

**EKSPRESI GEN GLUTATION S-TRANSFERASE (GST) AKAR
BEBERAPA VARIETAS PADI (*Oryza sativa* L.) YANG MENDAPAT
PERLAKUAN SIMULASI KEKERINGAN MENGGUNAKAN PEG**



**REZI NABILAH
NIM. 19032093/2019**

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

**EKSPRESI GEN GLUTATION S-TRANSFERASE (GST) AKAR
BEBERAPA VARIETAS PADI (*Oryza sativa* L.) YANG MENDAPAT
PERLAKUAN SIMULASI KEKERINGAN MENGGUNAKAN PEG**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar

Sarjana Sains



**Oleh:
REZI NABILAH
NIM. 19032093 / 2019**

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

PERSETUJUAN SKRIPSI

EKSPRESI GEN GLUTATION S-TRANSFERASE (GST) AKAR BEBERAPA VARIETAS PADI (*Oryza sativa* L.) YANG MENDAPAT PERLAKUAN SIMULASI KEKERINGAN MENGGUNAKAN PEG

Nama : Rezi Nabilah
NIM/TM : 19032093/2019
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, 8 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 : Rezi Nabilah
NIM/TM : 19032093/2019
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

**EKSPRESI GEN GLUTATION S-TRANSFERASE (GST) AKAR
BEBERAPA VARIETAS PADI (*Oryza sativa* L.) YANG MENDAPAT
PERLAKUAN SIMULASI KEKERINGAN MENGGUNAKAN PEG**

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

Padang, 23 Mei 2023

Tim Penguji

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

SURAT PERNYATAAN TIDAK PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rezi Nabilah
NIM/TM : 19032093/2019
Program Studi : Biologi
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan bahwa, skripsi saya dengan judul **“Ekspresi Gen Glutathion S-Transferase (GST) Akar Beberapa Varietas Padi (*Oryza sativa* L.) Yang Mendapat Perlakuan Simulasi Kekeringan Menggunakan PEG”** adalah benar merupakan hasil karya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya, pendapat yang ditulis dan diterbitkan orang lain kecuali sebagai acuan atau kutipan dengan mengikuti tata penulisan karya ilmiah yang lazim.

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

Padang, 4 Agustus 2023

Diketahui oleh,
Ketua Departemen Biologi



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si, M.Biomed
NIP. 19750815 2006042 001

Saya yang menyatakan,



Rezi Nabilah
NIM. 19032093

EKSPRESI GEN GLUTATHIONE S-TRANSFERASE (GST) AKAR BEBERAPA VARIETAS PADI (*Oryza sativa* L.) YANG MENDAPAT PERLAKUAN SIMULASI KEKERINGAN MENGGUNAKAN PEG

Rezi Nabilah

ABSTRAK

Cekaman kekeringan merupakan salah satu cekaman abiotik yang paling merusak karena memiliki respon yang melibatkan berbagai mekanisme pada tingkat yang berbeda seperti fisiologi, anatomi, bahkan molekuler. Bagi tanaman padi yang tumbuh normal dalam kondisi tergenang, cekaman kekeringan sangat berdampak buruk. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sekuen primer spesifik dan suhu annealing yang optimum untuk amplifikasi gen *Glutathione S-Transferase (GST)* dan tingkat ekspresi *GST* pada akar beberapa varietas padi (*Oryza sativa* L.) yang mendapat perlakuan simulasi kekeringan menggunakan PEG.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen yang dilaksanakan pada bulan Oktober 2022 hingga Februari 2023 di Laboratorium Biologi Dasar dan Laboratorium Genetika dan Bioteknologi, Departemen Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Padang. Penelitian ini dilaksanakan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 1 faktor yaitu 3 varietas padi yang digunakan; Harum, Situbagendit, dan Rosna. Dengan dua perlakuan yaitu kontrol tanpa cekaman kekeringan (dengan larutan kultur hara Yoshida) dan simulasi cekaman kekeringan dengan penambahan 20% PEG-6000 dalam kultur hara Yoshida, setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Sekuen primer didesain menggunakan *software* Geneious Prime dan Primer *BLAST* tools pada NCBI. Ekspresi gen dianalisis dengan metode *relative quantification-PCR*. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan nilai ekspresi gen kontrol dan perlakuan.

