

ANALISIS PROFIL GEN IRT PADA TANAMAN PADI (*Oryza sativa* L.) DENGAN MENGGUNAKAN MARKA SSR DAN SNP TERHADAP KONDISI CEKAMAN BESI

Rizky Priambodo^{1*}, Adisyahputra¹, Alma Fahira¹

¹ Program Studi Biologi FMIPA Universitas Negeri Jakarta

* Corresponding author: rizkypriambodo@unj.ac.id

ABSTRACT

Badan Pusat Statistik reported that rice production in 2019 decreased by 2.63 million tons (7.75 percent) when compared to 2018 production. Efforts to increase national rice production can be made by utilizing swamp land as rice production land. The high concentration of Fe in swamp land is an obstacle in its utilization. Selection of iron stress tolerant rice strains using molecular markers is needed because it is fast and efficient. The purpose of this study was to determine the iron stress tolerant swamp rice strains and the relationship of tolerance levels in rice strains based on SSR (Simple Sequence Repeats) and SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markers. This research was conducted at the Laboratory of Plant Physiology Fakultas MIPA, Universitas Negeri Jakarta in January-July 2022. This study used a factorial completely randomized design (CRD) with two factors, namely 4 rice strains and 2 FeSO₄ concentrations (0 and 1600 ppm). Phenotypic data were analyzed using ANOVA and Sensitivity Index. The results showed that the rice strains tolerant to 1600 ppm FeSO₄ stress was Siam Saba. Four of the 11 SSR markers used showed polymorphism, namely RM 125, RM 180, RM 320, RM 336. Cluster analysis showed that 4 rice strains were divided into 2 main groups with a similarity coefficient of 0.66. The first group consists of swamp rice (Siam Saba and Siam Tanggung) and the second group consists of paddy rice (Ciherang and INPARI 34). Analysis with SNP markers showed 12 SNP points. There was a deletion mutation at position 1007 bp and an insertion mutation at position 1151 bp.

Keywords: Rice, FeSO₄, SSR, SNP

PENDAHULUAN

Padi (*Oryza sativa* L.) merupakan tanaman yang dijadikan sumber karbohidrat utama bagi kebanyakan masyarakat dunia, khususnya Asia dan berperan sebesar 60% dalam memenuhi kebutuhan kalori dunia (Bishwajit *et al.*, 2013). Menurut Badan Pusat Statistik (2020), produksi padi pada 2019 mencapai 31,31 juta ton dengan produksi tertinggi terjadi pada bulan Maret yaitu sebesar 9,17 juta ton dan produksi terendah terjadi pada bulan Desember yaitu sebesar 1,70 juta ton. Angka produksi padi 2019 jika dibandingkan dengan produksi tahun 2018 mengalami penurunan sebesar 2,63 juta ton atau sekitar 7,75%. Untuk menghindari terjadinya penurunan produksi padi maka diperlukan upaya untuk meningkatkan produksi padi nasional.

Upaya peningkatan produksi padi nasional dapat dilakukan dengan memanfaatkan lahan suboptimal sebagai lahan produksi. Salah satu sumber lahan suboptimal yang belum dimanfaatkan secara optimal adalah lahan rawa pasang surut. Lahan rawa pasang surut merupakan salah satu sumber daya lahan yang mempunyai potensi cukup baik untuk pembangunan pertanian khususnya

untuk tanaman pangan (Haryono, 2013). Lahan rawa pasang surut di Indonesia, sebagian besar terdapat di tiga pulau yaitu Sumatera, Kalimantan, Papua, dan sedikit di Sulawesi (Subagyo, 2006). Pemanfaatan lahan rawa pasang surut sebagai areal produksi padi memiliki beberapa tantangan, salah satunya adalah tingginya konsentrasi Fe.

Konsentrasi Fe yang tinggi pada tanah akan menyebabkan padi mengalami keracunan yang dapat menyebabkan terhambatnya pertumbuhan dan perkembangan padi sehingga menurunkan hasil panen hingga 30-70%. Bahkan jika keracunan terjadi pada tahap pembibitan maka gagal panen tidak dapat dihindari (Asch *et al.*, 2005). Padi yang mengalami keracunan Fe memiliki ciri-ciri adanya bercak-bercak kecil berwarna coklat (*bronzing*) pada daun yang berawal dari pinggir daun kemudian berkembang dan menyebar ke pangkal dan berubah warna menjadi coklat, ungu, kuning atau oranye, kemudian mati. Pertumbuhan dan pembentukan anakan akan terhambat, sistem perakarannya menjadi jarang atau sedikit, kasar, dan berwarna coklat gelap atau membusuk (Sayam *et al.*, 2007).

