

# Analysis of Genetic Variations in PHT1 Gene Sequences in Rice (*Oryza sativa*) NCBI Popset 240028097 Using In-Silico RFLP

## Analisis Variasi Genetik Sekuen Gen PHT1 pada Padi (*Oryza sativa*) NCBI Popset 240028097 Menggunakan RFLP Secara In Silico

Oliv Nurul Kanaya<sup>1</sup>, Afifatul Achyar<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang, West Sumatera, Indonesia

<sup>2</sup> Department of Environmental Sciences, Faculty of Human and Environment, Sumatra University, West Sumatera, Indonesia

\*Correspondence author: [afifatul.achyar@fmipa.unp.ac.id](mailto:afifatul.achyar@fmipa.unp.ac.id)

### Abstract

Rice is a plant that has high economic value. According to FAO, Indonesia is the third largest rice consuming country in the world. However, rice will become stunted and its growth will be stunted if there is a lack of phosphorus. The PHT1 gene plays an important role in plant growth and development, because this gene plays a role in taking phosphate from the soil. The PHT1 gene is transcribed when there is drought, salt stress, and nutrition in plants. Genetic variation in a population will affect the survival of an individual. This study used the restriction enzyme ScaI. This study aims to analyze genetic variation in the PHT1 gene sequence in NCBI Popset 2400280979 rice using RFLP *in silico*. The results showed that there was genetic variation in the rice PHT1 gene sequence and two allele variations present in 24 rice gene sequences using the restriction enzyme ScaI.

**Key words:** *Rice, Genetic variation, RFLP in silico, ScaI, PHT1.*

### Abstrak

Padi merupakan tanaman yang memiliki nilai ekonomi yang tinggi. Menurut FAO, Indonesia merupakan Negara dengan pengonsumsi beras ketiga terbesar di dunia. Namun padi akan menjadi kerdil dan terhambat pertumbuhannya jika kekurangan fosfor. Gen PHT1 sangat berperan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan pada tanaman, dikarenakan gen ini berperan dalam pengambilan phosphate dari dalam tanah. Gen PHT1 ditranskripsi apabila terjadi kekeringan, cekaman garam dan nutrisi pada tanaman. Variasi genetik pada suatu populasi akan berpengaruh terhadap kemampuan bertahan hidup suatu individu. Penelitian ini menggunakan enzim restriksi ScaI. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis variasi genetik pada sekuen gen PHT1 pada padi NCBI popset 2400280979 dengan menggunakan RFLP *in silico*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat variasi genetik pada sekuen gen PHT1 padi dan dua variasi alel yang terdapat dalam 24 sekuen gen padi menggunakan enzim restriksi ScaI.

**Kata kunci:** *Padi, Variasi Genetik, RFLP in silico, ScaI, PHT1.*

## Pendahuluan

Padi (*Oryza sativa*) merupakan tumbuhan yang termasuk kedalam famili *Poaceae*. Tanaman ini memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena hampir sebagian dari penduduk di dunia menjadikan padi sebagai bahan pangan utama. Indonesia merupakan negara dengan pengonsumsi beras ketiga terbesar di dunia setelah China dan India (*OECD- FAO, 2021*). Produksi padi di Indonesia tahun 2020 mencapai 54.649.202 ton Gabah Kering Giling (GKG), sedikit lebih banyak dibandingkan dengan tahun 2019 (54.604.033 ton GKG) atau mengalami kenaikan sebanyak 0,08% (*BPS, 2022*).

Pada penelitian ini dilakukan analisis variasi genetik padi pada sekuen gen PHT1 (*Inorganic Phosphate Transporter*). Penelitian selama beberapa dekade terakhir telah menunjukkan bahwa subfamili gen PHT1 (*Inorganic Phosphate Transporter*) bertanggung jawab atas penyerapan Pi (phosphate) dari tanah. Fosfor adalah salah satu unsur makro penting yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Fosfor adalah komponen struktural asam nukleat dan fosfolipid, dan melayani berbagai fungsi biologis dalam metabolisme energi, aktivasi enzim dan transduksi sinyal. Kekurangan Fosfor pada tanaman dapat menyebabkan tanaman menjadi kerdil dan pertumbuhannya menjadi terhambat. Gen PHT1 ini berperan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan pada tanaman. Transkripsi gen PHT1 dapat diatur oleh beberapa faktor antara lain auksin dan faktor lain seperti kekeringan, cekaman garam dan nutrisi (*Li et al., 2019*).

