu annealing	26
3. Selisih tingkat ekspresi gen DHAR	Error! Bookmark not defined.

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Komposisi larutan stok Yoshida (1976).....	38
2. Komposisi larutan kultur.....	38
3. Spesifikasi kandidat primer.....	39
4. Hasil realtime PCR DHAR.....	39
5. Hasil realtime PCR Actin.....	45
6. Data Kuantifikasi RNA Total.....	49
7. Spesifikasi Primer.....	50
8. Hasil Analisis Data Real-time PCR.....	50
9. Uji Analisis Berdasarkan <i>Standard Error of mean</i>	51
10. Alat dan bahan penelitian.....	52

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Padi menjadi salah satu sumber pangan utama di Indonesia. Bahkan tidak hanya di Indonesia, padi juga telah menjadi sumber pangan utama di dunia terutama di Asia (Rohman *et al.*, 2014). Padi merupakan salah satu tanaman yang paling banyak ditanam di Indonesia yang dikonsumsi sebagai sumber karbohidrat. Pengembangan varietas unggul padi yang menghasilkan sejumlah hasil besar dan tahan cekaman biotik dan abiotik sangat penting untuk mendorong produksi padi dan mencapai swasembada beras. Air merupakan salah satu komponen lingkungan yang mempengaruhi perkembangan dan hasil tanaman padi. Kekurangan air mengakibatkan pertumbuhan tanaman padi tidak sempurna dan bahkan dapat menyebabkan tanaman padi mati karena dehidrasi (Sujinah dan Jamil, 2016).

Tanaman padi sangat sensitif terhadap cekaman kekeringan. Cekaman kekeringan adalah suatu kondisi kadar air tanah berada pada kondisi yang minimum untuk pertumbuhan dan produksi tanaman. Cekaman kekeringan menyebabkan berbagai dampak negatif pada tanaman yang akan menyebabkan terganggunya proses metabolisme tanaman seperti terhambatnya penyerapan nutrisi, terhambatnya pembelahan dan pembesaran sel, penurunan aktivitas enzim serta penutupan stomata sehingga pertumbuhan dan perkembangan tanaman menjadi terhambat (Asmara, 2011). Adanya cekaman kekeringan juga akan menyebabkan perubahan fisiologi dan anatomi serta molekuler terutama pada akar. Ketika terjadi perubahan ketersediaan air pada tanah, akar yang akan pertama kali mengalami kontak langsung dan memainkan peran penting dalam pengaturan penyerapan air (Khan *et al.*, 2019). Terjadinya cekaman kekeringan akan

menyebabkan sistem perakaran mengalami perubahan serta penambahan struktur yaitu dengan bertambahnya jumlah akar yang mana bertujuan untuk mendukung fungsi akar dalam penyerapan air. Pada padi terjadi peningkatan jumlah akar yang akan meningkatkan kemampuan tanaman untuk menyerap air. Karakter anatomi akar padi yang lebih responsif terhadap kekeringan dapat digunakan sebagai penciri sifat toleransi terhadap cekaman kekeringan. (Henry *et al.*, 2012).

Cekaman kekeringan dapat menyebabkan tanaman menghasilkan lebih banyak *Reactive oxygen spesies* (ROS), yang merupakan jenis radikal bebas. (Purwanto dan Agustono, 2010). Salah satu respon tanaman mengatasi cekaman kekeringan tersebut yaitu dengan membentuk senyawa antioksidan dan enzim antioksidan. Senyawa antioksidan secara kimia diartikan sebagai senyawa pemberi elektron (elektron donor). Secara biologis, antioksidan diartikan sebagai senyawa yang mampu menangkal atau meredam radikal bebas. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang memiliki sifat oksidan (mengandung radikal bebas) sehingga aktivitasnya dapat dihambat (Sayuti, 2015). Sedangkan enzim antioksidan adalah sekelompok protein yang ada di lingkungan seluler untuk memfasilitasi dan mengatur antioksidan dalam mengais radikal bebas (Lei *et al.*, 2016).

Salah satu enzim antioksidan adalah *Dehydroascorbate reductase* (DHAR) yang berperan dalam mengatasi radikal bebas ini. DHAR adalah enzim yang terlibat dalam daur ulang askorbat yang mengkatalisis reduksi askorbat teroksidasi yang bergantung pada glutathione (GSH). Asam askorbat (AsA) adalah kofaktor dalam banyak reaksi enzimatik untuk mekanisme pertahanan melawan stres oksidatif. Namun, AsA terus dioksidasi oleh ROS yang dihasilkan oleh cekaman

lingkungan seperti kekeringan, salinitas, sinar ultraviolet (UV), dan suhu ekstrem. DHAR berperan dalam meregenerasi kumpulan askorbat tereduksi dan mendetoksifikasi ROS (Gallie, 2013)

Asam askorbat (AsA) adalah antioksidan utama pada tanaman yang mendetoksifikasi ROS dan mempertahankan fungsi fotosintesis. Ekspresi *DHAR* yang bertanggung jawab untuk regenerasi AsA dari keadaan teroksidasi dan mengatur keadaan redoks AsA seluler yang pada akhirnya mempengaruhi respons dan toleransi sel terhadap ROS. DHAR penting untuk pertumbuhan tanaman karena berperan dalam daur ulang AsA (Gallie, 2013)

Salah satu mekanisme pertahanan tanaman dalam menghadapi cekaman kekeringan adalah mengaktifkan gen antioksidan (Oktaviani *et al.*, 2021). Oleh karena itu dilakukan penelitian ekspresi gen DHAR yang diperlukan untuk mengetahui keberadaan DHAR pada tanaman ketika mendapatkan cekaman kekeringan. Salah satu simulasi yang bisa dilakukan untuk melihat pengaruh cekaman kekeringan pada akar beberapa varietas padi adalah dengan menggunakan PEG.