Mekanisme utama dalam penyerapan Fe pada tanaman dibagi menjadi dua, yaitu Strategi I dan Strategi II. Strategi I dilakukan oleh tanaman dikotil dan monokotil non-Graminae, dimana terjadi reduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} pada permukaan akar serta penyerapan Fe^{2+} melewati plasma membran. Gen yang terlibat dalam Strategi I adalah *ferric-chelate reductase oxidase* (FRO2) (Robinson *et al.*, 1999) dan *iron-regulated transporter* (IRT1) (Eide *et al.*, 1996). Strategi II dilakukan oleh tanaman Graminae, dimana responnya tergantung pada biosintesis dan sekresi MA (*Mugenic acid*). *Mugenic acid* disintesis melalui jalur *S-adenosyl-L-metionin*. Jalur ini mencakup tiga reaksi enzimatik berurutan yang dimediasi oleh *nicotianamine synthase* (NAS), *nicotianamine aminotransferase* (NAAT), dan *deoxymugineic acid synthase* (DMAS). Meskipun padi merupakan tanaman Graminae dengan kondisi lingkungan tanam yang berada pada lahan basah, tanaman padi dapat juga mengikuti Strategi I yang melibatkan FRO2 dan IRT1 untuk penyerapan zat besi (Higuchi *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 1999; Bashir *et al.*, 2006; Morrissey & Gueriot, 2009).

Gen IRT dalam mekanisme penyerapan Fe berperan dalam mekanisme *partitioning* Fe^{2+} ke beberapa bagian tanaman yang berbeda sehingga tanaman dapat lebih toleran pada kondisi Fe^{2+} yang berlebihan. Gen IRT pada padi telah teridentifikasi sebagai gen OsIRT, yang merupakan gen pengode protein *transporter* Fe^{2+} (Eng *et al.*, 1998; Gueriot, 2000; MacDiarmid *et al.*, 2000; Rogers *et al.*, 2000). Ekspresi dari gen OsIRT terjadi pada daun dan batang saat kadar Fe berlebih, sedangkan ekspresi gen OsIRT terjadi pada akar saat kadar Fe terbatas (Connolly *et al.*, 2002; Ishimaru *et al.*, 2006).

Toleransi keracunan Fe merupakan sifat kompleks yang dikendalikan oleh banyak gen, oleh karena itu identifikasi marka molekuler yang berasosiasi dengan sifat toleransi Fe penting dalam pengembangan marka molekuler. Hal ini dapat dilakukan dengan membandingkan data pengujian fenotip pada galur uji yang ditanam di lapang berkadar Fe tinggi dengan data hasil analisis marka molekuler. Pada penelitian ini analisis molekuler diuji menggunakan marka SSR (*Simple Sequence Repeats*) dan marka SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) untuk mencari alel-alel potensial terkait sifat toleransi cekaman besi yang tersebar di seluruh kromosom padi. Penelitian kepekaan terhadap keracunan Fe pada padi menggunakan marka SSR sebelumnya dilakukan oleh Onaga *et al.* (2013) menggunakan 2 galur dari Brazil, 8 galur dari Afrika Barat dan 10 galur dari Uganda. Hasil penelitian menunjukkan perbedaan antara galur yang resisten dan rentan di kedua fenotip dan *dataset* SSR menunjukkan adanya alel unik yang dapat dimanfaatkan untuk perbaikan padi terhadap keracunan besi.

Arianda (2018) telah melakukan penelitian mengenai seleksi toleransi pada 16 galur padi rawa terhadap cekaman besi. Galur padi toleran yang didapatkan dari hasil dari penelitian Arianda (2018) adalah Siam Saba. Seleksi berdasarkan fenotip membutuhkan waktu yang relatif lama, oleh

karena itu diperlukan cara seleksi yang lebih cepat dan efisien untuk menghasilkan galur padi rawa toleran cekaman besi. Cara seleksi yang cepat dan efisien adalah dengan menggunakan marka molekular, dalam penelitian ini menggunakan SSR dan SNP. Pada penelitian ini digunakan 2 galur padi rawa, yaitu Siam Saba dan Siam Tanggung, serta 2 padi sawah, yaitu INPARI 34 dan Ciherang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kekerabatan genetik antar galur padi dan mengetahui variasi gen IRT antar galur padi.