Variasi genetik merupakan perubahan yang terjadi pada nukleotida, gen, kromosom, dan genom pada suatu organisme. Menurut Frankham *et al.*, (2002), Variasi genetik pada suatu populasi akan berpengaruh terhadap kemampuan bertahan hidup suatu individu. Menurut Dunham (2004), Semakin tinggi variasi genetik yang terdapat pada suatu populasi, maka semakin baik kemampuan individu dalam beradaptasi terhadap perubahan lingkungan (*Achyar et al., 2021*).

Salah satu cara untuk mendeteksi variasi genetik pada padi adalah dengan menggunakan marka molekuler RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). RFLP merupakan marka molekuler yang menggunakan enzim restriksi dalam mengidentifikasi sekuensi-sekuensi DNA. Deteksi RFLP didasarkan pada adanya kemungkinan untuk membandingkan profil pita-pita yang dihasilkan setelah dilakukan pemotongan oleh enzim restriksi terhadap DNA target atau individu yang berbeda. Berbagai mutasi yang terjadi pada suatu organisme mempengaruhi molekul DNA dengan berbagai cara serta menghasilkan fragmen-fragmen dengan panjang yang berbeda-beda. Marka molekuler ini sederhana dan lebih sensitif bila menggunakan penanda spesifik untuk menganalisis kesamaan maupun menggunakan variabilitas gen-gen (*Fatchiyah et al., 2011*).

Perkembangan ilmu pengetahuan mempermudah mendeteksi keragaman genetik suatu individu berbasis molekuler (*Putri et al., 2021*). Restriksi dan visualisasi fragmen hasil restriksi yang bertujuan untuk memprediksi hasil genotyping sebelum melakukan RFLP di laboratorium dapat dilakukan secara *in silico*. Uji *in silico* adalah suatu istilah untuk percobaan atau uji yang dilakukan dengan metode simulasi komputer. Menurut Hardjono (2013), Kegunaan uji *in silico* adalah untuk memprediksi memberi hipotesis, memberi penemuan baru. *In silico* dapat digunakan sebagai metode untuk mendekati kondisi nyata ke dalam simulasi berbasis komputer menggunakan program aplikasi atau perangkat lunak tertentu (*Khaira et al., 2022*).

Dengan bekal data sekuen gen yang terdapat di NCBI dan software bioinformatik, variasi genetik dari suatu populasi dapat dianalisis menggunakan tools restriksi sekuen nukleotida. Berdasarkan latar belakang di atas, maka studi ini bertujuan untuk menganalisis variasi genetik pada sekuen gen PHT1 pada padi NCBI popset 2400280979 menggunakan Restriction-Fragment Length Polymorphism (RFLP) secara *in silico*.

## Bahan dan Metode

Pada penelitian ini sekuen gen pada padi yang digunakan adalah Inorganic phosphate transporter 1 (PHT1) dengan nomor identitas PopSet 2400280979 yang di unduh dalam format fasta dari NCBI [Oryza sativa inorganic phosphate transporter 1 gene, complete cds. - PopSet - NCBI \(nih.gov\)](#). Popset tersebut memiliki 24 sekuen gen dengan acc number (Tabel 1).

Tabel 1. Sampel Sekuen Gen PHT1 Padi NCBI

| No. | Acc number isolat padi | No. | Acc number isolat padi | No. | Acc number isolat padi |
|-----|------------------------|-----|------------------------|-----|------------------------|
| 1.  | OM681532.1             | 9.  | OM681540.1             | 17. | OM681548.1             |
| 2.  | OM681533.1             | 10. | OM681541.1             | 18. | OM681549.1             |
| 3.  | OM681534.1             | 11. | OM681542.1             | 19. | OM681550.1             |
| 4.  | OM681535.1             | 12. | OM681543.1             | 20. | OM681551.1             |
| 5.  | OM681536.1             | 13. | OM681544.1             | 21. | OM681552.1             |
| 6.  | OM681537.1             | 14. | OM681545.1             | 22. | OM681553.1             |
| 7.  | OM681538.1             | 15. | OM681546.1             | 23. | OM681554.1             |
| 8.  | OM681539.1             | 16. | OM681547.1             | 24. | OM681555.1             |

