

## **Analisis Sekuen Ekson 6-8 dari Gen Ferritin pada Tiga Varietas Padi (*Oryza sativa* L.) Asal Kecamatan Bantan, Bengkalis - Riau**

DEWI INDRIYANI ROSLIM<sup>1\*</sup>, DITA DEANESIA<sup>1</sup>, HERMAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Kampus Bina Widya, Jl. HR Soebrantas, Panam, Pekanbaru 28293, Riau, Indonesia

\*e-mail: dewiindriyaniroslim@gmail.com

### **ABSTRAK**

Salah satu masalah pada pertanian di Bengkalis adalah tingginya kandungan Fe di tanah. Ion Fe dapat meracuni tanaman jika terakumulasi dalam jumlah berlebih dari yang dapat ditolerir oleh tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan sekuen nukleotida dari gen *ferritin2* pada beberapa genotipe padi dari Riau, yang umumnya tumbuh di lahan pasang surut di Bengkalis, dengan varietas padi toleran Fe tinggi (Mahsuri) dan varietas padi nasional yang sensitif Fe tinggi (IR64). Penelitian dilakukan di Laboratorium Genetika, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau dari Januari sampai dengan Mei 2014. Metode penelitian meliputi isolasi DNA total tanaman, PCR, elektroforesis, dan sekuensing. Analisis data sekuen DNA dilakukan menggunakan program BLAST dan MEGA. Penelitian ini telah memperoleh fragmen DNA sepanjang sekitar 750 pb yang meliputi ekson 6-8 dari gen *ferritin2*. Jumlah total SNP sebanyak 53 dan SNP tersebut hanya ditemukan di intron dan ekson 6. Jarak genetik terjauh adalah antara Mahsuri dan Amat Candu (0.171), diikuti antara Sadani dan Amat Candu (0.164). Jarak genetik terdekat adalah antara Korea dan IR64 dan juga Sadani. Korea memiliki jarak paling dekat dengan Nipponbare, sebaliknya Amat Candu memiliki jarak paling jauh dari Nipponbare. Berdasarkan sekuen ekson 6-8, Amat Candu dikelompokkan sebagai varietas padi sensitif Fe tinggi, sedangkan Korea adalah varietas padi yang toleran Fe tinggi. Sadani tergolong varietas padi yang moderat.

Kata kunci : gen *ferritin*, *Oryza sativa*, PCR, Riau, tidal land

### **ABSTRACT**

One of the obstacles encountered in Bengkalis agricultural is the high content of Fe in the soil. Fe ions can cause toxicity in plants if it is accumulated in an amount exceeding the tolerable limit of the plant. This study was aimed to compare the nucleotide sequences of the *ferritin2* gene in some rice genotypes from Riau commonly growing in tidal land in Bengkalis with Fe-overload-tolerant rice variety (Mahsuri) and national rice variety which was Fe-overload-sensitive (IR64). The research was conducted at the Genetic Laboratory, Faculty of Mathematical and Natural Sciences, Riau University from January to May 2014. The methods included DNA isolation, PCR, electrophoresis, and sequencing. DNA sequence data analysis was performed by using the BLAST and MEGA programs. This study got  $\pm$  750 bp DNA fragment of the *ferritin2* gene which covering exons 6-8. Total number of SNPs obtained are as many as 53 pieces and only found in introns and exons six. The farthest genetic distance was between Mahsuri and Amat Candu (0.171), followed by Sadani and Opium Amat (0.164). The shortest genetic distance was between Korea and IR64 and also Sadani. Korea had the shortest distance to Nipponbare, otherwise Amat Candu was the farthest distance from Nipponbare. Based on exons 6 to 8 sequence, Amat Candu was classified as Fe-overload-sensitive rice variety, whereas Korea was a Fe-overload-tolerant rice variety. Sadani was Fe-overload-moderate rice variety.