METODE PENELITIAN

Sebanyak 16 sampel daun padi yang diambil dari 4 galur \times 2 perlakuan \times 2 pengulangan ditimbang masing-masing seberat 100 mg, kemudian dibekukan dengan nitrogen cair. Sampel yang sudah beku digiling sampai halus kemudian dipindahkan ke tabung *microcentrifuge* 1,5 ml. Sebanyak 400 μ l *buffer* GPX1 dan 5 μ l RNase A dimasukkan ke dalam tabung sampel kemudian dihomogenisasi, lalu diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Selama proses inkubasi, tabung sampel dibalik setiap 5 menit. Ditambahkan 100 μ l *buffer* GP2 dan divortex, kemudian diinkubasi di atas es selama 3 menit. Kolom filter ditempatkan ke dalam tabung pengumpul 2 ml kemudian campuran dipindahkan ke kolom filter. Disentrifugasi selama 1 menit pada 1.000 \times g kemudian kolom filter dibuang. Supernatan dipindahkan dari tabung pengumpul 2 ml ke tabung *microcentrifuge* 1,5 ml yang baru. Ditambahkan 1,5 volume *buffer* GP3 (pastikan *isopropanol* sudah ditambahkan) lalu segera dihomogenisasi selama 5 detik. Kolom GD ditempatkan di dalam tabung pengumpul 2 ml kemudian sebanyak 700 μ l campuran (dan endapan yang tersisa) dipindahkan ke kolom GD dan disentrifugasi pada 15.000 \times g selama 2 menit. *Flow-through* dibuang kemudian ditempatkan kembali kolom GD di tabung pengumpul 2 ml. Ditambahkan sisa campuran ke kolom GD lalu disentrifugasi pada 15.000 \times g selama 2 menit. *Flow-through* dibuang kemudian tempatkan kembali kolom GD di tabung pengumpul 2 ml. Sebanyak 400 μ l *buffer* W1 dimasukkan ke kolom GD kemudian sentrifugasi pada 15.000 \times g selama 30 detik. *Flow-through* dibuang kemudian ditempatkan kembali kolom GD di tabung pengumpul 2 ml. Sebanyak 600 μ l *Wash Buffer* (pastikan etanol ditambahkan) ditambahkan ke kolom GD. Disentrifugasi pada 15.000 \times g selama 30 detik. *Flow-through* dibuang kemudian ditempatkan kembali kolom GD di tabung pengumpul 2 ml. Disentrifugasi selama 3 menit pada 15.000 \times g untuk mengeringkan matriks kolom. Penghapusan pigmen residual opsional dilakukan jika pigmen tetap berada di kolom, lakukan langkah opsional ini. Setelah penambahan *Wash Buffer*, ditambahkan 400 μ l etanol absolut ke kolom GD. Disentrifugasi pada 15.000 \times g selama 30 detik. *Flow-through* dibuang kemudian ditempatkan kembali kolom GD di tabung pengumpul 2 ml. Disentrifugasi selama 3 menit pada 15.000 \times g untuk mengeringkan matriks kolom. Kolom GD kering dipindahkan ke tabung *microcentrifuge* 1,5 ml bersih. Sebanyak 100 μ l *Elution Buffer* atau TE yang telah dipanaskan sebelumnya dipindahkan ke tengah matriks kolom. Didiamkan selama 3-5 menit untuk memastikan *Elution Buffer* atau TE benar-benar terserap. Disentrifugasi pada 15.000 \times g selama 30 detik untuk melulusi DNA yang dimurnikan.

Kualitas DNA diuji menggunakan elektroferesis pada gel agarose 1% dalam larutan penyangga 1 \times TBE pada tegangan 100 volt selama 60 menit, kemudian divisualisasi dengan menggunakan sinar UV. Uji kuantitas DNA yaitu kemurnian DNA dan konsentrasi DNA dihitung menggunakan spektrofotometer *NanoDrop*. Kemurnian DNA dihitung berdasarkan absorbansi cahaya pada panjang gelombang (λ) 260 nm. Kemurnian DNA diketahui melalui perbandingan nilai absorbansi cahaya pada λ 260 nm dengan nilai absorbansi cahaya pada λ 280 nm ($\text{\AA}260/\text{\AA}280$). DNA yang murni memiliki nilai perbandingan yang berkisaran antara 1.8-2.0 (Fatchiyah, 2011).

