

Varietas Padi Lokal Jawa Timur Tahan Cekaman Kekeringan Berdasarkan Gen *DREB2A*

Yudrik Lathif¹⁾, Dwi Listyorini^{1,3)}, Suharti^{2,3)*}

¹⁾Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Malang, Jl. Semarang 5 Malang, Indonesia

²⁾Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Malang, Jl. Semarang 5 Malang, Indonesia

³⁾Laboratorium Sentral Mineral dan Material Maju, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Malang, Jl. Semarang 5 Malang, Indonesia

^{*)}Alamat Korespondensi: suharti.fmipa@um.ac.id

ABSTRAK

Padi (*Oryza sativa* L.) adalah tanaman pangan utama masyarakat Indonesia. Masalah kekeringan dalam upaya penanaman padi adalah hal yang biasa di kalangan petani. Penelitian tahan cekaman kekeringan pada padi perlu dilakukan untuk mengatasi masalah ketersediaan pangan. Sifat tahan cekaman kekeringan pada tanaman salah satunya dikendalikan oleh gen *DREB2A*. Varietas padi lokal Indonesia untuk tahan cekaman kekeringan belum banyak diteliti. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari varietas padi lokal Jawa Timur yang tahan terhadap cekaman kekeringan menggunakan gen *DREB2A*, yang diisolasi menggunakan primer *forward* 5'-CCT CAT TGG GTC AGG AAG AA-3' dan primer *reverse* 5'-GGA TCT CAG CCA CCC ACT TA-3'. Penelitian ini menggunakan tiga varietas padi lokal, yaitu Berlian dan SOJ A3, keduanya dari Banyuwangi, dan varietas Jawa dari Malang. Isolasi DNA total dilakukan mengikuti protokol Kit Macherey-Nagel. Amplifikasi gen *DREB2A* dilakukan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Fragmen gen *DREB2A* berhasil diamplifikasi sepanjang 239 bp (varietas Berlian), 239 bp (varietas SOJ A3), dan 240 bp (varietas Jawa). Analisis sampel gen *DREB2A* varietas padi lokal Jawa Timur menunjukkan hilangnya kemampuan gen *DREB2A* dari varietas Jawa untuk mengikat *cis-regulator* elemen promotor gen target.

Kata kunci: cekaman kekeringan, varietas padi lokal, Gen *DREB2A*, domain ERF/AP2

East Java Local Rice Varieties Resistant to Drought Based on *DREB2A* Genes

Yudrik Lathif¹⁾, Dwi Listyorini^{1,3)}, Suharti^{2,3)*}

¹⁾Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, State University of Malang, Jl. Semarang 5 Malang, Indonesia

²⁾Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, State University of Malang, Jl. Semarang 5 Malang, Indonesia

³⁾Central Laboratory of Mineral and Advanced Material, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, State University of Malang, Jl. Semarang 5 Malang, Indonesia

^{*)}Email: suharti.fmipa@um.ac.id

ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) is a staple food for Indonesia people. The problem of drought is common among rice farmers. Drought-resistant rice needs to be developed to deal that problem. Drought-resistance in plants is controlled one of them by the *DREB2A* gene. So far, there is very limited study about this matter. This study was aimed to find local rice varieties that have drought-resistance using the *DREB2A* gene, which was isolated using a 5'-CCT CAT GG AGG AAG AA-3' forward primer and 5'-GGA TCT CAG CCA ACT CCC TA-3' reverse primer. Three local rice varieties, namely Berlian and SOJ A3, both were from Banyuwangi, and Jawa variety from Malang. Total DNA isolation was carried out following the protocol of Macherey-Nagel Kit. *DREB2A* gene amplification was carried out using the *Polymerase Chain Reaction* (PCR) method. The 239 bp (varieties of Berlian), 239 bp (varieties of SOJ A3), and 240 bp (varieties of Jawa) of *DREB2A* gene fragment were successfully amplified.

Analysis of *DREB2A* gene samples of east Java local rice varieties, showing loss of ability of the *DREB2A* gene from Jawa varieties to bind cis-regulator elements target gene promoters.