### Metode Skrining Kandidat Enzim Restriksi

Situs <http://insilico.ehu.es/restriction/> digunakan untuk skrining kandidat enzim restriksi. Situs tersebut menampilkan berbagai tools. Pada metode ini tools yang dipilih adalah compare restriction pattern of many sequences. Langkah selanjutnya memasukkan file sekuen yang sudah diunduh dalam bentuk fasta pada situs NCBI. Selanjutnya Go to next step diklik, lalu Only restriction enzymes with known bases (no N, R, Y...) di pilih untuk mendapatkan enzim restriksi yang biasanya benar-benar jelas tidak ada basa N, R atau Y. Langkah selanjutnya memilih Get list of restriction enzymes sehingga diperoleh kandidat enzim restriksi yang akan digunakan pada tahap selanjutnya (Aulia et al., 2021).

### Metode RFLP secara *in silico*

RFLP dilakukan secara *in silico* atau restriksi secara virtual menggunakan situs <https://www.benchling.com/>. Pada tahap awal harus melakukan registrasi dengan menggunakan email. Jika sudah registrasi, dilanjutkan dengan import sekuen RNA yang sudah diunduh dari NCBI kedalam folder project di situs Benchling. Selanjutnya mengklik tanda gunting pada pojok kanan. Kemudian tools "find enzyme" dipilih dan nama-nama enzim restriksi yang sudah ditentukan sebelumnya pada saat skrining, diketik pada kolom. Selanjutnya, klik menu "run digest" untuk restriksi. Dengan tools "virtual digest" dapat melihat gambar elektroforegram (Yeriska et al., 2021).

## Hasil dan Pembahasan

### Skrining Kandidat Enzim Restriksi

Hasil yang diperoleh dari skrining enzim, didapatkan dan dipilih enzim restriksi ScaI pada sisi pengenalan 5'-AGT'ACT-3'. Enzim restriksi ini dipilih karena terdapat variasi pemotongan pada sekuen gen PHT1 pada padi NCBI dengan nomor popset 2400280979. Enzim ScaI ini bersumber dari *Streptomyces caespitosus*, menginaktivasi pada suhu 80°C dan inkubasi pada suhu 37°C.

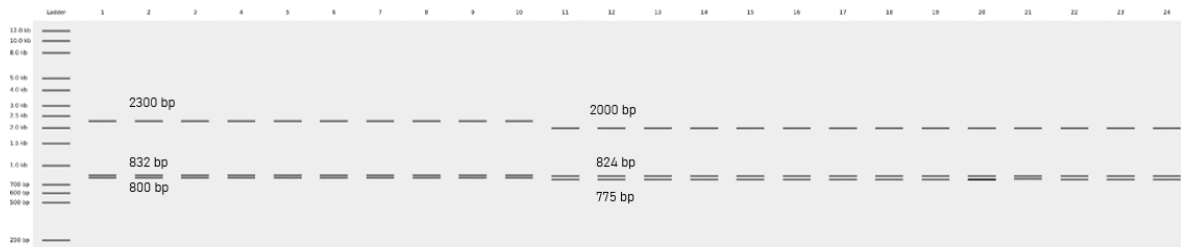
Enzim Restriksi Endonuklease merupakan enzim yang memotong bagian internal DNA yang bekerja secara spesifik (urutan tertentu). Enzim Restriksi Endonuklease memotong DNA tepat pada ikatan fosfodiester. Enzim-enzim ini bekerja dengan memotong DNA pada lokasi-lokasi spesifik yang mampu mengenali 4 – 8 urutan nukleotida. Enzim restriksi diisolasi dari bakteri. Pemotongan enzim restriksi akan menghasilkan potongan yaitu ujung kohesif (*sticky end*) dan ujung rata (*blunt end*). Suhu optimum yang dibutuhkan oleh enzim restriksi untuk melakukan pemotongan adalah sekitar 37°C (Fatchiyah et al., 2011).