Amplifikasi DNA menggunakan PCR dilakukan dengan marka SSR yang mengacu pada penelitian Dufey *et al.* (2015) dan Temnykh *et al.* (2000) serta menggunakan reagen MyTaq HS Red Mix. Setiap reaksi PCR mengandung 200 ng DNA template, 20 μ M primer reverse dan forward, MyTaq HS Red Mix 25 μ L dan 50 μ L air (H₂O). Siklus PCR terdiri dari denaturasi awal pada 94°C selama 1 menit, diikuti oleh 35 siklus (94°C selama 15 detik untuk denaturasi, 55-67°C selama 15 detik untuk penempelan primer, dan langkah ekstensi akhir pada 72°C selama 10 detik). Produk PCR dipisahkan pada elektroforesis gel agarosa 0,8% dalam 1x TBE pada tegangan 100 volt selama 60 menit dan dilihat pada *trans-illuminator* UV.

Tabel 1. Marka SNP Gen *IRT*

Nama	Sekuens	Produk PCR (bp)
IRT 3	F: CTCTCTCTCTCCGTCCTTAA R: CGATTCGGCTCTTTCTTCTA	339

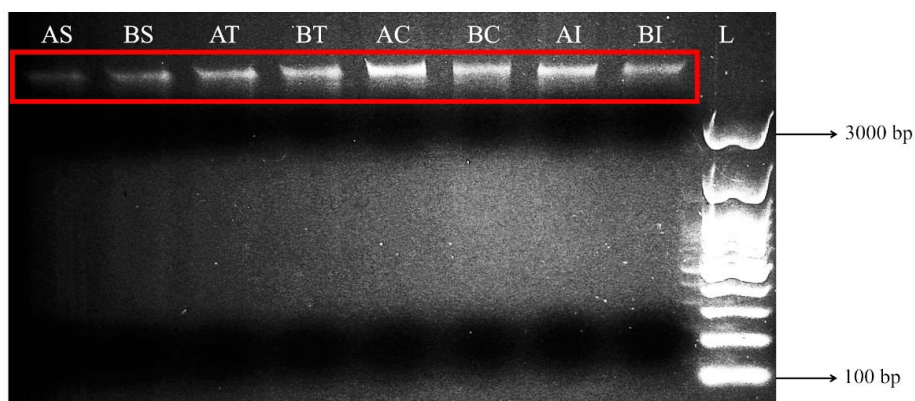
Deteksi SNP dilakukan menggunakan PCR dengan primer yang telah didesain menggunakan Primer3 (**Tabel 1**). Siklus PCR terdiri dari denaturasi awal pada 94°C selama 1 menit, diikuti 35 siklus yang terdiri dari tiga tahap: (1) denaturasi dengan suhu 94°C selama 15 detik, (2) *annealing* dengan suhu 57-60°C selama 15 detik, dan (3) ekstensi akhir dengan suhu 72°C selama 10 detik. Hasil PCR dengan primer SNP tersebut kemudian disekuensing dengan menggunakan penyedia jasa sekuensing dari perusahaan 1st Base.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Kualitas DNA

Uji kualitas DNA dilakukan dengan elektroforisis genom. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan gel agarosa 1%. Prinsip elektroforesis menurut Fritsch *et al.* (2003) adalah migrasi dan pemisahan partikel bermuatan (ion) di bawah pengaruh medan listrik. Sistem elektroforesis terdiri dari dua elektroda dengan muatan berlawanan (anoda, katoda), dihubungkan oleh media penghantar yang disebut elektrolit. Efek pemisahan pada partikel ionik dihasilkan dari perbedaan kecepatannya (v), yang merupakan hasil antara mobilitas partikel (m) dan kekuatan medan listrik (E). Dalam hal ini DNA yang bermuatan negatif akan bergerak menuju ke arah kutub positif. Hasil elektroforesis ditandai dengan munculnya band pada gel agarosa.

Hasil elektroforesis genom pada penelitian ini ditunjukkan pada **Gambar 1** dimana pita DNA muncul pada semua *well* sampel yang diuji. Pita-pita tersebut berukuran lebih dari 3000 bp, hal tersebut sesuai dengan ukuran genom padi, yaitu 420 Mbp (Yu, 2002).



