

Peluang Gen *rbcL* sebagai DNA Barcode Berbasis DNA Kloroplas untuk Mengungkap Keanekaragaman Genetik Padi Beras Hitam (*Oryza sativa* L.) Lokal Indonesia

Chances of the *rbcL* Gene as DNA Barcode Based on Chloroplast DNA to Uncover the Genetic Diversity of Local Indonesian Black Rice (*Oryza sativa* L.)

Abdul Basith

Himpunan Pendidik dan Peneliti Biologi Indonesia

E-mail: golden_bee46@yahoo.com

Abstract: Black rice (*Oryza sativa* L.) is one of germ plasm where there are many found in Indonesia. The popularity of black rice growing in line with public awareness for consuming a functional food. But the scientific study of black rice germ plasm in Indonesia still classified as low, especially the scientific study of the molecular genetic diversity. Information of molecular genetic diversity adequately on black rice germ plasm is one of the cornerstone for the development of action strategies for conservation the varieties of black rice in Indonesia in a sustainable way. The scientific study which is expected to be implemented in the form of research on black rice molecular genetic diversity is an approach of DNA barcode. Most of the genes that utilized as DNA barcode on plants is on chloroplasts DNA (cpDNA). cpDNA having the benefit characteristics for genetic diversity study compared with nuclei DNA (nDNA) and mitochondria mtDNA. Characteristic of these is (1) the cpDNA genome have a small size and stable structure, (2) More conservative with lower average nucleotide substitution and (3) no recombination and uniparental heritable. This article discussed a potential DNA sequences of nucleotides from chloroplast DNA to give information on the genetic diversity of black rice, namely *rbcL* gene. Until now, NCBI database collected 143 partial sequence of *rbcL* gene. The number of partial sequence that has been collected is using as comparison facilitate to investigation the genetic diversity of Indonesia black rice. In the future, DNA barcode os expected to be implemented in the research.

Keywords: genetic diversity, DNA barcode, *rbcL* gene, Indonesian local black rice

1. PENDAHULUAN

Padi beras hitam (*Oryza sativa* L.) semakin populer di masyarakat dan dikonsumsi sebagai pangan fungsional karena kandungan antosianin, vitamin, dan mineralnya yang tinggi. Petroni & Tenolli (2011) mengemukakan bahwa peningkatan permintaan akan pangan fungsional diantaranya disebabkan oleh kandungan antioksidan yang tinggi, misalnya pigmen antosianin. Pendapat tersebut sejalan dengan Indrasari (2006) yang mengemukakan bahwa pertimbangan konsumen dalam memilih bahan pangan adalah kandungan gizi, cita rasa dan aspek kesehatan.

Kristantini, dkk. (2014) atas dasar Kristantini, dkk. (2008), Kristantini, dkk. (2009), dan Suhartini & Suhardi (2010), mengungkapkan bahwa beras hitam lokal memiliki sebutan yang bervariasi bergantung pada daerah asalnya, diantaranya beras

wulung (Kotamadya Surakarta), beras gadog (Kabupaten Subang), cempo ireng dan jlitheng (Sleman, Yogyakarta), beras melik (Bantul, Yogyakarta), Aen Metandan Hare Kwa (Nusa Tenggara Timur) dan cempa dan jawa melik (Magelang).

Informasi yang lengkap dapat mendukung upaya pemuliaan dan konservasi varietas-varietas padi beras hitam lokal Indonesia termasuk informasi terkait keanekaragaman genetik yang masih belum banyak dilakukan. Keanekaragaman genetik dalam suatu spesies seringkali dipengaruhi oleh perilaku reproduksi individu-individu dalam populasi tersebut. Keanekaragaman genetik timbul karena setiap individu mempunyai bentuk-bentuk gen yang khas. Keanekaragaman genetik terjadi melalui mekanisme mutasi dan rekombinasi (Indrawan dkk., 2012). Salah satu pendekatan yang digunakan untuk mengkaji keanekaragaman genetik adalah dengan



DNA *barcode*. DNA *barcode* yang sering digunakan pada tanaman umumnya adalah DNA kloroplas (cpDNA). Secara berurutan pada artikel ini diulas tentang konsep DNA *barcode* untuk kajian keanekaragaman genetik, DNA kloroplas sebagai objek kajian keanekaragaman genetik pada tanaman dan sekuen nukleotida yang berpotensi sebagai DNA *barcode* pada DNA kloroplas untuk memberikan informasi keanekaragaman genetik pada padi beras hitam, yaitu gen *rbcL*.