Keywords : Riau, PCR, *ferritin* gene, *Oryza sativa*, tidal land

### **PENDAHULUAN**

Padi merupakan komponen utama dalam sistem ketahanan pangan nasional. Rata-rata peningkatan produksi padi nasional beberapa tahun terakhir masih rendah, yaitu 2.2 - 2.3 persen per tahun. Berdasarkan angka ramalan III bulan November 2010, produksi padi nasional tahun 2010 meningkat hingga 2.5 persen dan diprediksi mencapai 65.9 juta ton gabah kering giling (GKG) atau setara dengan beras sebanyak 36.9 juta ton (Suswono 2010). Berdasarkan angka tetap tahun 2009 produktivitas padi

nasional sebesar 4.99 t/ha GKG (BPS Nasional 2010). Padahal dengan laju pertumbuhan penduduk yang mencapai 1.49% dan laju konsumsi beras nasional 1.34% per tahun, rata-rata produktivitas padi nasional seharusnya minimal sebesar 6.0 t/ha (Makarim & Suhartatik 2006; Suswono 2010).

Lahan pasang surut adalah lahan yang kadar airnya dipengaruhi oleh pasang surutnya air laut atau sungai. Luas lahan pasang surut di Provinsi Riau tidak kurang dari 900.000 ha dan tersebar merata di beberapa Kabupaten tingkat dua antara lain; Bengkalis, Pelalawan, Indragiri Hulu, Siak Sri Indrapura, dan Indragiri Hilir. Sekitar 267.000 ha terdapat di Kabupaten Indragiri Hilir. Fakta di lapangan menunjukkan bahwa lahan tersebut belum dimanfaatkan secara optimal. Keadaan lahan pasang surut pada umumnya mempunyai keragaman biofisik yang sangat tinggi. Oleh karena itu, penggunaannya harus disesuaikan pada lahan atau tipologinya (BPS Riau 1992).

Kabupaten Bengkalis merupakan salah satu Kabupaten di Provinsi Riau yang terletak di pesisir timur Pulau Sumatera, berbatasan dengan Selat Malaka di sebelah utara dan timur, Kabupaten Siak dan Kabupaten Kepulauan Meranti di sebelah selatan, Kabupaten Rokan Hilir, Kabupaten Rokan Hulu dan Kota Dumai di sebelah barat. Kabupaten Bengkalis terdiri dari dua kecamatan, yaitu Kecamatan Bengkalis dan Kecamatan Bantan. Kecamatan Bantan memiliki luas wilayah 424 km<sup>2</sup> dan terdiri dari 9 desa. Empat desa diantaranya berada di daerah pesisir, yaitu Jangkang, Bantan Air, Bantan Tengah, dan Muntai. Sebagian besar penduduknya bermata pencaharian sebagai petani (<http://www.bengkalis.go.id/statis-13-kecamatan-bantan.html>).

Pemanfaatan lahan pasang surut di Bengkalis salah satunya dengan membuka sawah bukaan baru menimbulkan permasalahan baru, yaitu adanya kandungan Fe yang tinggi dan dapat menyebabkan terjadinya keracunan ion Fe di dalam jaringan tanaman. Besi (Fe) adalah mikronutrien penting untuk tanaman, mengambil bagian dalam pusat redoks protein, penting untuk fotosintesis dan respirasi. Ion Fe yang tersedia dalam jumlah banyak dan konsentrasi berlebih di dalam jaringan tanaman dapat meracuni tanaman (Guerinot & Yi 1994). Walaupun demikian, tanaman memiliki mekanisme untuk mempertahankan homeostatis Fe di dalam sel dan jaringannya. Mekanisme tersebut melibatkan protein ferritin. Genotipe atau varietas padi yang tahan cekaman kelebihan Fe akan mengekspresikan protein ferritin dalam jumlah lebih banyak dibandingkan genotipe atau varietas padi yang tidak tahan cekaman kelebihan Fe (Mandal *et al.* 2004; da Silveira *et al.* 2009).

