

RESPON PADI TRANSGENIK CV. NIPPONBARE GENERASI T1 YANG MENGANDUNG GEN *Oryza sativa* DEHYDRATION-RESPONSE ELEMENT BINDING 1A (*OsDREB1A*) TERHADAP CEKAMAN SALINITAS*
[Response of T1 Generation Transgenic Rice cv. Nipponbare Containing an *Oryza sativa* Dehydration-response Element Binding 1A (*OsDREB1A*) Gene to Salinity Stress]

Tri Joko Santoso ✉, Aniversari Apriana, Atmitri Sisharmini, dan Kurniawan Rudi Trijatmiko
Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB BIOGEN),
Kampus Penelitian Pertanian Cimanggu, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111; Telp. 0251-8816897,
Faks. 0251-8338820; e-mail: trijsant@yahoo.com

ABSTRACT

Salinity is one of the abiotic constraints in the cultivation of rice crop. One of the reasons agricultural land becomes saline is due to the intrusion of seawater into the mainland as a result of global climate change. *Dehydration-responsive element binding* (DREB) gene is a plant-specific transcription factor gene that have important role in regulating plant responses to abiotic stresses, including high salinity. Transgenic rice plants cv. Nipponbare carrying *OsDREB1A* gene have been generated. However, study of the response of putative transgenic plants to salinity has not been done. The research objective is to study the response of T1 generation Nipponbare-*OsDREB1A* transgenic rice plants to salinity stress. The result showed that the response of putative transgenic rice Nipponbare-*OsDREB1A* to salinity stress 25 mM and 150 mM NaCl indicated a level of tolerance varies from highly sensitive to highly tolerance. These variations were possibly occurred because of the segregation state of the T1 generation transgenic rice. Based on damage symptom scoring and PCR analysis provided information that transgenic rice plant cv. Nipponbare-*OsDREB1A* which showed positive PCR had a very high tolerance to salinity stress 150 mM compared with non-transgenic rice cv. Nipponbare.

Key words: Rice (*Oryza sativa* L.), transgenic plant, *OsDREB1A* gene, salinity, PCR

ABSTRAK

Salinitas merupakan salah satu kendala abiotik di dalam budidaya tanaman padi. Salah satu penyebab tanah pertanian menjadi salin dikarenakan terjadinya intrusi air laut ke daratan sebagai sebuah akibat dari perubahan iklim global. Gen *dehydration-responsive element binding* (DREB) merupakan gen faktor transkripsi spesifik tanaman yang mempunyai peranan penting di dalam meregulasi respon tanaman terhadap cekaman abiotik, termasuk salinitas tinggi. Transgenik padi cv. Nipponbare yang membawa gen *OsDREB1A* telah dihasilkan. Akan tetapi, studi respon tanaman transgenik padi Nipponbare tersebut terhadap cekaman salinitas belum dilakukan. Tujuan penelitian adalah untuk mempelajari respon tanaman transgenik padi cv. Nipponbare-*OsDREB1A* generasi T1 terhadap cekaman salinitas. Hasil menunjukkan bahwa respon tanaman padi transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* terhadap cekaman salinitas 25 mM dan 150 mM NaCl mengindikasikan adanya tingkat toleransi yang bervariasi dari sangat peka sampai sangat toleran. Variasi ini kemungkinan terjadi karena adanya segregasi dari tanaman transgenik generasi T1. Berdasarkan skoring gejala kerusakan dan analisis PCR memberikan informasi bahwa tanaman transgenik padi Nipponbare-*OsDREB1A* yang menunjukkan PCR positif mempunyai toleransi yang sangat tinggi terhadap cekaman salinitas 150 mM dibandingkan dengan tanaman padi non-transgenik cv. Nipponbare.