### RFLP secara *in silico*

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) adalah teknik yang umum digunakan untuk penentuan genotip (genotyping) melalui pemotongan sekuen DNA dengan enzim restriksi (Achyar, 2021). Metode RFLP adalah metode analisis menggunakan enzim restriksi yang memotong urutan nukleotida khas pada lokasi tertentu yang berbeda sehingga dihasilkan fragmen yang panjangnya berbeda-beda (Theodore, 2000).

Analisis RFLP yang merupakan marker kodominan telah banyak digunakan untuk mencapai berbagai tujuan. Mengingat situs restriksi mempunyai sekuensi DNA tertentu, berarti variasi keberadaan situs restriksi mencerminkan adanya variasi sekuensi DNA. Dengan kata lain, RFLP dapat berfungsi sebagai penduga variasi DNA. Variasi dideteksi dalam bentuk pemotongan rangkaian panjang polimorfik (ganda) yang mana waktu penilaian dari rangkaian variasi memungkinkan dari data fragmen itu sendiri, rangkaian variasi yang panjang dalam suatu bagian dapat dinilai dari substitusi nukleotida (Fatchiyah *et al.*, 2011).

Studi *in silico* merupakan studi awal sebelum dilanjutkan dengan metode lain seperti *in vivo* dan *in vitro* untuk membantu memprediksi serta memberikan hipotesis tentang aktivitas suatu senyawa atau ligan karena proses dari keduanya terkadang sulit menjelaskan secara sederhana terjadinya mekanisme ligan dan target serta membutuhkan waktu yang lebih panjang dan biaya yang tidak murah (Hardjono, 2013).



Gambar 1. Elektroforegram hasil restriksi sekuen PHT1 padi menggunakan enzim restriksi ScaI secara *in silico*. Ket: Kiri (Ladder Bioline hyperladder 1 kb), (1) OM681532.1, (2) OM681533.1, (3) OM681534.1, (4) OM681535.1, (5) OM681536.1, (6) OM681537.1, (7) OM681538.1, (8) OM681539.1, (9) OM681540.1, (10) OM681541.1, (11) OM681542.1, (12) OM681543.1, (13) OM681544.1 (14) OM681545.1, (15) OM681546.1, (16) OM681547.1 (17) OM681548.1, (18) OM681549.1, (19) OM681550.1, (20) OM681551.1, (21) OM681552.1, (22) OM681553.1, (23) OM681554.1, (24) OM681555.1.

RFLP pada 24 sekuen gen PHT1 padi dilakukan pemotongan dengan menggunakan enzim restriksi ScaI. Hasil elektroforegram RFLP dari restriksi dari padi dapat dilihat pada gambar 1. Restriksi dengan enzim ScaI menghasilkan dua variasi alel, alel yang pertama menghasilkan tiga pita DNA dengan ukuran 2300 bp, 832 bp dan 800 bp yang terdapat pada isolat padi sampel 1-10 (Gambar 1). Sedangkan alel yang kedua menghasilkan tiga pita DNA dengan ukuran 2000 bp, 824 bp, dan 775 bp yang teramplifikasi pada isolat 11-24 (Gambar 1). Frekuensi alel pada padi NCBI sekuen gen PHT1 dengan enzim restriksi ScaI dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Frekuensi Alel Gen PHT1 Padi NCBI Berdasarkan Hasil RFLP *In Silico*

| Enzim Restriksi | Situs Pengenalan Restriksi | Ukuran Fragment (bp)     | Alel | Jumlah Kehadiran Fragment (N = 24) | Persentase Kehadiran Fragment (%) | Frekuensi Alel |
|-----------------|----------------------------|--------------------------|------|------------------------------------|-----------------------------------|----------------|
| ScaI            | AGTACT                     | 2,3 kb<br>832 dan<br>800 | 1    | 10                                 | 41,67                             | 0,42           |
|                 |                            | 2,0 kb<br>824 dan<br>775 | 2    | 14                                 | 58,33                             | 0,58           |

Berdasarkan tabel 1, diketahui bahwa total pita DNA yang teramplifikasi pada ukuran fragment 2,3 kb, 832, dan 800 bp adalah sebanyak 30 pita DNA dengan masing-masing ukuran fragment teramplifikasi sebanyak 10 pita DNA. Sedangkan total pita DNA yang teramplifikasi pada ukuran fragment 2 kb, 824, dan 775 bp adalah sebanyak 42 pita DNA dengan masing-masing ukuran fragment teramplifikasi sebanyak 14 pita DNA. Persentase kehadiran dari ukuran pita DNA 2,3 kb, 832, dan 800 bp adalah sebesar 41,67%. Sedangkan persentase dari ukuran pita DNA 2 kb, 824, dan 775 bp adalah sebesar 58,33%. Terdapat dua variasi alel yang muncul dalam RFLP, dimana alel 1 muncul dengan frekuensi sebesar 0,42 dan alel 2 muncul dengan frekuensi sebesar 0,58.