Analisis sekuen gen ferritin pada beberapa genotipe padi lokal Riau belum pernah dilakukan. Pada penelitian ini digunakan tiga varietas padi dari Kecamatan Bantan, Kabupaten Bengkalis - Riau. Analisis tersebut ditujukan untuk mengatur strategi dalam menghasilkan varietas padi unggul yang berproduksi tinggi dan dapat ditanam di lahan pasang surut serta tahan terhadap cekaman kelebihan Fe. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan analisis dengan membandingkan sekuen nukleotida gen ferritin dari beberapa genotipe padi lokal Riau dengan varietas padi rawa unggul tahan cekaman kelebihan Fe (Mahsuri) dan padi unggul tidak tahan cekaman kelebihan Fe (IR64).

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan pada bulan Januari sampai dengan Mei 2014 di Laboratorium Genetika Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau. Varietas padi lokal Riau yang digunakan adalah Amat Candu, Sadani, dan Korea. Varietas unggul nasional tidak tahan kelebihan Fe yang digunakan adalah IR64, sedangkan varietas yang toleran kelebihan Fe adalah Mahsuri. Data sekuen pada database yang digunakan sebagai acuan berasal dari varietas padi Nipponbare yang tergolong tahan kelebihan Fe.

**Sterilisasi dan penanaman biji padi.** Biji dipilih dengan cara dengan ditekan sedikit menggunakan tangan untuk mengetahui viabilitas biji padi tersebut. Apabila biji terasa utuh atau tidak kisut biji padi siap untuk disterilisasi dan ditanam. Biji-biji dicuci dengan larutan campuran 2 ml bayclin + 18 ml akuades. Biji-biji dimasukkan ke dalam larutan tersebut dan ditunggu hingga 15 menit, bilas dengan akuades 3 x, lalu direndam di dalam akuades selama semalam. Setelah itu biji dimasukkan ke dalam kotak yang telah diberi kertas merang basah untuk dikecambahkan selama 3-5 hari pada kondisi gelap mengikuti prosedur yang telah dilakukan oleh Roslim *et al.* (2010). Kertas merang dijaga agar tetap lembab dengan memberi air sedikit setiap hari.

Setelah kecambah padi berumur 3-5 hari maka biji siap untuk dipindahkan ke media tanam. Media tanam yang digunakan terdiri dari campuran tanah serta pupuk. Media tanam tanam harus tinggi agar sistem perakaran tanaman tidak terganggu. Campuran tanah dan pupuk dimasukkan ke dalam ember, ditambahkan air dan didiamkan selama beberapa hari sampai campuran membentuk lumpur dan media tanam siap digunakan.

**Isolasi DNA Tanaman Padi.** Padi yang telah menghasilkan 4 helai daun diambil daun sepanjang 10-15 cm dengan menggunakan gunting steril dan ditimbang seberat 1,5 gr diambil, lalu dihaluskan dengan menambahkan nitrogen cair dan digerus menggunakan mortar dan pestel. Setelah digerus, hasil gerusan dimasukkan kedalam tabung 50 ml dengan menggunakan spatula dan ditambahkan buffer CTAB (100 Mm Tris HCl pH-8 ; 2% (M/V) CTAB; 1,4 M NaCl; 20 Mm EDTA; dan 0,2%  $\beta$ -mercaptoetanol). Tabung direndam dalam *waterbath* dengan suhu 65°C selama 1 jam sambil dibolak-balik hingga homogen. Lalu didinginkan pada suhu ruang. Setelah itu ditambahkan 1 volume kloroform dan disentrifuse dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Fase atas atau supernatant dipipet dengan menggunakan mikropipet sebanyak 750  $\mu$ l lalu dimasukkan kedalam tabung 1,5 ml steril yang baru. Kemudian ditambahkan 1 volume isopropanol sambil dibolak-balik hingga terbentuk benang-benang putih DNA. Lalu disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Kemudian terbentuk endapan DNA lalu dikeringkan pada suhu 37°C. Setelah kering, tambahkan 500  $\mu$ l TE (10 Mm Tris HCl PH 7,4 dan 1 mM EDTA PH 8 dan 10 mg/ml RNase. Diinkubasi pada suhu 37°C selama semalam. Setelah itu volume DNA diperbesar dengan penambahan 200  $\mu$ l TE dan 700  $\mu$ l fenol. Campuran tersebut dihomogenkan dengan cara dibolak-balik secara perlahan selama 10 menit. Disentrifus kembali dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Fase atas atau larutan DNA cair dipindahkan ke dalam tabung 1,5 ml steril yang baru dan ditambahkan 0,8 volume isopropanol sambil dibolak-balik hingga terbentuk kembali benang-benang putih DNA. Tabung kemudian disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Pelet DNA di dasar tabung dikeringanginkan atau dibiarkan mongering pada suhu ruang 37°C dan kemudian dibilas dengan etanol 70%. Endapan DNA dilarutkan kembali dengan menambahkan larutan TE sbanyak 100  $\mu$ l. Untuk penyimpanan Larutan DNA total disimpan pada suhu -20°C sedangkan larutan DNA kerja disimpan pada suhu 4°C.