Polyethylene glycol (PEG) merupakan zat kimia inert dan non toksis dengan berat molekul tinggi (Jiang dan Lafitte, 2007). Pemberian PEG ini akan menaikkan tingkat osmotik media sehingga jumlah air yang diserap oleh kecambah rendah sehingga akan menurunkan persentase perkecambahan (Jatoi *et al.*, 2014). Pertumbuhan tinggi tanaman padi dapat dipengaruhi oleh penurunan tekanan turgor pada saat tanaman dibawah kondisi cekaman kekeringan seperti dengan penambahan larutan PEG 6000 pada media penanaman yang dapat menginduksi tekanan air atau menurunkan potensial air. Tanaman yang kekurangan air akan

mengurangi pembesaran dan ukuran selnya, sehingga pertumbuhan vegetatif tanaman terhambat maka terjadinya penurunan pada tinggi tanaman (Islam *et al.*, 2018). Sifat PEG yang mengikat air akan mengakibatkan proses perkecambahan terhambat (Verslues *et al.*, 2006).

Ketahanan tanaman dalam menghadapi kekeringan merupakan indeks penting dari produktivitas serta pemuliaan tanaman (Yin, 2021). Berdasarkan penelitian sebelumnya telah diidentifikasi beberapa varietas padi yang dikelompokkan berdasarkan tingkat ketahanannya terhadap cekaman kekeringan (Mardita dan Violita 2018). Yakni dikelompokkan berdasarkan tiga tingkatan yaitu harum (toleran), situbagendit (moderat), dan rosna (sensitif) (Violita dan Azhari, 2021), namun ketiga varietas yang telah diidentifikasi sebelumnya belum diketahui bagaimana mekanismenya secara molekuler. Maka dari itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui ekspresi gen akar dari beberapa varietas padi tersebut. Untuk mendeteksi ekspresi gen DHAR menggunakan metode Polymerase Chain Reaction (PCR). Salah satu yang menentukan keberhasilan PCR adalah desain primer yang baik sesuai kriteria.

Keberhasilan amplifikasi DNA tergantung dari ketepatan primer yang digunakan. Primer yang digunakan dalam proses PCR harus dapat membatasi daerah yang akan diamplifikasi. Primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi (Handoyo, 2001).

Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan penelitian tentang “Ekspresi Gen Dehydroascorbate reductase (DHAR) Akar Beberapa Varietas Padi (*Oryza sativa* L.) Sumatera Barat yang Mendapat Perlakuan Simulasi Kekeringan Menggunakan PEG”.

A. Rumusan Masalah

1. Bagaimana urutan primer potensial untuk amplifikasi gen *Dehydroascorbate reductase (DHAR)* akar beberapa varietas padi (*Oryza sativa* L.) yang mendapat perlakuan simulasi kekeringan menggunakan PEG?
2. Bagaimana suhu annealing optimum untuk amplifikasi gen DHAR akar beberapa varietas padi yang mendapat perlakuan simulasi kekeringan menggunakan PEG?
3. Bagaimana perbedaan tingkat ketahanan setiap varietas padi yang mendapat perlakuan simulasi kekeringan menggunakan PEG terhadap tingkat ekspresi gen DHAR?

B. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui urutan primer potensial untuk amplifikasi gen *Dehydroascorbate reductase (DHAR)* akar beberapa varietas padi (*Oryza sativa* L.) yang mendapat perlakuan simulasi kekeringan menggunakan PEG.
2. Mengetahui suhu annealing optimum untuk amplifikasi gen DHAR akar beberapa varietas padi yang mendapat perlakuan simulasi kekeringan menggunakan PEG.
3. Mengetahui perbedaan tingkat ketahanan setiap varietas padi yang mendapat perlakuan simulasi kekeringan menggunakan PEG terhadap tingkat ekspresi gen DHAR.

C. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu sebagai berikut :

1. Sebagai sumber referensi ilmiah untuk penelitian mengenai ekspresi gen *Dehydroascorbate reductase (DHAR)* akar beberapa varietas padi (*Oryza sativa* L.) yang mendapat perlakuan simulasi kekeringan menggunakan PEG.
2. Menambah wawasan dibidang fisiologi cekaman tumbuhan dan genetika molekuler.
3. Memberikan informasi mengenai mekanisme pertahanan tanaman dalam menghadapi cekaman kekeringan.
4. Sebagai acuan untuk melakukan penelitian selanjutnya.