Keywords: drought stress, local rice varieties, Gen *DREB2A*, ERF/AP2 domain

PENDAHULUAN

Padi (*Oryza sativa* L.) merupakan tanaman yang menghasilkan beras sebagai makanan pokok masyarakat Indonesia [1]. Pertumbuhan jumlah penduduk yang terus meningkat [2], menjadi tantangan pemerintah untuk mengembangkan bidang pertanian dalam menjamin ketersediaan pangan. Permasalahan umum bidang pertanian dalam penanaman padi adalah kekeringan [3], yang terjadi di beberapa daerah Indonesia [4] atau pada musim kemarau [3].

Indonesia memiliki berbagai macam varietas padi lokal yang belum banyak diteliti [5]. Penelitian varietas padi lokal Indonesia tentang tahan cekaman kekeringan penting dilakukan untuk mencari varietas padi yang berpotensi menghadapi tantangan pemerintah dalam menjamin ketersediaan pangan. Cekaman kekeringan pada tanaman salah satunya dikendalikan oleh gen *DREB2* [6]. Homologi gen *DREB2* pada padi adalah *DREB2A* [7]. Protein DREB2A adalah faktor transkripsi penting untuk mengatur banyak ekspresi gen responsif kekeringan [8]. Beberapa gen target DREB2A yaitu *MT2A*, *At1g69870*, *At3g53990*, *At1g22985*, *RD29A*, *LEA14*, *At2g23120* [9], *RD29B*, *At1g52690*, *RD17* [9][10], *AtHsfA3*, *HSP18.2*, dan *Hsp70* [10].

Pentingnya gen *DREB2A* sebagai *regulator* berbagai macam gen responsif kekeringan, menjadikannya sebagai gen penanda tahan cekaman kekeringan. Penelitian ini menggunakan tiga varietas padi lokal asal Jawa timur, yaitu varietas Jawa dari kabupaten Malang, varietas Berlian dan SOJ A3 dari kabupaten Banyuwangi. Hasil penelitian ini diharapkan memberikan sumbangan informasi dalam mencari varietas padi lokal tahan cekaman kekeringan berdasarkan gen *DREB2A*.

METODE PENELITIAN

Isolasi DNA total. Isolasi DNA total dilakukan mengikuti protokol Macherey-Nagel Kit. Hasil isolasi DNA total diuji secara

kuantitatif untuk melihat kemurnian dan konsentrasinya menggunakan Nanodrop. DNA total hasil isolasi digunakan sebagai *template* amplifikasi gen *DREB2A* menggunakan mesin *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Amplifikasi gen *DREB2A* menggunakan primer *forward* 5'-CCT CAT TGG GTC AGG AAG AA-3' dan primer *Reverse* 5'-GGA TCT CAG CCA CCC ACT TA-3' [11-12]. Proses amplifikasi dilakukan dengan suhu pradenaturasi 94°C selama 5 menit, diikuti 35 siklus, yaitu denaturasi 94°C selama 1 menit, kemudian *annealing* 59°C selama 2 menit dan *extension* 72°C selama 2 menit, serta *extension* untuk langkah terakhir pada 72°C selama 10 menit [12]. Keberhasilan proses amplifikasi di analisis dengan menggunakan elektroforesis. Gen *DREB2A* yang berhasil diamplifikasi dikirim ke 1st Base Malaysia untuk proses sekuensing.

Analisis data sekuen. Analisis data sekuen hasil sekuensing dimulai dengan membaca dan *editing* sekuen gen *DREB2A* sampel varietas padi lokal Jawa Timur, menggunakan program aplikasi FinchTV dan BioEdit. Sekuen konsensus dibuat dengan menggabungkan sekuen *forward* dan *reverse* sampel menggunakan program aplikasi DNAbaser. Konfirmasi sekuen *DREB2A* hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan program BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) untuk menyocokkan homologi sekuen sampel hasil isolasi dengan *database* di Genbank. Analisis dilanjutkan dengan *alignment* sekuen sampel dengan sekuen pembandingan yang diperoleh dari hasil BLAST menggunakan program aplikasi ClustalX.