**Polymerase Chain Reaction (PCR).** PCR dilakukan menggunakan sepasang primer, yaitu forward 5'CCAAAGGGAAGGAGGTGCTC 3' dan reverse 5'GAATTCGCTCTC AACGAAG 3' yang akan mengamplifikasi daerah terkonservasi dari isoform ferritin (Gross *et al.* 2003). Total reaksi PCR yang digunakan sebesar 50  $\mu$ L. Program PCR meliputi pra-PCR pada 95°C selama 5 menit, diikuti 35 siklus yang terdiri dari tiga tahap: 95°C selama 30 detik, 56°C selama 30 detik, dan 72°C selama 30 detik, dan pasca-PCR pada 72°C selama 10 menit.

**Elektroforesis.** Kuantitas DNA diukur menggunakan elektroforesis (*Fisons model fec 360, large horizontal gel system*) pada 1% gel agarose dalam 1x buffer TBE (Tris-Borate-EDTA pH 8.0), tegangan 245 volt selama 30 menit. Gel hasil elektroforesis diwarnai dengan 5  $\mu$ g/ml etidium bromida, visualisasi di atas lampu UV (*WiseUv WUV-M20, Daihan Scientific*), dan direkam/foto.

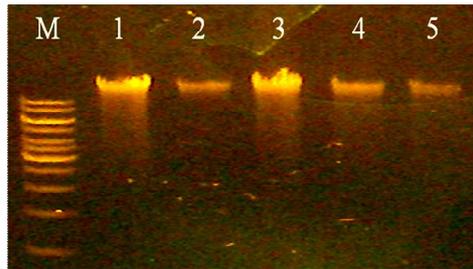
**Sekuensing dan Analisis Data.** Hasil PCR dari setiap genotipe atau varietas padi kemudian diurutkan nukleotidanya (*sequencing*) lalu dianalisis urutan nukleotidanya menggunakan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul *et al.* 1997). Analisis SNP dan pembuatan dendrogram menggunakan program MEGA versi 3.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Molekul DNA total

Hasil penelitian ini mendapatkan molekul DNA total dari lima varietas padi (Gambar 1). Pada proses isolasi digunakan Nitrogen cair dan CTAB yang berfungsi untuk membantu proses lisis sel, terutama mendegradasi dinding sel yang terdapat pada sel tumbuhan. Menurut Subandiyah (2006) dinding sel juga dapat dipecahkan dengan penggerusan menggunakan buffer ekstraksi, detergen seperti sodium dodecil sulfat (SDS), sarkosil, diikuti dengan penghangatan pada suhu 65°C.

Penggunaan kloroform dalam penelitian ini bertujuan untuk memisahkan DNA dengan protein karena kloroform merupakan senyawa yang tidak larut dalam air. Penambahan RNase adalah untuk mendegradasi RNA. RNase merupakan enzim yang berperan dalam proses lisis RNA. Pemberian TE berfungsi dalam penyimpanan DNA dan menjaga kemurnian DNA.