Kata kunci: Padi (*Oryza sativa* L.), tanaman transgenik, gen *OsDREB1A*, salinitas, PCR

PENDAHULUAN

Salinitas tanah atau lahan pertanian telah menjadi salah satu masalah serius dalam produksi tanaman padi di Indonesia. Menurut penelitian, lahan persawahan yang mengalami intrusi air laut sehingga tanahnya bersifat salin saat ini semakin meluas. Daerah-daerah tersebut berada di sepanjang pantai utara dan selatan Pulau Jawa (Las *et al.*, 2008). Selain itu juga, tanah salin terbentuk di daerah Aceh dan Nias yang beberapa tahun yang lalu mengalami musibah tsunami (Sembiring *et al.*, 2008). Sedangkan di belahan Indonesia bagian Timur seperti Sulawesi Selatan dan Flores (Nusa Tenggara

Timur) juga telah mengalami intrusi air laut ke daratan dan telah masuk ke lahan pertanian (Sembiring *et al.*, 2008). Namun informasi yang akurat tentang penambahan lahan salin tiap tahunnya belum ada. Sedangkan berdasar informasi sebelumnya, lahan salin dapat meliputi daerah pasang surut yang luasnya hampir mencapai 24,40 ha yang tersebar di Pulau Sumatera, Kalimantan, Jawa dan Papua (Balai Penelitian Rawa, 2005). Salinitas tinggi ditandai kandungan garam (kegaraman) yang tinggi pada tanah atau lahan pertanian akan bersifat racun/toksik bagi tanaman. Oleh karena itu proses fisiologis dan fisik pada tanaman menjadi terganggu.

Dengan demikian, lahan-lahan dengan salinitas tinggi akan sulit bagi tanaman termasuk padi, untuk dapat tumbuh normal.

Faktor transkripsi adalah urutan khusus asam amino yang berikatan dengan DNA untuk mengontrol proses penempelan RNA polimerase pada DNA sehingga mengontrol transkripsi gen. Faktor transkripsi ini mempunyai bagian-bagian spesifik atau disebut dengan *domain*. Faktor transkripsi ini terdiri dari 2 domain, yaitu DNA *binding domain* dan *cis-acting domain* (Haake et al., 2002).

Gen *dehydration-responsive element binding* (DREB) merupakan faktor transkripsi dari gen famili *EREBP* yang mengatur ekspresi dari sejumlah gen yang bertanggung jawab terhadap sifat ketahanan terhadap cekaman lingkungan (Xiong dan Fei, 2006). Gen faktor transkripsi *DREB* telah berhasil diisolasi dan di over-ekspresikan pada tanaman (Xiong dan Fei, 2006). Faktor transkripsi *DREB* ketika di over-ekspresikan pada *Arabidopsis* mampu meningkatkan ekspresi gen-gen yang terkait cekaman abiotik sehingga menimbulkan ketahanan terhadap salinitas tinggi, kekeringan, dan suhu dingin (Kasuga et al., 1999). Begitu pula dengan ortolog dari *DREB* pada padi, yaitu *OsDREB1A* ketika di over-ekspresikan pada *Arabidopsis* meningkatkan toleransi terhadap salinitas tinggi, kekeringan dan suhu dingin (Dubouzet et al., 2003). Bukti-bukti ini mengindikasikan adanya konservasi mekanisme molekuler dan fungsi dari famili faktor transkripsi *DREB* ini pada tanaman monokotil dan dikotil.

Isolasi gen *DREB1A* dari tanaman padi dan mengintroduksi kembali gen tersebut (over-ekspresi) ke tanaman padi cv. Nipponbare telah dilakukan menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens* (Yunus et al., 2007). Namun, tanaman padi transgenik yang membawa gen *OsDREB1A* belum diuji toleransinya terhadap cekaman salinitas. Pengujian tanaman Nipponbare-*OsDREB1* generasi T1 dengan salah satu perlakuan cekaman abiotik yaitu kekeringan menunjukkan bahwa beberapa tanaman segregan mempunyai respon toleransi yang

relatif tinggi terhadap kekeringan (Santoso et al., 2009).

Tujuan penelitian adalah untuk mempelajari respon tanaman padi transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* generasi T1 (masih mengalami segregasi) untuk toleransi terhadap cekaman salinitas pada 25 mM dan 150 mM NaCl dan melakukan analisis PCR untuk mengetahui keberadaan gen *OsDREB1A* pada tanaman padi generasi T1 tersebut.