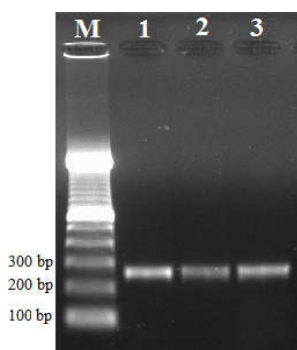
Analisis gen *DREB2A*. Analisis gen *DREB2A* diawali dengan menerjemahkan sekuen nukleotida sampel varietas padi lokal Jawa Timur dan sekuen nukleotida pembandingan menjadi sekuen protein DREB2A menggunakan aplikasi BioEdit. Sekuen protein DREB2A sampel dan pembandingan dianalisis menggunakan program Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) untuk

memperoleh informasi protein sampel dan pembanding. File PDB yang juga diperoleh dari hasil analisis program Phyre2 digunakan untuk analisis *in silico* menggunakan aplikasi PyMOL. Analisis *in silico* dilakukan dengan melihat posisi protein *DREB2A* sampel varietas padi lokal Jawa Timur terhadap pembandingnya yang menggunakan sekuen utuh protein *DREB2A*. Analisis *in silico* juga dilakukan dengan melihat hubungan fragmen protein *DREB2A* sampel terhadap promotor gen target responsif kekeringan yaitu *DRE*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA total. Isolasi DNA total varietas padi lokal Jawa Timur telah berhasil dilakukan. Hasil isolasi DNA total divisualisasikan menggunakan elektroforesis (Gambar 1). Berdasarkan hasil visualisasi elektroforesis diketahui panjang gen *DREB2A* ±250 bp. Hasil isolasi DNA total digunakan sebagai *template* amplifikasi gen *DREB2A*.

Analisis data hasil sekuensing. Data hasil sekuensing gen *DREB2A* varietas padi lokal Jawa Timur didapatkan dengan panjang sekuen gen *DREB2A* varietas Berlian 239 bp, varietas SOJ A3 239 bp, dan varietas Jawa 240 bp. Berdasarkan hasil analisis program BLAST, diketahui sekuen yang diisolasi sudah benar (Tabel 1; Tabel 2). Analisis program BLAST menunjukkan sekuen hasil isolasi adalah gen *DREB2A*. Analisis program BLAST memperlihatkan sekuen hasil isolasi hanya mencakup 28% gen *DREB2A* dengan kecocokan sekuen sampel dengan sekuen database NCBI sebesar 97%-98%.



Gambar 1. Elektrogram gen *DREB2A* hasil PCR varietas padi lokal Jawa Timur. M = Marker 100 bp plus DNA ladder; 1 = Varietas Berlian; 2 = Varietas SOJ A3; 3 = Varietas Jawa.

Alignment sekuen sampel varietas padi lokal Jawa Timur dilakukan dengan pembanding yang sudah diketahui sifat tahan cekaman kekeringannya, yaitu *Oryza sativa* Indica cv FL-478 *DREB2A* (KU159744) [13] dan *Oryza sativa* Indica cv Pokkali *DREB2A* (KU159743) [14] (Gambar 2). Berdasarkan hasil *alignment* diketahui sekuen hasil isolasi merupakan fragmen dari gen *DREB2A*. Panjang sekuen sampel hasil isolasi berada pada urutan ke 54-296 bp. Hasil *alignment* menunjukkan terjadinya mutasi pada fragmen gen *DREB2A* sampel varietas padi lokal Jawa Timur.

