

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



**OLEH:
NELLA FAUZIAH
NIM. 19032029/2019**

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

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

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu persyaratan guna memperoleh gelar Sarjana Sains



**OLEH:
NELLA FAUZIAH
NIM. 19032029/2019**

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

PERSETUJUAN SKRIPSI

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

Nama : Nella Fauziah
NIM/TM : 19032029/2019
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, 10 Mei 2023

Mengetahui,
Ketua Departemen Biologi



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed
NIP. 197508152006042001

Disetujui oleh
Pembimbing



Dr. Violita, S.Si., M.Si
NIP. 198107042008012022

PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI

Nama : Nella Fauziah
NIM : 19032029
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

EKSPRESI GEN PEROKSIDASE (POD) 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*

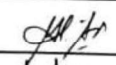
Padang, 31 Mei 2023


Tim Penguji

Tanda tangan

Nama
Ketua : Dr. Violita, S.Si., M.Si.
Anggota : Prof. Dr. Linda Advinda, M.Kes.
Anggota : Afifatul Achyar, S.Si., M.Si.







SURAT PERNYATAAN TIDAK PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Nella Fauziah
NIM : 19032029
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam


Dengan ini menyatakan bahwa, skripsi saya dengan judul “Ekspresi Gen Peroksidase (POD) 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

Saya yang menyatakan

Mengetahui:
Kepala Departemen Biologi



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



Nella Fauziah
NIM.19032029

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

Nella Fauziah

ABSTRAK

Padi (*Oryza sativa L.*) merupakan tanaman penting bagi masyarakat Indonesia yang digunakan sebagai sumber makanan pokok. Salah satu tantangan besar bagi petani Indonesia adalah terjadinya perubahan iklim dan rusaknya infrastruktur irigasi yang dapat mengakibatkan terjadinya kekeringan pada lahan pertanian. Sebagai respon terhadap cekaman kekeringan, tanaman mengaktifkan mekanisme respon kekeringan dengan gen tahan kekeringan, salah satu gen yang berperan dalam mempertahankan tanaman dari cekaman kekeringan adalah peroksidase (*POD*). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sekuen primer spesifik dan suhu annealing optimum untuk amplifikasi gen *POD* serta untuk mengetahui tingkat ekspresi gen *POD* pada akar beberapa varietas padi yang mendapat perlakuan simulasi kekeringan menggunakan PEG.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen, menggunakan 3 varietas padi (Harum, Situbagendit dan Rosna) yang diberi perlakuan simulasi kekeringan menggunakan 20% PEG-6000 dalam larutan kultur hara Yoshida dan Kontrol menggunakan larutan kultur hara Yoshida. Metode yang digunakan dalam amplifikasi gen *POD* adalah *quantitative reverse transcription-PCR* (qRT-PCR). Metode ini memerlukan beberapa komponen penting salah satunya yaitu primer (*forward* dan *reverse*). Primer tersebut didesain menggunakan program Primer Quest kemudian dianalisis menggunakan Geneious Prime. Optimasi suhu annealing dilakukan menggunakan metode gradient PCR. Ekspresi gen dianalisis dengan membandingkan selisih peningkatan ekspresi gen antara kontrol dan perlakuan cekaman.

Hasil desain primer dengan kriteria terbaik untuk amplifikasi gen *POD* yaitu Forward *POD* 5'-AAATGCGTCGATCTACTGTACCT-3' dan Reverse *POD* 5'-GTGTTGAAAATGGCAATAAACCGG-3', dan hasil optimasi suhu annealing yang terbaik dalam mengamplifikasi gen *POD* adalah pada suhu 60°C. Hasil analisis data Ct menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan nyata ekspresi gen *POD* pada setiap varietas antara kontrol dengan perlakuan cekaman kekeringan dan padi dengan sifat ketahanan moderat memperlihatkan peningkatan ekspresi gen *POD* lebih tinggi dibandingkan varietas lainnya.

Kata kunci : Cekaman kekeringan, Ekspresi gen *POD*, ROS, Realtime PCR

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

Nella Fauziah

ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) is an important crop for Indonesian people which is used as a staple food source. One of the big challenges for Indonesian farmers is climate change and damage to irrigation infrastructure which can lead to drought on agricultural land. Lack of water will cause drought stress which can cause damage to plants. In response to drought stress, plants activate drought response mechanisms with drought resistance genes, one of the genes that play a role in defending plants from drought stress is peroxidase (*POD*). This study aims to determine the specific primer sequence and optimum annealing temperature for *POD* gene amplification and to determine the expression level of the *POD* gene in the roots of several rice varieties that received drought simulation treatment using PEG.