Gambar 1. Hasil visualisasi elektroforesis uji kualitatif 4 galur padi pada gel agarosa 1%

Struktur Kuantitas DNA

Setelah tahap isolasi dilakukan, tahap berikutnya yang dilakukan adalah uji kuantitas dan kualitas DNA. Uji kuantitas DNA dilakukan untuk mengetahui kemurnian dan konsentrasi DNA. Hasil pada **Tabel 2** menunjukkan sampel dengan kemurnian DNA tertinggi adalah sampel AI (2.02) dan sampel dengan kemurnian DNA terendah adalah BI (1.56). DNA dengan kemurnian yang baik memiliki nilai perbandingan A260/A280 berkisar antara 1.8-2.0. Jika nilai perbandingan A260/A280 kurang dari 1.8 menunjukkan bahwa hasil isolasi DNA terkontaminasi protein atau senyawa organik lain saat isolasi. Sedangkan jika nilai perbandingan A260/A280 lebih dari 2.0 hasil isolasi DNA mengandung kontaminan berupa fenol (Sambrook & Maniatis, 1989). Fenol yang memiliki serapan maksimal pada gelombang 270 nm mampu memberikan serapan kecil pada panjang gelombang 260 nm (Linacero *et al.*, 1998).

Pengukuran konsentrasi DNA dilakukan untuk mengetahui banyak sedikitnya DNA dalam sampel. Hasil pada **Tabel 2** menunjukkan bahwa sampel dengan kode BS adalah sampel yang memiliki konsentrasi tertinggi, yaitu 26.79 ng/ μ L dan sampel dengan konsentrasi terendah adalah BC (4.10 ng/ μ L).

Tabel 2. Kemurnian dan konsentrasi DNA

Kode Sampel	Kemurnian 260/280	Konsentrasi (ng/ μ L)
AS	1.73	22.55
AT	1.98	15.08
AC	1.90	11.87
AI	2.02	6.59
BS	1.68	26.79
BT	1.81	13.97
BC	1.96	4.10
BI	1.56	8.02

Keterangan:

- Huruf pertama pada kode sampel adalah konsentrasi perlakuan FeSO₄. A= 0 ppm, B= 1600 ppm
- Huruf kedua pada kode sampel adalah nama galur padi. S= Siam Saba, T= Siam Tanggung, C= Ciherang, I= INPARI 34.

Polymerase Chain Reaction (PCR) Marka SNP

Proses analisis PCR marka SNP dimulai dengan mendesain primer SNP untuk gen *IRT* pada padi. Desain primer diawali dengan mencari urutan gen *IRT*. Urutan gen *IRT* diperoleh dari hasil pencarian di *GenBank* (NCBI), kemudian urutan gen tersebut disimpan dalam format FASTA. Pada penelitian ini kandidat primer yang akan digunakan untuk amplifikasi gen *IRT* didesain dengan menggunakan *Primer3*. Urutan gen *IRT* dalam format FASTA kemudian diunggah ke *Primer3* yang kemudian akan diperoleh beberapa pasang primer kandidat yang akan digunakan.

Tahap selanjutnya adalah melakukan uji similaritas pada kandidat primer yang bertujuan untuk mengetahui apakah kandidat primer tersebut mampu mengamplifikasi gen *IRT* secara spesifik. Uji similaritas dilakukan dengan menggunakan fitur *Nucleotide BLAST*. Kandidat primer diunggah kemudian diperoleh kesamaan dengan urutan gen yang ada pada *GenBank* (NCBI). Hasil *Nucleotide BLAST* primer yang terlihat pada **Gambar 2** menunjukkan bahwa primer spesifik terhadap gen *IRT* padi.

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTCTCTCTCCGTCCTTAA	20	55.13	50.00	4.00	4.00
Reverse primer	CGATTGGGCTCTTTCTTA	20	55.02	45.00	5.00	2.00
Products on target templates						
>NC_029262.1 Oryza sativa Japonica Group cultivar Nipponbare chromosome 7, IRGSP-1.0						
product length = 339						
Features associated with this product:						
zinc transporter 8						
Forward primer	1	CTCTCTCTCCGTCCTTAA	20			
Template	7395396	7395415			
Reverse primer	1	CGATTGGGCTCTTTCTTA	20			
Template	7395734	7395715			

Gambar 2. Hasil Nucleotide BLAST primer IRT dimana urutan nukleotida primer IRT menempel spesifik pada *O. sativa Japonica Group cultivar Nipponbare chromosome 7*