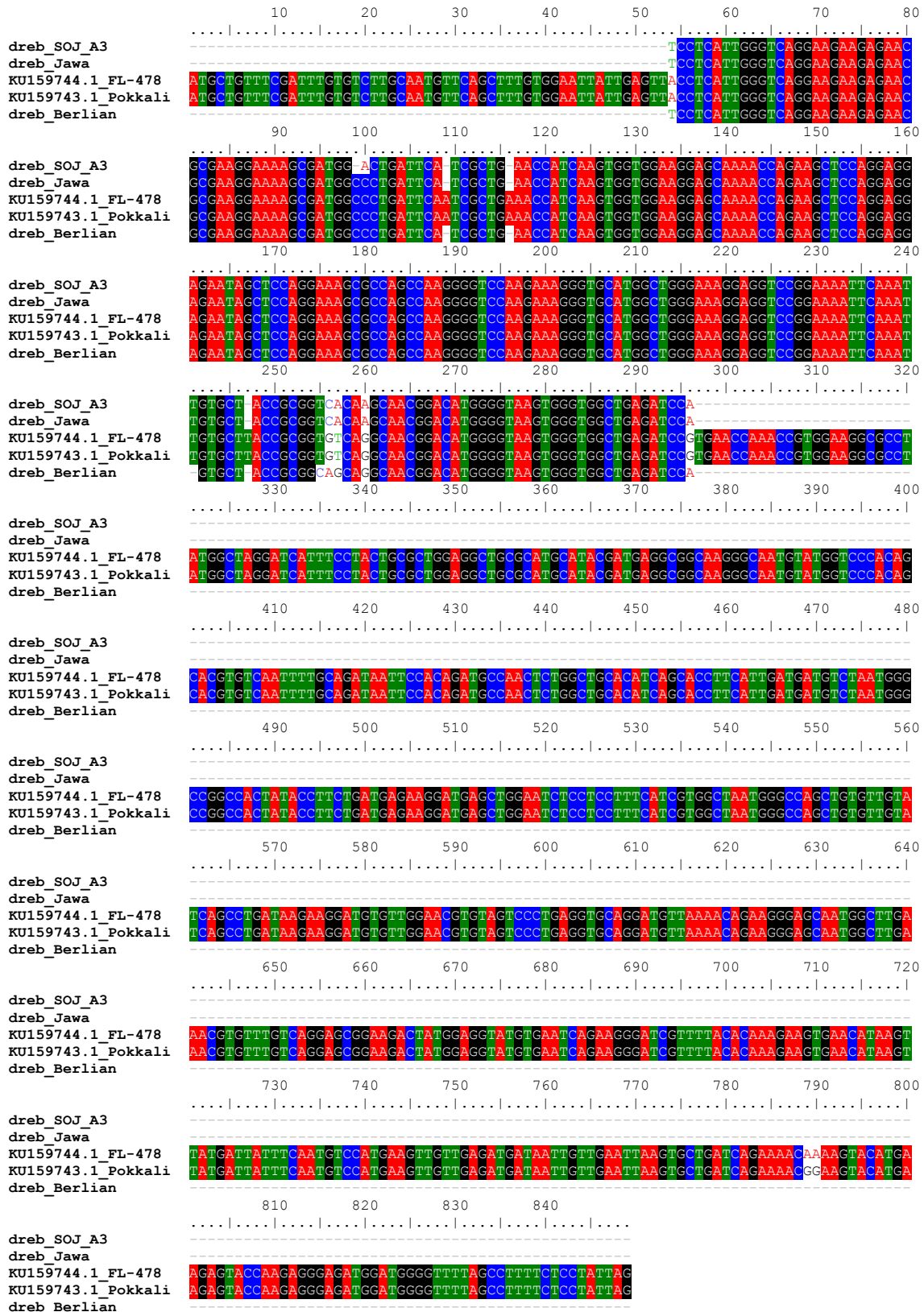
Mutasi yang terjadi berupa substitusi dan delesi. Substitusi dapat diamati dari perbedaan urutan basa nukleotida [15], yang terjadi pada basa ke-54 (Berlian, SOJ A3 dan Jawa), basa ke-100 (SOJ A3), basa ke-255 (Berlian), basa ke-256 (Berlian, SOJ A3 dan Jawa), basa ke-257 (Berlian, SOJ A3 dan Jawa), basa ke-260 (SOJ A3 dan Jawa), dan basa ke-296 (Berlian, SOJ A3 dan Jawa). Adanya gap menunjukkan delesi basa nukleotida [16], yang terjadi pada basa ke-99 (SOJ A3), basa ke-109 (Berlian, SOJ A3 dan Jawa), basa ke-116 (Berlian, SOJ A3 dan Jawa), basa ke-116 (Berlian, SOJ A3 dan Jawa), basa ke-241 (Berlian), dan basa ke-247 (Berlian, SOJ A3 dan Jawa).