2. PEMBAHASAN

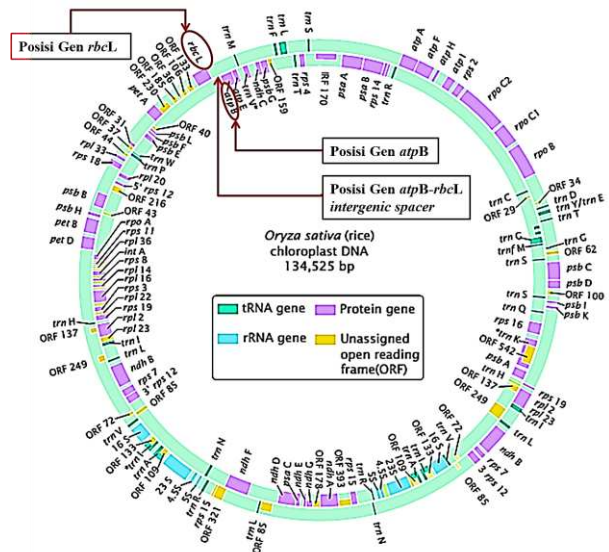
2.1. Latar Belakang Penggunaan DNA Barcode untuk Mengungkap Variasi Genetik

Zubaidah (2011) memberikan ulasan tentang DNA *barcode* dari berbagai sumber, bahwa DNA *barcode* merupakan salah satu pendekatan yang digunakan untuk menganalisis variasi genetik. Istilah DNA *barcode* mengisyaratkan bahwa setiap spesies makhluk hidup dicirikan oleh suatu sekuen atau urutan DNA tertentu sehingga dapat menunjukkan variasi genetik di dalam suatu spesies dan antar spesies. DNA *barcode* merupakan salah satu sarana molekuler dan bioinformatik untuk identifikasi spesies biologi. Gagasan mendasar pemanfaatan DNA *barcode* adalah bahwa analisis variabilitas pada satu atau beberapa penanda molekuler terstandar yang memungkinkan untuk membedakan entitas biologi (sangat diharapkan merupakan tingkat taksonomi spesies). Penggunaan DNA *barcode* untuk analisis variasi genetik didasarkan pada asumsi bahwa variasi genetik antar spesies melebihi variasi intraspesies. DNA *barcode* sesuai untuk dua tujuan, yaitu identifikasi molekuler spesies yang sudah terdeskripsikan maupun untuk spesies yang belum terdeskripsikan. DNA *barcode* dapat memberikan kontribusi kuat untuk penelitian keanekaragaman hayati dan taksonomi.

2.2 Peluang Gen *rbcL* sebagai DNA Barcode Berbasis DNA Kloroplas untuk Mengungkap Keanekaragaman Genetik Padi Beras Hitam Lokal Indonesia

Sumber karakter data untuk mengidentifikasi keanekaragaman genetik secara molekuler dapat diperoleh dari inti (nDNA), kloroplas (cpDNA) dan mitokondria (mtDNA). Sumber data keanekaragaman genetik yang banyak dipilih untuk objek penelitian tanaman adalah cpDNA. Provandkk. (2001) menjelaskan karakteristik cpDNA, yaitu: (1)

mempunyai genom berukuran kecil dan struktur yang stabil, (2) genom lebih konservatif dengan rata-rata substitusi nukleotida yang rendah dan (3) genom tidak mengalami rekombinasi dan diturunkan secara uniparental. DNA kloroplas (cpDNA) berbentuk lingkaran dengan rentang ukuran 85-2000 kilobasa (kb). cpDNA mengontrol produksi RNA transfer (tRNA), RNA ribosomal (rRNA), dan sebagian besar protein yang terdapat di dalam organel kloroplas. Setidaknya terdapat 19 DNA kloroplas yang telah diketahui urutannya, terdapat ratusan gen yang terdapat di dalam cpDNA genom. Terdapat tiga puluh kode untuk subunit-subunit pembentuk kompleks-kompleks protein fotosintetik, yaitu untuk fotosistem I, fotosistem II, *ribulose-1,5-biphosphate carboxylase-oxygenase*, kompleks *cytochrome b6-f*, dan *ATP synthase* (Tamarin, 2001). Tanaman-tanaman berpembuluh, umumnya memiliki kemiripan kandungan dan fungsi gen dalam cpDNA (Pierce, 2002). Sekuen DNA yang berpeluang untuk dijadikan sebagai DNA *barcode* yang dideskripsikan pada artikel ini adalah gen *rbcL*. Posisi kedua DNA *barcode* tersebut dalam genom DNA kloroplas ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Diagram genom DNA Kloroplas pada tanaman padi (*Oryza sativa* L.) (Pierce, 2002). Posisi gen *rbcL*, *atpB* dan *atpB-rbcL intergenic spacer* ditunjukkan pada kotak dengan tanda panah.