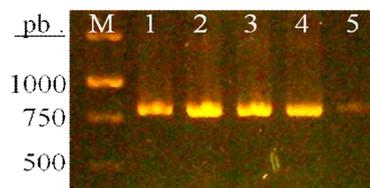
**Gambar 1.** Molekul DNA total dari lima varietas tanaman padi pada 1% gel agarose. Keterangan: M=1 kb DNA *Ladder* (*Thermo Scientific*), 1=IR64, 2=Mahsuri, 3=Amat Candu, 4=Korea, 5=Sadani.

**Fragmen DAN dari Gen *Ferritin2***

PCR merupakan suatu teknik yang digunakan untuk memperbanyak atau menggandakan DNA secara *in-vitro*. Menurut Mullis (1990) PCR merupakan metode yang sangat sensitif sehingga dari satu pasang molekul DNA dapat diperbanyak menjadi jutaan kali lipat setelah 30-40 siklus PCR. Komponen yang dibutuhkan dalam reaksi PCR adalah DNA target, primer, DNA polimerase, dinukleotida (dNTPs), dan buffer PCR.

Primer yang digunakan pada penelitian ini adalah primer OsFer2\_F\_ekson6 dan OsFer2\_R\_ekson8 yang telah dirancang untuk daerah ekson 6 sampai 8 dari gen *ferritin2*. OsFer2\_F\_ekson6 sebagai forward dan OsFer2\_R\_ekson8 sebagai reverse yang akan mengamplifikasi daerah terkonservasi pada wilayah ekson 6 sampai ekson 8.

Pada penelitian ini, proses PCR menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran ± 750 pb (Gambar 2). Untuk analisis selanjutnya, pita tersebut diambil dengan cara purifikasi gel. Pengecekan Kuantitas DNA menggunakan elektroforesis pada gel agarosa. Elektroforesis digunakan untuk melihat atau memisahkan fragmen DNA di bawah pengaruh medan listrik dikarenakan DNA bermuatan negatif. Ukuran fragmen ditentukan dengan cara membandingkan mobilitas fragmen DNA dengan DNA *Ladder* yang telah diketahui ukurannya.



**Gambar 2.** Fragmen DNA dari *gen Ferritin2* pada kelima Varietas padi. Keterangan: M=1 kb DNA *Ladder* (*Thermo Scientific*), 1=IR64, 2=Mahsuri, 3=Amat Candu, 4=Korea, 5=Sadani.

**Analisis Fragmen DNA dari Gen *Ferritin2***

Fragmen DNA dari kelima varietas padi yang berukuran ± 750 pb diurutkan nukleotidanya dengan menggunakan program pensejajaran BLASTn. Analisis pensejajaran berguna untuk menunjukkan bahwa fragmen DNA yang diuji merupakan bagian dari gen *Ferritin2* (Tabel 1).