This research was an experimental study, using 3 rice varieties (Harum, Situbagendit and Rosna) which were treated with a drought simulation using 20% PEG-6000 in a Yoshida nutrient culture solution and controls using a Yoshida nutrient culture solution. The method used in the amplification of the *POD* gene is quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). This method requires several important components, one of which is the primary (forward and reverse). The primer was designed using the Primer Quest program 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 difference in gene expression increase between the control and the stress treatment.

The primary design results with the best criteria for *POD* gene amplification were Forward *POD* 5'-AAATGCGTCGATCTACTGTACCT-3' and Reverse *POD* 5'-GTGTTGAAAATGGCAATAAACCGG-3', and the best annealing temperature optimization results in amplifying the *POD* gene was at 60oC. The results of Ct data analysis showed that there was no significant difference in *POD* gene expression in each variety between controls treated with drought stress and rice with moderate resistance showed a higher increase in *POD* gene expression than other varieties.

Keywords: Drought stress, POD 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 ini yang berjudul : **“Ekspresi Gen Peroksidase (*POD*) Akar Beberapa Varietas Padi (*Oryza sativa L.*) yang Mendapat Perlakuan Simulasi Kekeringan Menggunakan PEG”**. Sholawat beserta salam semoga senantiasa tersampaikan kepada Nabi Muhammad SAW sebagai junjungan umat islam seluruh alam.

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 yang telah memberikan waktu, nasehat, saran, pikiran dan tenaga untuk membimbing dalam melaksanakan kegiatan penelitian dan mengarahkan penulis sehingga menyelesaikan skripsi.
2. Ibu Dr. Linda Advinda, M.Kes 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 Dr. Moralita Chatri, MP 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 yang tercinta Bapak Agus Setiawan dan Ibu Dewi Susanti atas kasih sayang dan dukungan yang diberikan, serta doa yang senantiasa mengiringi setiap langkah penulis.
7. Adik-adik saya yang tersayang atas dukungan dan doa yang diberikan demi kelancaran penulis selama perkuliahan.
8. Keluarga besar yang senantiasa memberikan doa serta dukungan.

9. Teman-teman tim penelitian yaitu Annisa Khaira, Isna Aryunita Putri, Jumatul Hafsah, Nelfi Yulita, Rezi Nabilah, Wina Ayunanda dan Nurul Hasanah terima kasih atas semua dukungan, bantuan dan kerjasamanya.
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 paha dari Allah SWT. Penulis harap skripsi ini bisa memberikan manfaat bagi semua orang yang membacanya.

Padang, 30 April 2023

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	5
C. Tujuan penelitian	5
D. Manfaat Penelitian	5
BAB II KERANGKA TEORI	7
A. Padi (<i>Oryza sativa</i> L.).....	7
B. Cekaman Kekeringan.....	9
C. Peroksidase (<i>POD</i>).....	10
D. <i>Polyethylene Glycol</i> (PEG)	12
E. <i>Real-Time Quantitative Reverse Transcription</i> PCR (qRT-PCR)	13
BAB III METODE PENELITIAN	15
A. Jenis Penelitian.....	15
B. Waktu dan Lokasi Penelitian	15
C. Alat dan Bahan.....	15
D. Rancangan penelitian	16
E. Prosedur penelitian.....	17
F. Analisis ekspresi gen.....	24
G. Analisis data.....	25
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	26
A. Hasil penelitian	26
B. Pembahasan.....	28
BAB V PENUTUP	32
A. Kesimpulan	32
B. Saran	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	37

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kombinasi perlakuan varietas padi dan PEG 6000.....	17
2. Nama varietas padi yang digunakan dan informasinya.....	18
3. Komponen reaksi gen POD real-time PCR.....	23
4. Profil siklus amplifikasi cDNA akar padi gen <i>POD</i> dengan qPCR.....	23
5. Komponen reaksi gen referensi actin real-time qPCR.....	24
6. Profil siklus amplifikasi cDNA akar padi gen <i>POD</i> dengan qPCR.....	24
7. Karakteristik primer terpilih yang dianalisis menggunakan Geneious Prime.....	26

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Peran peroksidase pada tanaman.....	11
2. Respon terhadap cekaman salinitas.....	12
3. Visualisasi hasil elektroforesis produk PCR dengan primer <i>POD</i>	27
4. Level ekspresi gen <i>POD</i>	28

DAFTAR LAMPIRAN

Gambar	Halaman
1. Komposisi larutan stok Yoshida (1976).....	38
2. Komposisi larutan kultur.....	38
3. Spesifikasi kandidat primer.....	39
4. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen <i>POD</i>	39
5. Hasil realtime PCR <i>POD</i>	39
6. Hasil realtime PCR Actin.....	43
7. Data Kuantifikasi RNA Total.....	46
8. Spesifisitas Primer.....	47
9. Hasil Analisis Data Real-Time PCR.....	47
10. Uji Analisis Berdasarkan Standard Error of mean.....	48
11. Level ekspresi gen <i>POD</i>	48
12. Relative Water Content.....	48
13. Alat dan bahan penelitian.....	49