2.3 Gen *rbcL* sebagai DNA Barcode Padi Beras Hitam

Pierce (2002) menjelaskan bahwa salah satu protein kunci yang dikode oleh cpDNA adalah *ribulose-1,5-biphosphate carboxylase-oxygenase* (disingkat sebagai RuBisCO), yang berpartisipasi dalam fiksasi

karbon dalam proses fotosintesis. RuBisCO membuat sekitar 50% protein yang ditemukan pada tanaman hijau yang diduga sebagai protein yang paling berlimpah jumlahnya di muka bumi. Protein kompleks RuBisCO tersusun dari delapan protein subunit besar yang identik dan delapan protein subunit kecil yang identik. Protein subunit besar dikode oleh cpDNA, sedangkan protein subunit kecil dikode oleh DNA nukleus.

Gen *rbcL* berukuran panjang sekitar 1400 bp sehingga menyediakan banyak karakter untuk kajian filogenetik (CBOL, 2009). Peranan gen *rbcL* yang mengkode protein RuBisCO diduga menyebabkan sekuen gen ini memiliki tingkat mutasi yang rendah dibandingkan dengan gen *barcode* lain dalam cpDNA sehingga tingkat kesamaan antar spesies cukup tinggi (Kellgog&Juliani, 1997). Tingkat mutasi yang rendah ini memberikan keuntungan untuk kajian mendalam tentang variasi genetik dan filogenetik intraspecies.

Gen *rbcL* dapat diamplifikasi dengan tingkat keberhasilan yang tinggi dengan satu atau dua macam primer universal (CBOL, 2009). Lebih lanjut dikemukakan bahwa jika dibandingkan dengan kandidat gen *barcode* yang lain, gen *rbcL* memiliki tingkat keberhasilan *bidirectional sequencing* (proses *sequencing* dua arah dengan primer *forward* dan *reverse*) yang tinggi. Fazekasdkk. (2008) mengemukakan bahwa tingkat keberhasilan gen *rbcL* dapat mencapai 100% pada 251 spesies tanaman hanya dengan dua macam primer. Cumming dkk. (2003) mengungkap bahwa *database* tentang gen *rbcL* telah dimiliki oleh banyak spesies sehingga mempermudah perbandingan dalam analisis data. Sementara itu berdasarkan pada *database* yang diakses situs resmi NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*) hingga saat ini telah terkumpul 143 parsial sekuen nukleotida gen *rbcL* dari genus *Oryza*. Selain *rbcL* nampaknya sekuen-sekuen lain yang terdapat dalam cpDNA juga berpeluang untuk digunakan sebagai DNA *barcode* dalam mengungkap keanekaragaman genetik pada padi beras hitam. Penggabungan sekuen DNA juga perlu dilakukan untuk mendapatkan gambaran yang lebih akurat terkait keanekaragaman genetik dengan asumsi semakin banyak karakter yang dibandingkan maka data akan semakin kompleks dan memberikan gambaran yang lebih menyeluruh.