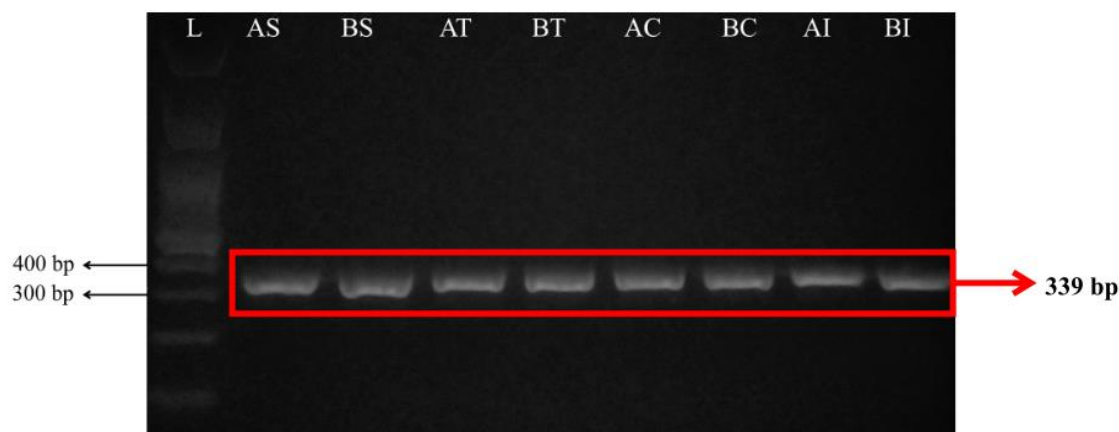
Analysis Results #1: CTCTCTCTCCGTCCTTAA			
Rating	: 89.0		
Molecular Wt	: 5929.96		
Tm	: 51.05 °C		
GC%	: 50.0		
GC Clamp	: 1		
nmol/A ₂₆₀	: 5.97		
ug/A ₂₆₀	: 35.4		
ΔG	: -30.48 kcal/mol		
3' end stability	: -6.45	kcal/mol	
ΔH	: -145.0	kcal/mol	
ΔS	: -0.38	kcal/°K/mol	
5' end ΔG	: -6.35	kcal/mol	
Self Dimer (ΔG)	: -5.85	kcal/mol	
Hairpin (ΔG)	:	kcal/mol	
Repeats (# of pairs)	: 5	kcal/mol	
Run (# of bases)	:	kcal/mol	
Analysis Results #2: CGATTGGGCTCTTTCTTA			
Rating	: 100.0		
Molecular Wt	: 6025.01		
Tm	: 55.15 °C		
GC%	: 45.0		
GC Clamp	: 1		
nmol/A ₂₆₀	: 5.74		
ug/A ₂₆₀	: 34.59		
ΔG	: -33.41 kcal/mol		
3' end stability	: -6.08	kcal/mol	
ΔH	: -156.1	kcal/mol	
ΔS	: -0.41	kcal/°K/mol	
5' end ΔG	: -8.61	kcal/mol	
Self Dimer (ΔG)	:	kcal/mol	
Hairpin (ΔG)	:	kcal/mol	
Repeats (# of pairs)	:	kcal/mol	
Run (# of bases)	: 3	kcal/mol	
Cross Dimer (ΔG)	:	kcal/mol	

Gambar 3. Analisis struktur sekunder primer IRT3 pada NetPrimer

Tahap berikutnya adalah analisis struktur sekunder pada kandidat primer. Pada penelitian ini analisis struktur sekunder dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *NetPrimer* (**Gambar 3**). Dalam mendesain primer perlu memperhatikan beberapa parameter, seperti panjang primer dan *temperature melting*. Primer dengan desain yang kurang baik berpengaruh pada hasil PCR seperti sedikit atau bahkan tidak ada produk yang dihasilkan karena amplifikasi non-spesifik. Parameter yang perlu diperhatikan saat mendesain primer menurut Garg *et al.* (2008), yaitu:

- Panjang primer (*primer length*) yang baik untuk amplifikasi berkisar pada 18-30 nukleotida.
- Temperature melting* (Tm) pada primer yang baik berada pada rentang 50-65°C. Primer dengan Tm diatas 65°C berpotensi menyebabkan terjadinya *secondary annealing*.
- Presentase *GC content* pada primer ideal berada pada kisaran 45-60%. *GC content* lebih dari 60% akan mempersulit pemutusan rantai utas ganda pada primer. Sedangkan *GC content* yang kurang dari 45% menyebabkan penurunan efisiensi PCR.
- Struktur sekunder berupa *hairpin* dan *self-dimer*. *Hairpin* merupakan kondisi saat ujung-ujung pada primer saling berkomplemen. Sedangkan *self-dimer* adalah kondisi dimana primer berkomplemen dengan primer lain. Struktur sekunder menyebabkan menurunnya efisiensi PCR.