Hasil penelitian diperoleh pasangan sekuen primer *GST forward* dan *reverse* (5'-TTCGAAGGGCCAGCATTACT-3' dan 5'-GCAATGTCCACCAAGCTGAA-3') dengan suhu annealing 60°C. Perbedaan tingkat ketahanan setiap varietas padi yang mendapat perlakuan simulasi kekeringan menggunakan PEG menyebabkan terjadinya penurunan tingkat ekspresi gen *GST* pada tanaman padi.

Kata Kunci : Cekaman Kekeringan, Ekspresi Gen *GST*, *Oryza sativa* L., PEG-6000

EXPRESSION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE GENE ROOTS OF SOME RICE VARIETIES (*Oryza sativa* L.) WHICH RECEIVED SIMULATED DROUGHT TREATMENT USING PEG

Rezi Nabilah

ABSTRACT

Drought stress is one of the most destructive abiotic stresses because it has responses that involve various mechanisms at different levels such as physiology, anatomy, and molecular. For rice plants that grow normally in flooded conditions, drought is very bad. This study aims to determine the specific primer sequence and optimum annealing temperature for Glutathione S-Transferase (*GST*) gene amplification and *GST* expression levels in the roots of several rice varieties (*Oryza sativa* L.) that received drought simulation treatment using PEG.

This is an experimental research conducted in October 2022 - February 2023 at the Integrated Research Laboratory and the Genetics and Biotechnology Laboratory, Department of Biology, FMIPA, Universitas Negeri Padang. This study was conducted using Completely Randomized Design (CRD) with 1 factor, namely 3 rice varieties used; Harum, Situbagendit, and Rosna. With two treatments, control without drought stress (with Yoshida nutrient culture solution) and drought simulation treatment with the addition of 20% PEG-6000 in Yoshida nutrient culture solution, each treatment was repeated 3 times. The primer was designed using Geneious Prime and Primer-BLAST tools on NCBI. Gene expression was analyzed by *relative quantification*-PCR method. The data obtained were analyzed descriptively by comparing the gene expression values of control and treatment.

The results obtained primer sequence pairs of *GST* forward and reverse (5'-TTCGAAGGGCCAGAGCATTACT-3' and 5'-GCAATGTCCACCAAGCTGAA-3') with an annealing temperature of 60°C. The difference in the level of resistance of each rice variety that received drought simulation treatment using PEG caused a decrease in the level of *GST* gene expression in rice plants

Keywords : Drought stress, *GST* Gene Expression, *Oryza sativa* L., PEG-6000

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat melaksanakan dan menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “Ekspresi Gen *Glutation S-Transferase (GST)* Akar Beberapa Varietas Padi (*Oryza sativa* L.) yang Mendapat Perlakuan Simulasi Kekeringan Menggunakan PEG”. Shalawat beriring salam untuk Nabi Muhammad SAW sebagai junjungan umat 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, S.Si, M.Si selaku dosen pembimbing yang telah memberikan waktu, fikiran dan tenaga untuk membimbing dalam melaksanakan kegiatan penelitian dan mengarahkan penulis sehingga bisa menyelesaikan skripsi.
2. Ibu Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed selaku dosen penguji yang telah memberikan arahan dan saran dalam penulisan skripsi ini.
3. Ibu Afifatul Achyar, S.Si, 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 selaku pembimbing akademik yang selalu memberikan nasehat dan saran selama di Departemen Biologi.
5. Bapak/Ibu dosen staff Departemen Biologi yang telah membantu untuk kelancaran penulisan skripsi ini.
6. Kedua Orang Tua saya Bapak Sukarmen dan Ibu Delizar yang selalu memberikan do'a dan dukungan kepada penulis selama ini.

7. Keluarga besar yang senantiasa memberikan do'a serta dukungan dalam penyelesaian skripsi ini.
8. Teman-teman tim penelitian (Annisa Khaira, Wina Ayunanda, Nella Fauziah, Jumatul Hafisah, Nelfi Yulita, Nurul Hasanah, Isna Aryunita Putri) yang telah memberikan dukungan dan kerjasamanya dalam menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi.
9. Teman seperjuangan Nafisa Arini, Shinta Triana Putri, Novia Annisa, Nurul Aulia, dan teman-teman lain yang telah memberikan bantuan dan dukungannya selama penelitian dan penyelesaian skripsi ini.
10. Teman-teman Biologi Sains 2019 yang selalu memberikan dukungan serta do'anya.