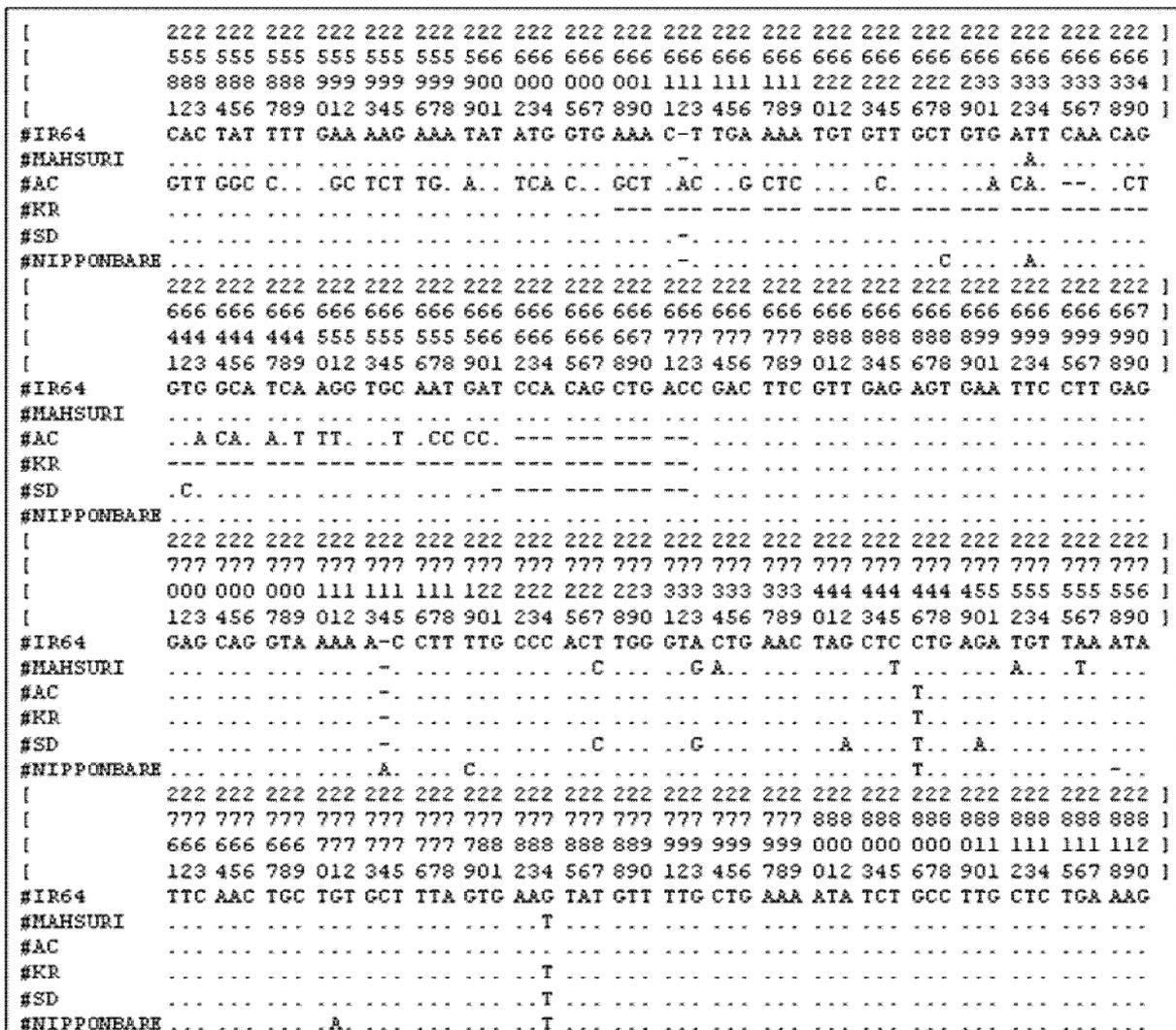
**Tabel 1.** Hasil pensejajaran fragmen DNA dari lima varietas padi yang diuji.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Oryza sativa chromosome 12, . BAC OSJNBa0052H10 of library OSJNBa from chromosome 12 of cultivar Nipponbare of ssp. japonica of Oryza sativa (rice), complete sequence	870	1363	98%	0.0	99%	BX000494.2
Oryza sativa (japonica cultivar-group) ferritin (Fer2) mRNA, complete cds	327	662	47%	2e-87	99%	AF519571.1
Oryza sativa (japonica cultivar-group) ferritin (Fer1) mRNA, complete cds	324	658	47%	2e-86	99%	AF519570.1

Analisis SNP (*Single Nucleotide Polymorphisme*) kemudian dilakukan pada sekuen nukleotida dari kelima varietas padi tersebut untuk menentukan perubahan nukleotida pada satu posisi tertentu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa total jumlah SNP yang diperoleh adalah sebanyak 53 buah dan hanya terdapat di intron dan ekson enam (Gambar 3, Tabel 2).