Tabel 1. Hasil analisis BLAST gen *DREB2A* varietas padi lokal Jawa Timur dengan *Oryza sativa* Indica cv FL-478 *DREB2A* (KU159744).

| Sampel | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident. |
|---------|-----------|-------------|-------------|---------|--------|
| Berlian | 403 | 403 | 28% | 6e-117 | 97% |
| SOJ A3 | 398 | 398 | 28% | 3e-115 | 97% |
| Jawa | 409 | 409 | 28% | 1e-118 | 98% |

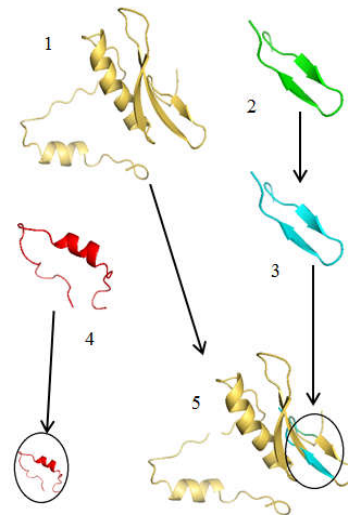
Tabel 2. Hasil analisis BLAST gen *DREB2A* varietas padi lokal Jawa Timur dengan *Oryza sativa* Indica cv Pokkali *DREB2A* (KU159743).

| Sampel | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident. |
|---------|-----------|-------------|-------------|---------|--------|
| Berlian | 403 | 403 | 28% | 6e-117 | 97% |
| SOJ A3 | 398 | 398 | 28% | 3e-115 | 97% |
| Jawa | 409 | 409 | 28% | 1e-118 | 98% |

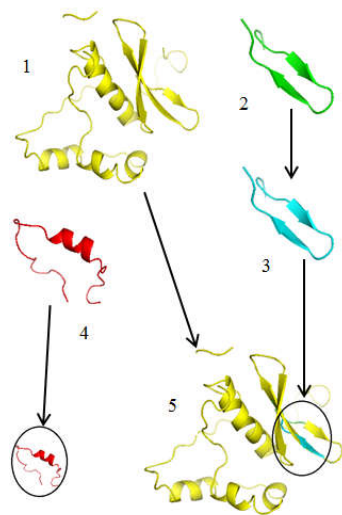


Gambar 2. Alignment sampel varietas padi Jawa Timur dan rujukan cv FL-478 dan cv Pokkali.