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 semua orang yang membacanya.

Padang, 9 Mei 2023

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR TABEL.....	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 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
A. Tanaman Padi.....	7
B. Cekaman Kekeringan	9
C. Glutathione S-Transferase.....	12
D. <i>Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i> (q-PCR).....	14
BAB III METODE PENELITIAN	15
A. Jenis Penelitian.....	15
B. Waktu dan Tempat Penelitian	15
D. Rancangan Penelitian	16
E. Prosedur Penelitian.....	17
F. Analisis Ekspresi Gen <i>GST</i>	25
G. Analisis Data.....	26
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	27
A. Hasil Penelitian	27
B. Pembahasan.....	30
BAB V PENUTUP	37
A. Kesimpulan	37
B. Saran.....	37
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN.....	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Respon Umum Tanaman Padi terhadap Cekaman Kekeringan	11
2. Sistem Detoksifikasi Spesies Oksigen Reaktif pada Tanaman	12
3. Desain Primer pada sekuen <i>GST Oryza sativa</i> L (DQ323738).....	28
4. Visualisasi Elektroforesis Gradient PCR	29
5. Level Ekspresi Gen <i>GST</i> Akar Tiga Varietas Padi	30

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Nama Varietas Padi yang digunakan dan Informasinya.	18
2. Komponen Reaksi Gradient PCR.....	20
3. Komponen Reaksi DNase I.....	23
4. Komponen Reaksi Gen <i>GST</i> dengan qPCR	24
5. Profil Siklus Amplifikasi cDNA <i>GST</i> dengan qPCR.....	24
6. Komponen Reaksi <i>Housekeeping Gene</i> (Actin) dengan qPCR	25
7. Profil Siklus Amplifikasi <i>Housekeeping Gene</i> (Actin) dengan qPCR.....	25
8. Karakteristik Hasil Desain Primer Gen <i>GST</i>	27
9. Hasil Penjajaran (<i>BLAST</i>) Sekuens Pasangan Primer	28

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Larutan Yoshida (1976)	45
2. Kandidat Desain Primer Gen <i>GST</i>	45
3. Karakteristik Hasil Desain Primer	46
4. Hasil uji spesifisitas menggunakan Primer- <i>BLAST</i> pada NCBI	46
5. Desain Primer Gen <i>GST</i>	47
6. Data Kuantitatif RNA Total	47
7. Grafik <i>Amplification Curve</i> dan <i>Melt Peak</i> Gen <i>GST</i>	48
8. Grafik <i>Amplification Curve</i> dan <i>Metlt Peak Housekeeping Gene</i>	49
9. Nilai Ekspresi Relatif Gen <i>GST</i>	51

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Padi (*Oryza sativa* L.) merupakan makanan pokok bagi sebagian besar negara dan merupakan tanaman sereal penting yang telah menjadi makanan bagi lebih dari setengah populasi dunia (Umadevi *et al.*, 2012). Indonesia merupakan produsen padi terbesar ketiga di dunia dan juga salah satu konsumen beras terbesar di dunia (GRiSP, 2013). Namun menurut Badan Pusat Statistika (2022) total produksi padi di Indonesia selama 2021 sekitar 54,42 juta ton mengalami penurunan sebesar 233,91 ribu ton (0,43%) dibandingkan dengan tahun 2020. Selain itu total produksi padi menjadi beras untuk konsumsi pada 2021 sebanyak 31,36 juta ton beras mengalami penurunan sebesar 140,73 ribu ton (0,45%) dibandingkan dengan produksi beras pada tahun 2020 (BPS, 2022).