Hasil desain primer pada penelitian ini adalah kandidat primer memiliki panjang primer 20 nukleotida, T_m pada kandidat primer adalah 55°C , presentase GC content 50% pada primer *forward* dan 45% pada primer *reverse*. **Gambar 3** menunjukkan bahwa primer *reverse* tidak memiliki struktur sekunder berupa *hairpin* dan *self-dimer*, sedangkan primer *forward* memiliki *self-dimer* dengan nilai ΔG -5.85 kcal/mol. Nilai tersebut masih dapat ditoleransi karena nilai ΔG maksimum pada *self-dimer* adalah -9 kcal/mol (Thornton & Basu, 2015).



Gambar 4. Hasil visualisasi elektroforesis produk PCR primer IRT pada gel agarosa 0.8%. (L) DNA Ladder; (AS) Siam Saba FeSO_4 0 ppm; (BS) Siam Saba FeSO_4 1600 ppm; (BT) Siam Tanggung FeSO_4 0 ppm; (AC) Cihreang FeSO_4 0 ppm; (BC) Cihreang FeSO_4 1600 ppm; (AI) INPARI 34 FeSO_4 0 ppm; (BI) INPARI 34 FeSO_4 1600 ppm.

Setelah kandidat primer diperoleh, tahap selanjutnya adalah PCR. Amplifikasi dilakukan pada 8 sampel yang terdiri dari 4 galur padi dengan masing-masing galur diberi perlakuan FeSO_4 0 ppm dan 1600 ppm. Hasil PCR kemudian divisualisasi dengan elektroforesis pada gel agarosa 0.8% (**Gambar 4**). Elektroforegram menunjukkan bahwa PCR menghasilkan *single band* dengan ukuran sekitar 339 bp.

DAFTAR PUSTAKA

- Asch F, Becker M, Kpongor DS. 2005. A quick and efficient screen for tolerance to iron toxicity in lowland rice. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168: 764-773. <https://doi.org/10.1002/jpln.200520540>
- Audebert A, Sahrawat KL. 2000. Mechanisms for iron toxicity tolerance in lowland rice. *J. Plant Nutr.* 23: 1877-1885. <https://doi.org/10.1080/01904160009382150>
- Audebert A. 2006. *Iron partitioning as a mechanism for iron toxicity tolerance in lowland rice*. Cotonou: WARDA [Africa Rice Center].
- Becker M, Asch F. 2005. Iron toxicity in rice—conditions and management concepts. *J Plant Nutr Soil Sci.* 168(4), 558–573. <https://doi.org/10.1002/jpln.200520504>
- Badan Pusat Statistik (BPS). 2020. Luas Panen dan Produksi Padi di Indonesia 2019. <https://www.bps.go.id/pressrelease/2020/02/04/1752/luas-panen-dan-produksi-padi-pada-tahun-2019-mengalami-penurunan-dibandingkan-tahun-2018-masing-masing-sebesar-6-15-dan-7-76-persen.html>.
- Colangelo EP, Guerinot ML. 2004. The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *Plant Cell* 16: 3400–3412. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.024315>