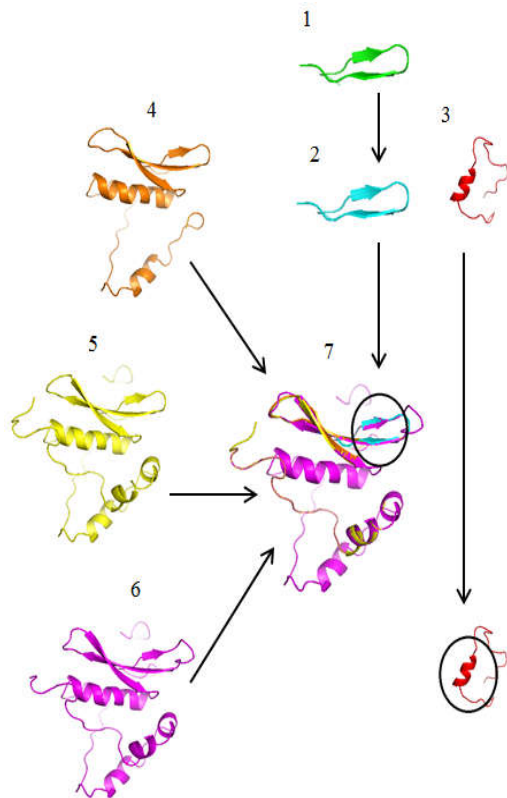
Analisis gen *DREB2A*. Hasil analisis fragmen gen *DREB2A* yang diisolasi dari varietas Berlian dan SOJ A3 adalah *ethylene responsive transcription factor* (ERF096), yang merupakan subfamili dari domain *Ethylene Responsive Factor/APETALA2* (ERF/AP2) [17]. Berbeda dengan varietas Jawa, hasil analisis fragmen yang diperoleh adalah protein translasi dari keluarga rL3. Domain ERF/AP2 merupakan bagian dari gen *DREB2A* [13]. Domain ERF/AP2 berfungsi mengikat elemen *cis-regulator* untuk promotor gen target, seperti GCC-box dan DRE/CRT [18]. Analisis secara *in silico* (Gambar 3; Gambar 4), menunjukkan hubungan fragmen varietas Berlian dan SOJ A3 dengan protein *DREB2A* pembanding, sedangkan fragmen varietas Jawa terpisah dengan protein *DREB2A* pembanding. Analisis *in silico* (Gambar 5) dilanjutkan dengan melihat hubungan fragmen protein sampel terhadap promotor gen target responsif kekeringan, yaitu DRE. Perbedaan hasil analisis fragmen protein *DREB2A* varietas Jawa menjadi protein translasi dari keluarga rL3, memperlihatkan hilangnya kemampuan gen *DREB2A* varietas Jawa, untuk mengikat elemen *cis-regulator* promotor gen target.



Gambar 4. Analisis *in silico* fragmen protein *DREB2A* varietas padi lokal Jawa Timur. 1 = Rujukan gen *DREB2A* *O. sativa* indica cv Pokkali (KU159743); 2 = Varietas Berlian; 3 = Varietas SOJ A3; 4 = Varietas Jawa; 5 = Penggabungan fragmen protein sampel dengan rujukan.



Gambar 3. Analisis *in silico* fragmen protein *DREB2A* varietas padi lokal Jawa Timur. 1 = Rujukan gen *DREB2A* *O. sativa* indica cv FL-478 (KU159744); 2 = Varietas Berlian; 3 = Varietas SOJ A3; 4 = Varietas Jawa; 5 = Penggabungan fragmen protein sampel dengan rujukan.