Padi merupakan tanaman semi-akuatik yang tumbuh normal dalam kondisi tergenang. Namun, hampir 50% dari sistem sawah tidak memiliki cukup air untuk irigasinya sehingga sangat rentan terhadap kekeringan (Maisura *et al.*, 2014). Menurut kementerian pekerjaan umum, sekitar 84% dari total luas area persawahan di Indonesia pada tahun 2012 sudah menggunakan sistem irigasi sedangkan sebanyak 16% masih mengandalkan curah hujan (GRiSP, 2013). Menurut BPS (2022) bencana alam seperti banjir dan kekeringan, serta serangan hama/organisme pengganggu tanaman (OPT) merupakan penyebab terjadinya gagal panen. Kondisi ini makin diperparah oleh perubahan iklim global yang mengakibatkan perubahan dalam jumlah dan waktu curah hujan. Hal itu

menyebabkan periode cekaman kekeringan dianggap sebagai salah satu cekaman abiotik yang paling merusak, terutama dengan respon terhadap cekaman kekeringan merupakan proses yang sangat kompleks yang melibatkan berbagai mekanisme pada tingkat yang berbeda (Basal *et al.*, 2020).

Terjadinya perubahan ketersediaan air pada tanah pertama kali akan dirasakan oleh akar. Karena akar merupakan organ tanaman yang mengalami kontak langsung dengan tanah dan memainkan peran penting dalam pengaturan penyerapan air (Chan *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2019). Ketika akar mendeteksi adanya perubahan pada ketersediaan air, maka akar akan memicu sinyal yang menginduksi beberapa perubahan biokimia dan molekuler dalam sel penjaga untuk penutupan stomata untuk mengurangi fluks transpirasi. Hal ini menyebabkan terjadinya pembatasan pertukaran gas yang mengurangi masuknya CO₂ yang akan berefek pada fotosintesis. Laju fotosintesis terhambat karena terjadi perbedaan antara penangkapan dan penggunaan cahaya yang diakibatkan oleh kondisi kekeringan. Hal ini mengakibatkan terjadinya gangguan pada produksi dan penggunaan elektron pada apparatus fotosintesis yang pada akhirnya menyebabkan stres oksidatif pada sel tumbuhan sebagai akibat dari pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Verma *et al.*, 2019).

Untuk menghindari akumulasi ROS yang berlebihan serta melindungi dari kerusakan oksidatif, tanaman memiliki mekanisme untuk mempertahankan diri dengan sistem pertahanan antioksidan baik antioksidan enzimatik dan non-enzimatik (Gill & Tuteja, 2010). Salah satu enzim antioksidan yang berperan dalam mengendalikan produksi ROS adalah *Glutathione S-Transferase*. *Glutathione S-Transferase* terlibat dalam detoksifikasi hidrosiperoksida,

detoksifikasi herbisida, respon tanaman terhadap tekanan biotik dan abiotik, detoksifikasi ROS dan radikal organik, kematian sel terprogram sebagai akibat dari peningkatan kadar ROS (Banerjee & Roychoudhury, 2019; Dixon *et al.*, 2010). GST bekerja dalam detoksifikasi ROS dengan mengkatalisis konversi H₂O₂ dan ROOH menjadi H₂O dan ROH dengan melepaskan *Glutathion* (GSH), sehingga menghasilkan *glutathione disulphida* (GSSG) sebagai bentuk teroksidasinya (Nianiou-Obeidat *et al.*, 2017; Zagorchev *et al.*, 2013).

Telah banyak penelitian dan bukti berbeda yang menyatakan bahwa GST secara signifikan berkontribusi pada adaptasi dan toleransi terhadap cekaman abiotik (kekeringan, garam, logam berat, bahan kimia fitotoksik) (Nianiou-Obeidat *et al.*, 2017). Gen *GSTL2* tanaman padi pada *Arabidopsis* memberikan toleransi terhadap stres abiotik seperti kekeringan (Kumar *et al.*, 2013a). Ekspresi gen *GST* pada tanaman lada (*Capsicum annuum* L.) *CaGST* menunjukkan peningkatan regulasi sebagai respon terhadap kondisi cekaman dingin, panas, kekeringan, salinitas, dan cekaman osmotik (Islam *et al.*, 2019).