- Connolly EL, Fett JP, Guerinot ML. 2002. Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* 14: 1347-1357. <https://doi.org/10.1105/tpc.001263>
- Dobermann A, Fairhurst T. 2000. *Rice: Nutrient Disorders & Nutrient Management*. Philippines: International Rice Research Institute.
- Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML. 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 5624-5628. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5624>
- Finatto T, Oliveira ACD, Chaparro C, Maia LCD, Farias DR, Woyann LG, Mistura CC, Soares-Bresolin AP, Llauro C, Panaud O, Picault N. 2015. Abiotic stress and genome dynamics: specific genes and transposable elements response to iron excess in rice. *Rice* 8:13. <https://doi.org/10.1186/s12284-015-0045-6>
- Guerinot ML, Yi Y. 1994. Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol.* 104: 815-820. <https://doi.org/10.1104%2Fpp.104.3.815>
- Guerinot ML. 2000. The ZIP Family of Metal Transporter. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1465: 190-198. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00138-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00138-3)
- Haryono, Muhammad N, Haris S, Muhrizal S. 2013. *Lahan Rawa Penelitian dan Pengembangan*. Bogor: IAARD Press.
- International Rice Research Institut. 2013. *Standard Evaluation System for Rice (5th ed.)*. Manila: International Rice Research Institut.
- Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, Suzuki K, Nakazono M, Kobayashi T, Wada Y. 2006. Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *Plant J.* 45: 335-346. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02624.x>
- Kobayashi T, Nakanishi H, Nishizawa NK. 2010. Recent insights into iron homeostasis and their application in graminaceous crops. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 86: 900-913. <https://doi.org/10.2183/pjab.86.900>
- Liu K, Muse SV. 2005. PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic maker analysis. *Bioinformatics* 21(9): 2128-2129. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti282>
- Makarim AK, Suhartatik E. 2015. *Morfologi dan Fisiologi Tanaman Padi*. Bogor: Balai Besar Penelitian Tanaman Padi.
- Mehbaran P, Zadeh A, Sadeghipour HR. 2008. Iron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) under different potassium nutrition. *Asian J. of Plant Sci.* 7:1-9
- Nei M, Tajima F, Tateno Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *Journal of Molecular Evolution* 19(2): 153-170.
- Nugraha Y, Ardie SW, Suwarno S; Aswidinnoor H. 2016. Nutrient culture media with agar is effective for early- and rapid- screening of iron toxicity tolerant in rice. *J Crop Sci Biotech.* 19(1): 61-70.
- Onaga G, Egdane J, Edema R, Abdelbagi I. 2013. Morphological and Genetic Diversity Analysis of Rice Accessions (*Oryza sativa* L.) Differing in Iron Toxicity Tolerance. *J. Crop Sci. Biotech.* 16(1): 53-62.
- Pereira EG, Oliva MA, Rosado-Souza L, Mendes GC, Colares DS, Stopato CH, Almeida AM. 2013. Iron excess affects rice photosynthesis through stomatal and non-stomatal limitations. *Plant Sci.* 201-202:

81-92. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.12.003>

- Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML. 1999. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 397: 694-697.
- Sahrawat KL. 2000. Elemental composition of the rice plant as affected by iron toxicity under field conditions. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 31: 2819-2827. <https://doi.org/10.1080/00103620009370630>
- Sahrawat KL. 2004. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. *J. Plant Nutri.* 27:1471-1504. <https://doi.org/10.1081/PLN-200025869>
- Sayam M, Suparyono, Hermanto, Wuryandari D. 2007. Masalah Lapang Hama, Penyakit, dan Hara pada Padi. Bogor: Puslitbang Tanaman Pangan dengan beberapa Balai Pengkajian Teknologi Pertanian dan IRRI.
- Siegbahn PEM. 2004. The catalytic cycle of catechol oxidase. *J Biol Inorg Chem* 9: 577-590.
- Siregar H. 1978. *Budidaya Tanaman Padi di Indonesia*. Bogor: Sastra Hudaya.
- Sperotto RA, Boff T, Duarte GL, Santos LS, Grusak MA and Fett JP. 2010. Identification of putative target genes to manipulate Fe and Zn concentrations in rice grains. *J Plant Physiol* 167:1500-1506. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.05.003>
- Subagyo H. 2006. *Klasifikasi dan Penyebaran Lahan Rawa*. In *Karakteristik dan Pengelolaan Lahan Rawa*. Bogor: Balai Besar Litbang Sumberdaya Lahan Pertanian.
- Suhartini T, Suwarno, Syafaruddin. 1996. Pendugaan parameter genetik toleran keracunan besi pada padi sawah melalui analisis dialel. *Jurnal Pemuliaan Indonesia* 7(1).
- Tanaka A, Loe R, Navasero SA. 1966. Soil Science and plant nutrition some mechanisms involved in the development of iron toxicity symptoms in the rice plant. *Soil Science and Plant Nutrition* 12(4). <https://doi.org/10.1080/00380768.1966.10431951>
- Yoshida S. 1981. *Fundamentals of Rice Crop Science*. Philippines: The International Rice Research Institute.