**Tabel 2.** Posisi SNP (*Single Nucleotide Polymorphisme*) berdasarkan sekuen DNA *ferritin2* pada varietas padi Nipponbare.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
IR64 (1)	0,000					
Mahsuri (2)	0,039	0,000				
Amat Candu (3)	0,159	0,171	0,000			
Korea (4)	0,017	0,028	0,153	0,000		
Sadani (5)	0,031	0,034	0,164	0,017	0,000	
Nipponbare (6)	0,022	0,038	0,154	0,011	0,025	0,000



**Gambar 3.** Posisi SNP pada kelima varietas padi yang diuji. Keterangan:IR64=IR64, MH= Mahsuri, AC= Amat Candu, KR= Korea, SD= Sadani.

Marka molekuler seperti *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) mempunyai beberapa kelebihan seperti mudah, tidak mahal, metode deteksi cepat, dan hanya membutuhkan sampel jaringan dalam jumlah yang sedikit (Cordeiro *et al.* 2002). Menurut Sobir *et al.* (2009) marka molekuler kelompok PCR yang sering digunakan adalah metode yang menggunakan sepasang primer, yaitu *Random Amplified*

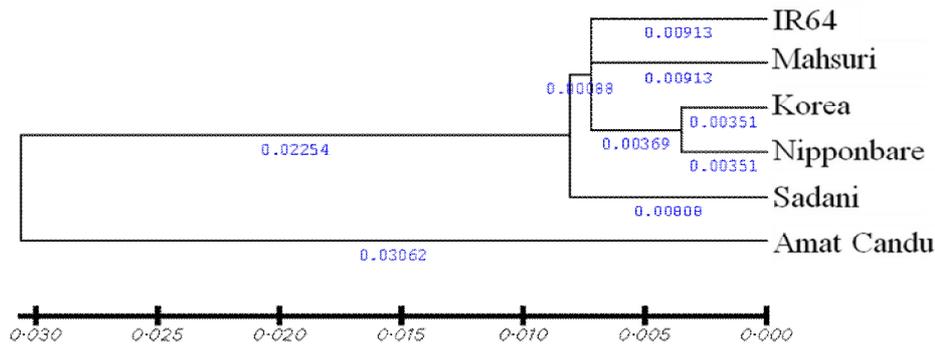
*Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), microsatellite, atau SSR,*

Tipe fragmen	Rentang posisi relatif fragmen (pb)	Panjang fragmen (pb)	Panjang fragmen yang diteliti (pb)	Jumlah SNP (buah)
Ekson6	2634-2706	73	73	39
Intron6	2707-2815	109	109	14
Ekson7	2816-2882	67	67	0
Intron7	2883-2983	101	101	0
Ekson8	2984-3171	424	424	0
<b>Jumlah</b>			<b>774</b>	<b>53</b>

SNP, dan *Sequence Tagged Sites (STS)*.

Jarak genetik di antara lima varietas padi yang diuji dan kultivar padi Nipponbare dapat dilihat pada Tabel 3. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jarak genetik terjauh terdapat antara varietas padi Mahsuri dan Amat Candu dengan nilai 0,171 dan diikuti dengan varietas padi antara Sadani dan Amat Candu dengan nilai 0,164. Jarak genetik terpendek terdapat antara Korea dengan IR64 dan Sadani. Korea memiliki jarak paling dekat dengan Nipponbare, sebaliknya Amat Candu berada pada jarak yang paling jauh dari Nipponbare. Nipponbare merupakan kultivar padi yang telah teruji tahan cekaman kelebihan Fe (Wu *et al.* 2014).

**Tabel 3.** Matriks jarak pada genotipe lima varietas padi yang diuji dan kultivar padi Nipponbare.



**Gambar 4.** Dendrogram sekuen DNA dari gen *ferritin2*.

Matriks jarak tersebut kemudian diterjemahkan menjadi dendrogram. Dendrogram menunjukkan bahwa kelima varietas padi terbagi menjadi dua kelompok pada jarak 0.030 (Gambar 4). Hasil ini menunjukkan bahwa berdasarkan sekuen ekson 6 sampai 8, Amat Candu tergolong padi yang tidak tahan cekaman kelebihan Fe, sebaliknya Korea adalah padi yang tahan terhadap cekaman kelebihan Fe. Sadani berada di antaranya, dan kemungkinan tergolong yang tidak tahan terhadap cekaman kelebihan Fe.