Berdasarkan hasil dari dilakukannya RFLP in silico dapat disimpulkan bahwa terdapat variasi genetik, dengan memunculkan 2 variasi alel pada 24 sekuen gen PHT1 yang terdapat pada padi NCBI dengan nomor popset 2400280979.

## Daftar Pustaka

- Achyar et al. 2021. Analysis of Genetic Variations in POLY Gene Sequences in Dengue Virus 2 Using In-Silico RFLP. *Jurnal Bioscience*. Vol. 05. No. 1: 80-86.
- Aulia, N., Putri, C. K., Khairiyah, L., Khairunnisa, F. A., & Achyar, A. (2022, May). Analysis of Genetic Variation of Measles Virus Genotype and Isolate MF Intergenic Spacer Sequences PopSet: 2105287799 using Restriction-Fragment Length Polymorphism (RFLP) In Silico. In *Prosiding Seminar Nasional Biologi* (Vol. 1, No. 2, pp. 1139-1146).
- BPS. 2022. Luas Panen, Produksi, dan Produktivitas Padi Menurut Provinsi 2019-2021. <https://www.bps.go.id/indicator/53/1498/1/luas-panen-produksi-dan-produktivitas-padi-menurut-provinsi.html>.
- Dunham, RA. 2004. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology Genetic Approaches*. USA: Department of Fisheries and Allied Aquacultures Auburn University Alabama. 86
- Fatchiyah, Arumingtyas, E. L., Widyarti, S., Rahayu, S. 2011. *Biologi Molekular, Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga. Jakarta.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University.
- Hardjono S., 2013. *Sintesis dan Uji Aktivitas Antikanker Senyawa 1-(2- Klorobenzoiloksi) urea dan 1-(4-klorobenzoiloksi) urea*. Berkala Ilmiah Kimia Farmasi. 2 (1), 1.
- Khaira, A., Juniarti, L., Arini, N., Sari, R. M., & Achyar, A. (2022, September). Analisis variasi genetik Sapi (Bos Taurus) pada sekuen gen Cytochrome Oxidase Subunit 1 (COI) menggunakan RFLP in silico. In *Prosiding Seminar Nasional Biologi* (Vol. 2, No. 1, pp. 176-180).
- Li Y, Wang X, Zhang H, Wang S, Ye X, Shi L, et al. (2019) Molecular identification of the phosphate transporter family 1 (PHT1) genes and their expression profiles in response to phosphorus deprivation and other abiotic stresses in *Brassica napus*. *PLoS ONE* 14(7): e0220374.
- OECD-FAO, 2021. *Agricultural Outlook 2021- 2030*. OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/19428846-en>.
- Putri, K. H. A. ., Kartika Puspita Sari, Khairunnisa, Monicha Yhuyhen Safitri, Afif Putra, Katon Agusdi, Fahrul Rozi Oktavian, & Affatul Achyar. (2021). Analisis Variasi Genetik Sekuen Gen Surface Glycoprotein (S) Pada SARS -CoV-2 Popset : 1843471817 Menggunakan RFLP Secara In-Silico. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*, 1(1), 44-52.
- Theodore, G. Schurr. 2000. Mitochondrial DNA and the Peopling of the New World Genetic variations among Native Americans provide further clues to who first populated the Americas and when they arrived. *American Scientist Online* (The Magazine of Sigma XI, The Scientific Research Society).
- Yeriska, F., Umar, M. Z., Hijriah, N. W., Fadhlurrohman, R., & Achyar, A. (2022, May). Analisis Variasi Genetik Sekuen Gen Pengkode Protein Spike Virus MERS-CoV (PopSet: 1843801421) Menggunakan RFLP Secara In Silico. In *Prosiding Seminar Nasional Biologi* (Vol. 1, No. 2, pp. 898-906).