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Padi (*Oryza sativa* L.) merupakan salah satu tanaman budidaya terpenting dalam peradaban manusia. Di Indonesia, padi merupakan tanaman yang paling penting, karena makanan pokok masyarakat Indonesia adalah beras yang dihasilkan dari padi (Kementerian Perdagangan, 2017). Namun, pertambahan jumlah penduduk yang pesat akan meningkatkan kebutuhan terhadap padi. Semakin banyak jumlah penduduk yang mendiami suatu wilayah maka semakin besar tingkat konsumsi beras, sedangkan luas wilayah yang digunakan untuk persawahan akan semakin sedikit dan hal ini akan sangat mempengaruhi tingkat produktivitas padi disuatu wilayah (Qomariyati & Gusvita, 2019).

Perubahan iklim merupakan fenomena global yang menghadirkan tantangan besar bagi petani di Indonesia. Rusaknya infrastruktur irigasi juga menimbulkan resiko kekeringan pada lahan pertanian (Supriyanto, 2013). Kekurangan air akan menimbulkan stress pada tanaman yang akan berdampak pada penurunan produktivitas dan produksi pangan. Khususnya padi, karena dapat mengganggu ketahanan pangan daerah dan stabilitas ekonomi ditingkat nasional (Sastradipraja & Sulaswatty, 2015).

Kekeringan tidak hanya disebabkan oleh kurangnya kadar air di lingkungan. Dalam beberapa kasus, kekeringan dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti salinitas dan suhu tanah yang rendah, sehingga mencegah atau mengurangi penyerapan air oleh akar dan selanjutnya menyebabkan cekaman air pada tanaman (Hossain *et al.*, 2016). Tanaman padi sangat sensitif terhadap cekaman kekeringan. Kekurangan air akan mengganggu banyak fungsi seluler dalam

tanaman dan berdampak negatif terhadap pertumbuhan dan reproduksi tanaman (Jamil, 2016). Kekeringan dapat mengganggu proses metabolisme tanaman dengan menghambat penyerapan nutrisi, menghambat pembelahan dan ekspansi sel, menutup stomata, serta menghambat pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Sebagai respon terhadap cekaman kekeringan, tanaman mengaktifkan mekanisme respon kekeringan sendiri, seperti perubahan morfologi dan struktural, ekspresi gen tahan kekeringan, sintesis hormon dan zat pengatur osmotik untuk mengurangi cekaman kekeringan (Yang *et al.*, 2021).

Menurut Amsal & Ishak-ishak (2018), kemampuan akar menyerap air pada kondisi kekeringan menjadi tolak ukur untuk mengidentifikasi toleran terhadap kekeringan. Cekaman kekeringan dapat menyebabkan transpor hara melalui akar tanaman mengalami gangguan (Gusta & Kusumastuti, 2018). Penurunan penyerapan hara dan air oleh akar, menyebabkan suplai air yang dibutuhkan dalam pertumbuhan tanaman tidak terpenuhi, sehingga pertumbuhan tanaman menjadi terhambat (Hidayati *et al.*, 2017).

Cekaman kekeringan dalam jaringan tanaman dapat mengakibatkan terjadinya peningkatan senyawa radikal bebas berupa *reactive oxygen species* (ROS). ROS merupakan produk sampingan dari proses metabolisme (Qamer *et al.*, 2021). ROS akan terus diproduksi selama cekaman kekeringan, karena aktivitas enzim siklus calvin menurun dan produksi NADP⁺ sebagai penerima elektron pada rantai transpor elektron fotosintesis terhambat, sehingga terjadi penyerapan energi oleh oksigen. Selanjutnya akan terbentuk senyawa radikal bebas, diantaranya meliputi molekul-molekul seperti superoksida (O₂⁻), oksigen singlet (¹O₂⁻), radikal hidroksil

(OH⁻) dan hidrogen peroksida (H₂O₂) (Laxa *et al.*, 2019), yang akan menimbulkan kerusakan pada tanaman (Violita & Hamim, 2010).

Antioksidan memiliki peran penting dalam mengatasi kelebihan (ROS) dari sel tanaman (Cassol *et al.*, 2021), yaitu melindungi sel tanaman terhadap efek merugikan dari ROS yang dihasilkan di bawah berbagai tekanan lingkungan (Yogendra *et al.*, 2015), sebagai respons adaptif seluler berevolusi dari tanaman seperti peningkatan regulasi pelindung stres oksidatif dan akumulasi zat terlarut pelindung. Terdapat beberapa enzim pertahanan antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), askorbat peroksidase (APX), peroksidase (POD), glutathion reduktase (GR) dan monodehydroascorbate reductase (MDAR) (Shehab *et al.*, 2010).