**KESIMPULAN**

Penelitian ini mendapatkan fragmen DNA dari gen *ferritin2* dengan ukuran ± 750 pb pada kelima varietas padi yang diuji. Jumlah SNP yang diperoleh adalah 53 SNP yang terletak di intron dan ekson enam. Berdasarkan sekuen ekson 6 sampai 8, Amat Candu tergolong padi yang tidak tahan cekaman kelebihan Fe, sebaliknya Korea adalah padi yang tahan terhadap cekaman kelebihan Fe. Sadani berada di antaranya, dan kemungkinan tergolong yang tidak tahan terhadap cekaman kelebihan Fe.

**UCAPAN TERIMA KASIH**

Penelitian ini didanai oleh BOPTN Universitas Riau tahun anggaran 2013 atas nama Dr. Dewi Indriyani Roslim. Terima kasih kepada Bapak Sularjo, SP atas penyediaan benih padi.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
- Badan Pusat Statistik Nasional. 2010. <http://www.bps.go.id/>. Diakses pada 19 Desember 2013.
- Cordeiro GM, Christopher MJ, Henry RJ, Reinke RF. 2002. Identification of microsatellite markers for fragrance in rice by analysis of the rice genome sequence. *Mol. Breed.* 9: 245-250.
- da Silveira VC, Fadanelli C, Sperotto RA, Stein RJ, Basso LA, Santos DS, Junior IDSV, Dias JF, Fett JP. 2009. Role of ferritin in the rice tolerance to iron overload. *Sci Agric (Piracicaba, Braz)* 66(4): 549-555.
- Gross J, Stein RJ, Fett-Neto AG, Fett JP. 2003. Iron Homeostasis related genes in rice. *Genetics and Molecular Biology* 26: 477-497.
- Guerinot ML, Yi Y. 1994. Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol* 104: 815-820.
- Makarim AK, Suhartatik E. 2006. Budidaya padi dengan masukan *in situ* menuju perpadian masa depan. *Iptek Tanaman Pangan* 1(1): 19-29.
- Mandal AB, Basu AK, Roy B, Sheeja TE, Roy T. 2004. Genetic management for increased tolerance to aluminium and iron toxicities in rice – A review. *Indian J Biotechnol* 3: 359-368.
- Mullis KB. 1990. The unusual origin of the polmerase chain reaction. *Scientific American* 3: 56-65.
- Roslim DI, Miftahudin, Suharsono U, Aswidinnoor H, Hartana A. 2010. Karakter root re-growth sebagai parameter toleransi aluminium pada tanaman padi. *Jurnal Natur Indonesia* 13(1): 82-88.
- Sobir, Sinaga S, Poerwanto R, Aswidinnoor H, Solihin DD. 2009. Komparasi keanekaragaman genetik tanaman manggis (*Garcinia mangostana* L.) Indonesia dan kerabat dekatnya dengan penanda isoenzim dan AFLP. *Biodiversitas* 10: 1-6.
- Subandiyah S. 2006. *Polymerase Chain Reaction untuk Deteksi atau Identifikasi Patogen Tumbuhan*. Beberapa Metode Ekstraksi DNA. Pelatihan dan Workshop Identifikasi DNA dengan Aplikasi PCR. Malang. hlm. 43-50.
- Suswono. 2010. Produksi padi tahun 2010 (Aram III) diperkirakan meningkat 2,46 persen. <http://www.deptan.go.id>. [12 Desember 2010].
- Wu LB, Shhadi MY, Gregorio G, Matthus E, Becker M, Frei M. 2014. Genetic and physiological analysis of tolerance to acute iron toxicity in rice. *The Rice Journal* 7:8.