3. KESIMPULAN

Padi beras hitam lokal Indonesia merupakan sumber pangan fungsional yang belum banyak dikaji

keanekaragaman genetiknya. DNA *barcode* merupakan salah satu pendekatan yang berpeluang untuk mengungkap keanekaragaman genetik padi beras hitam. DNA kloroplas direkomendasikan sebagai sumber data DNA *barcode* karena memiliki karakteristik yang menguntungkan, yaitu (1) genom cpDNA berukuran kecil dan struktur yang stabil, (2) lebih konservatif dengan rata-rata substitusi nukleotida lebih rendah, dan (3) tidak mengalami rekombinasi dan diturunkan secara uniparental. Gen *rbcL* merupakan salah satu sekuen yang direkomendasikan sebagai DNA *barcode* karena tersebar luas pada berbagai spesies tanaman, termasuk padi beras hitam. Hingga saat ini pada *database* NCBI terkumpul 143 parsial sekuen gen *rbcL*

4. DAFTAR PUSTAKA

- Consortium Barcode of Life (CBOL). (2009). A DNA Barcode for Land Plants. *PNAS*, 106 (31).
- Cumming, M.P., Nugent, J.M., Olmstead, R.G. & Palmer, J.D. (2003). Phylogenetic Analysis Reveals Five Independent Transfer of the Chloroplast Gene *rbcL* to the Mitochondrial Genome in Angiosperms. *Curr Genet*, 43:131-138.
- Fazekas, A.J. Burgess, K.S. Kesanakurti, P.R., Graham, S.W., Newmaster, S.G., Husband, B.C., Hajibabaei, M. & Barrett, S.C.H. (2008). Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PlosOne*, 3(7): e2802.
- Indrawan, M., Primack, R. B. & Supriatna. (2012). *Biologi Konservasi (Edisi Revisi)*. Jakarta: Yayasan Pustaka Obor Indonesia.
- Kristamtini, Taryono, Basunanda, P., & Rudi, H.R. (2014). Keragaman Genetik dan Korelasi Parameter Warna Beras dan Kandungan Antosianin Total Sebelas Kultivar Padi Beras Hitam Lokal. *IlmuPertanian*, 17(1):57-70.
- Petroni, K. & Tonelli, C. (2011). Recent Advances on the Regulation of Anthocyanin Synthesis in Reproductive Organs. *Plant Science*, 181: 219-229.
- Pierce, B. A. (2002). *Genetiks: A Conceptual Approach*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Tamarin, R. H. (2001). *Principles of Genetiks (Seventh Edition)*. Massachusetts: The McGraw-Hill Companies.
- Zubaidah, S. (2011). *Integrasi Pendekatan Morfologi dan Molekuler DNA (Deoxyribonucleic Acid) dalam Taksonomi*. Pidato Pengukuhan Guru Besar dalam Bidang Ilmu Genetika pada FMIPA Universitas Negeri Malang.



Penanya:

Ade Komariah, S.Si, M.Bi

Pertanyaan:

- a. DNA barcode pada beras hitam diambil dari kloroplas dalam bentuk cp-DNA. Sedangkan tidak semua tumbuhan memiliki kloroplas. Bagaimana cara mengambil DNA barcode pada tumbuhan yang tidak berfotosintesis, dalam arti tidak memiliki kloroplas?
- b. Seandainya DNA barcode ini diterapkan dalam berbagai penelitian taksonomi, mungkinkah akan mengubah taksonomi yang sudah ada sekarang?

Jawaban:

- a. Kloroplas hampir ada di 98% sel tumbuhan tingkat tinggi. Bagi jenis tumbuhan yang tidak memiliki kloroplas disebabkan karena lingkungan yang kurang menguntungkan, atau dikarenakan sebab yang lain, maka sumber DNA barcode dapat diperoleh melalui DNA mitokondria atau DNA nucleus. Hanya saja DNA mitokondria tidak tetap, sedangkan DNA nukleus mengalami rekombinasi gen ketika terjadi persilangan antara gamet jantan dan betina. Adanya rekombinasi DNA tersebut menyebabkan variasinya tinggi sehingga untuk menentukan kognisi taksonomi dan evolusinya agak sulit.
- b. Penelitian mengenai DNA Barcode ini sudah banyak diteraokan, bahkan sedang genchar di Indonesia. Pengaruh DNA Barcode tidak menyebabkan semua taksonomi lama akan berubah, tetapi ada beberapa yang akan terevisi. Dalam beberapa artikel ada pertentangan antara data molekuler dan data morfologi yang menentukan taksonomi, tetapi beberapa artikel lain adapula peneliti yang saling mendukung antara data morfologi yang sudah ada dan data molekuler yang berasal dari DNA. Sebaiknya DNA barcode ini bisa diteliti sendiri untuk menentukan taksonomi dengan catatan adanya data pendukung seperti data morfologi dan fisiologi.