Gambar 5. Analisis *in silico* fragmen protein DREB2A varietas padi lokal Jawa Timur. 1 = Varietas Berlian; 2 = Varietas SOJ; 3 = Varietas Jawa; 4 = Rujukan gen *DREB2A O. sativa indica* cv Pokkali (KU159743); 5 = Rujukan gen *DREB2A O. sativa indica* cv FL-478 (KU159744); 6 = Rujukan DRE *O. sativa* (AFM74032); 7 = Penggabungan fragmen protein sampel dan protein DREB2A pembandingan, dengan promotor gen target responsive kekeringan DRE.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil *alignment* sekuen gen *DREB2A* sampel varietas padi lokal Jawa Timur dengan *Oryza sativa* cv FL-478 dan cv Pokkali diketahui sekuen hasil isolasi hanya berupa fragmen gen *DREB2A*. Fragmen gen *DREB2A* yang diperoleh memperlihatkan mutasi yang terjadi. Berdasarkan hasil analisis program Phyre2 dan *in silico*, sampel varietas Jawa memperlihatkan kehilangan kemampuan gen *DREB2A* yang dimiliki untuk mengikat elemen *cis-regulator* promotor gen target.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kepada bapak Mahrus Ismail, asisten laboratorium genetika Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, yang membantu penelitian ini. Bapak Abdullah Fuad untuk fasilitas di laboratorium Pusat Bioteknologi Mineral dan Material Maju FMIPA Universitas Negeri Malang. Penelitian ini didanai oleh proyek 4 in 1 IDB dan proyek DRPM Dikti melalui D.L dan S.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Noviasari S, Kusnandar F, Setiyono A, Budijan (2017) Physical, chemical, and sensory characteristics of rice analogue from non rice ingredients. *Jurnal Pangan* 26: 1–11.
- [2] Badan Pusat Statistik Indonesia, Badan Pusat Statistik Indonesia (2013) Proyeksi penduduk indonesia indonesia population projection 2010-2035. Badan Pusat Statistik Indonesia Hal. 978-979.
- [3] Suciantini S (2017) Analisis risiko kekeringan dengan menggunakan decision network di sentra produksi padi di Jawa Barat. *Biodiversitas* 3:62–68.
- [4] Hafif B (2016) Optimasi potensi lahan kering untuk pencapaian target peningkatan produksi padi satu juta ton di Provinsi Lampung. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian* 35(2): 81-88.
- [5] Sitaresmi T, Wening RH, Rakhmi AT, Yunani N, Susanto U (2013) Pemanfaatan plasma nutfah padi varietas lokal dalam perakitan varietas unggul. *IPTEK Tanaman Pangan* 8(1): 22–30.
- [6] Akhtar M, Jaiswal A, Taj G, Jaiswal JP, Qureshi MI, Singh NK (2012) DREB1/CBF transcription factors: their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants. *Journal of Genetics* 91(3): 385–95.
- [7] Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2002) DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communication*

- 290(3): 998–1009.
- [8] Fujita Y, Yoshida T, Yamaguchi-Shinozaki K (2013) Privotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in abremediated transcriptional in response to osmotic stress in plants. *Physiologia Plantarum* 147(1): 15–27.
- [9] Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Functional analysis of an arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* 18(5): 1292–1309.
- [10] Qin F, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011) Achievements and challenges in understanding plant abiotic stress responses and tolerance. *Plant Cell Physiology* 52(9): 1569–82.
- [11] Kumar S (2016) Identification of DREB and SSR linked drought sequences in finger millet (*Eleusine coracana* L.) Gaertn.) genotypes. Master Thesis. College Of Biotechnology Birsa Agricultural University, Ranchi, India.
- [12] Jadhao KR, Samal KC, Pradhan SK, Rout GR (2014) Studies on Molecular Characterization of DREB Gene in Indica Rice (*Oryza sativa* L.). *Hereditary Genetics* 3(3): 1–12. doi:10.4172/2161-1041.1000133.
- [13] Oh S-J, Kim YS, Kwon C-W, Park HK, Jeong JS, Kim J-K (2009) Overexpression of the transcription factor AP37 in rice improves grain yield under drought conditions. *Plant Physiology* 150(3): 1368–1379.
- [14] de Silva WSI, Perera MMN, Perera KLNS, Wickramasuriya AM, Jayasekera GAU (2017) In silico Analysis of *osr40c1* promoter sequence isolated from Indica variety Pokkali. *Rice Science* 24(4): 228–234.
- [15] Porceddu A, Camiolo S (2017) Patterns of spontaneous nucleotide substitutions in grape processed pseudogenes. *Diversity* 9(4): 45. doi: 10.3390/d9040045.
- [16] Capella-Gutiérrez S, Gabaldón T (2013) Measuring guide-tree dependency of inferred gaps in progressive aligners. *Bioinformatics* 29(8): 1011–1017.
- [17] Wang X, Hou C, Zheng K, Li Q, Chen S, Wang S (2017) Overexpression of ERF96, a small ethylene response factor gene, enhances salt tolerance in Arabidopsis. *Biologia Plantarum* 61(4): 693–701. doi: 10.1007/s10535-017-0734-7.
- [18] Gu C, Guo ZH, Hao PP, Wang GM, Jin ZM, Zhang SL (2017) Multiple regulatory roles of AP2/ERF transcription factor in angiosperm. *Botany Studies* 58(1):1–8.