Salah satu senyawa yang banyak digunakan dalam penelitian untuk memberikan simulasi kekeringan pada tanaman adalah senyawa *Polyethylene glycol* (PEG) 6000. PEG 6000 merupakan polimer alami yang larut dalam air dan bersifat nonionik. PEG 6000 ditemukan dapat meniru cekaman kekeringan dan mengakibatkan penurunan potensial air tanaman karena cekaman osmotik (Ahmad *et al.*, 2020).

Penelitian Violita & Azhari (2021) telah mengidentifikasi beberapa varietas padi yang mengalami cekaman kekeringan menggunakan PEG dikelompokkan berdasarkan *Drought Sensitivity Index* (DSI) menjadi toleran (Harum dan

Baroto), moderat (Situbagendit, dan Random Kaus), dan sensitif (Keriting, Batang Palo, Kuning rendah, Indragiri, dan Rosna putih). Namun belum diketahui bagaimana mekanismenya secara molekuler terhadap ekspresi gen *GST*.

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk menyelidiki ekspresi gen adalah *Quantitative Polymerase Chain Reaction* (q-PCR) (Maddocks & Jenkins, 2017a). Pengaplikasian metode q-PCR diperlukan adanya primer-spesifik gen yang didesain dengan baik karena desain primer akan menentukan keberhasilan dalam analisis ekspresi gen (Jozefczuk & Adjaye, 2011). Primer yang didesain harus memenuhi kriteria primer yang baik meliputi %GC, *melting temperature* (T_m), tidak terdapat dimer (*self-dimer* dan *cross-dimer*) atau struktur *hairpin*, dan *false priming* (Rodríguez et al., 2019). Selain itu aspek penting yang menentukan keberhasilan q-PCR adalah suhu annealing (T_a). Suhu annealing (T_a) merupakan variabel penting bagi kinerja primer (Bustin & Huggett, 2017) terutama untuk memperoleh gen spesifik. Sehingga dibutuhkan suhu annealing yang optimal, karena suhu annealing yang lebih rendah memungkinkan amplifikasi non-spesifik terjadi, sedangkan suhu yang terlalu tinggi dapat menonaktifkan annealing yang akan mempengaruhi produk PCR yang dihasilkan (Obradovic et al., 2013).

Pada penelitian Hu *et al.*, (2011) telah terdapat primer spesifik gen *GSTL2* pada tanaman padi namun setelah dilakukan analisis spesifisitas pada Primer-*BLAST* menunjukkan pasangan primer tidak spesifik dan dapat mengamplifikasi DNA *genomic*. Sehingga diperlukan desain primer untuk memperoleh desain primer spesifik untuk gen *GST*. Berdasarkan paparan yang diberikan tersebut maka perlu dilakukan penelitian tentang “Ekspresi Gen *Glutathione S-Transferase*

Akar Beberapa Varietas Padi (*Oryza sativa* L.) yang Mendapat Perlakuan Simulasi Kekeringan Menggunakan PEG”.

B. Rumusan Masalah

1. Bagaimana sekuen primer spesifik untuk amplifikasi gen *GST* akar pada tanaman padi?
2. Berapa suhu annealing yang optimum untuk amplifikasi gen *GST* akar pada tanaman padi?
3. Bagaimana pengaruh perbedaan tingkat ketahanan setiap varietas padi yang mendapat perlakuan simulasi kekeringan menggunakan PEG terhadap tingkat ekspresi gen *GST*?

C. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui sekuen primer spesifik untuk amplifikasi gen *GST* akar pada tanaman padi.
2. Mengetahui suhu annealing yang optimum untuk amplifikasi gen *GST* akar pada tanaman padi.
3. Mengetahui pengaruh perbedaan tingkat ketahanan setiap varietas padi yang mendapat perlakuan simulasi kekeringan menggunakan PEG terhadap tingkat ekspresi gen *GST*

D. Manfaat Penelitian

1. Menjadi referensi dalam metode pemuliaan jenis padi yang memiliki potensi toleransi terhadap cekaman kekeringan.
2. Menambah informasi dalam penelitian mengenai ekspresi enzim *glutathione S-transferase (GST)* pada akar padi yang mengalami cekaman kekeringan

3. Menambah wawasan serta perkembangan ilmu pengetahuan khususnya dalam bidang ilmu genetika molekuler.
4. Dapat dijadikan sebagai sumber informasi untuk penelitian selanjutnya.