Enzim antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD), peroksidase (POD) dan katalase (CAT) dianggap sebagai tim defensif, yang tujuan gabungannya adalah untuk melindungi sel dari kerusakan oksidatif (Wu *et al.*, 2012). Aktivitas enzim mengalami peningkatan pada tanaman yang mendapat cekaman dibandingkan dengan tanaman yang sehat. Aktivitas enzim yang tinggi efektif menghapus ROS, mencegah toksisitas ROS dari kerusakan sel tumbuhan inangnya. (Ming *et al.*, 2019).

Enzim Peroksidase (POD) merupakan salah satu antioksidan enzimatik yang berperan sebagai pertahanan dalam melawan ROS dengan mengkatalisis konversi H₂O₂ menjadi air dan O₂ (Abedi & Pakniyat, 2010). Peroksidase (POD) juga merupakan enzim yang mengandung heme, mengoksidasi berbagai substrat menggunakan H₂O₂ dan mencegah akumulasi berlebih dari H₂O₂ yang dihasilkan oleh metabolisme normal atau dalam kondisi stres. Kegiatan POD didistribusikan

dalam vakuola, dinding sel dan sitosol. Sebagian besar terletak di dinding sel dan terlibat dalam oksidasi senyawa fenol dalam sintesis lignin (Duman & Yilmaz, 2018).

Penggunaan *Polyethylene Glycol* (PEG) merupakan suatu cara yang dilakukan untuk mensimulasi kondisi cekaman kekeringan pada akar tanaman. PEG merupakan senyawa yang dapat menurunkan potensial osmotik larutan melalui aktivitas matriks sub-unit etilena oksida yang mampu mengikat molekul air dengan ikatan hidrogen. Karena turunnya potensial osmotik larutan, air yang ada pada medium tidak dapat diserap oleh tanaman, sehingga tanaman mengalami stress osmosis. Pemberian PEG akan menyebabkan kekurangan air sehingga akan menginduksi protein, mengkode gen-gen pembentuk enzim yang terlibat dalam biosintesis metabolit sekunder (Setyorini, 2018).

Penelitian sebelumnya telah mengidentifikasi beberapa varietas padi yang dikelompokkan berdasarkan tingkat ketahanan terhadap cekaman kekeringan secara morfologi (Mardita & Violita, 2019), yakni toleran, moderat dan sensitif (Azhari & Violita, 2019). Namun belum diketahui bagaimana respon tanaman padi dalam menghadapi cekaman kekeringan secara molekuler. *Quantitative Reverse Transcription PCR* (qRT-PCR) merupakan metode yang tepat untuk deteksi dan kuantifikasi target RNA (Bustin, 2005). Metode ini digunakan untuk melihat kualitas ekspresi gen melalui pembentukan DNA komplementer (cDNA) yang dibentuk dari RNA dan menghitung jumlah amplifikasi cDNA yang terbentuk. Pada tahapan amplifikasi cDNA dengan PCR dibutuhkan sepasang primer (*forward* dan *reverse*), untuk membatasi daerah yang akan diamplifikasi (Pradnyaniti, 2010). Sehingga sebelum tahap amplifikasi cDNA, perlu dilakukan desain primer terlebih

dahulu untuk memperoleh primer yang sesuai dengan gen target yang akan diamplifikasi. Berdasarkan paparan tersebut maka dilakukan penelitian tentang “Ekspresi Gen Peroksidase (*POD*) Akar Beberapa Varietas Padi (*Oryza sativa* L.) yang Mendapat Perlakuan Simulasi Kekeringan dengan Menggunakan PEG”.

B. Rumusan Masalah

1. Bagaimana sekuen primer spesifik untuk amplifikasi gen Peroksidase (*POD*) pada padi?
2. Bagaimana suhu annealing optimum untuk amplifikasi gen Peroksidase (*POD*) pada padi?
3. Bagaimana tingkat ekspresi gen Peroxisase (*POD*) akar beberapa varietas padi (*Oryza sativa* L.) yang mendapat perlakuan simulasi kekeringan menggunakan PEG?

C. Tujuan penelitian

1. Mengetahui sekuen primer spesifik untuk amplifikasi gen Peroksidase (*POD*) pada padi.
2. Mengetahui suhu annealing optimum untuk amplifikasi gen Peroksidase (*POD*) pada padi.
3. Mengetahui tingkat ekspresi gen Peroxisase (*POD*) akar beberapa varietas padi (*Oryza sativa* L.) yang mendapat perlakuan simulasi kekeringan menggunakan PEG.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu sebagai berikut :

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