BAHAN DAN METODA

Bahan penelitian terdiri dari dua set tanaman dimana satu set untuk pengujian cekaman salinitas 25 mM NaCl dan satu set lagi untuk pengujian cekaman salinitas 150 mM NaCl. Satu set bahan tanaman terdiri dari 96 tanaman dari dua galur padi transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* generasi T1, yaitu galur 4D (48 tanaman) dan galur 5D (48 tanaman). Selain itu, padi Nipponbare non-transgenik disertakan dalam masing-masing set penelitian sebagai kontrol. Kontrol azogous dari Nipponbare tidak diikuti dalam penelitian ini karena pengujian dilakukan pada generasi T1. Masing-masing individu tanaman padi cv. Nipponbare transgenik generasi T1 bertindak sebagai satu sampel uji sehingga tidak bisa digunakan sebagai ulangan, maka dalam penelitian ini tidak menggunakan rancangan percobaan. Sebagai informasi tambahan, materi tanaman transgenik yang digunakan dalam penelitian belum dianalisis Southern Blot sehingga informasi jumlah kopi belum diketahui.

Metoda pengujian cekaman salinitas mengikuti prosedur dari Gregorio (1997) dengan memodifikasi dalam penambahan konsentrasi NaCl.

Perkecambahan dan Penanaman Bibit Padi transgenik

Benih tanaman padi transgenik Nipponbare-*OsDREB1* dan kontrol dkecambahkan pada cawan petri. Tanaman padi yang berumur dua minggu dipindahkan pada sterofoam (ketebalan 1,5 cm) yang dilubangi (terdapat 60 lubang dengan jarak 8cm x 8cm) dan diletakkan di atas bak kaca berukuran

80cm x 50cm x 15cm yang berisi larutan Yoshida.

Perlakuan cekaman salinitas pada konsentrasi 25 mM dan 150 mM NaCl

Untuk perlakuan 25 mM NaCl, tanaman-tanaman uji diberi perlakuan cekaman salinitas dengan cara menambahkan NaCl sehingga konsentrasi akhir dalam larutan adalah 25 mM. Sebelum diberi perlakuan, tanaman-tanaman uji berumur 2 minggu di bak kaca diukur terlebih dahulu tinggi tanaman dan panjang akar sebagai data awal. Larutan diatur sehingga memiliki pH 5,0 dan dipertahankan selama perlakuan cekaman. Perlakuan cekaman dilakukan selama 15 hari, setiap lima hari dilakukan pengamatan respon tanaman dengan mengukur kembali tinggi tanaman dan panjang akarnya. Pengamatan respon tanaman padi terhadap cekaman 25 mM NaCl dilakukan dengan mengukur pertumbuhan tanaman (pertambahan tinggi dan pertambahan panjang akar) sebelum dan sesudah perlakuan cekaman NaCl. Dari selisih hasil pengukuran tinggi tanaman dan panjang akar tanaman sesudah (hari ke 15) dan sebelum (hari ke-0) perlakuan cekaman NaCl akan diperoleh angka indeks. Berdasarkan angka indeks dapat diketahui respon masing-masing tanaman padi Nipponbare transgenik generasi T1 terhadap perlakuan cekaman 25 mM NaCl.

Untuk cekaman salinitas 150 mM NaCl, dalam larutan Yoshida ditambahkan NaCl sehingga konsentrasi akhir adalah 150 mM. Tanaman-tanaman dibiarkan pada perlakuan cekaman 150 mM NaCl ini selama 3 hari. Berbeda dengan perlakuan 25 mM NaCl yang mendasarkan pada indeks tinggi tanaman dan panjang akar, pengamatan respon tanaman padi terhadap perlakuan 150 mM dilakukan dengan pemberian skor berdasarkan evaluasi standar pengamatan kerusakan akibat cekaman salinitas pada tahap bibit (Gregorio, 1997).

Isolasi DNA genom total dari tanaman terpilih dan kontrol

Galur-galur tanaman yang terpilih pada

pengujian cekaman salinitas 25 mM dan 150 mM NaCl diisolasi DNANYa untuk analisis PCR. Isolasi DNA dilakukan dengan metode CTAB melalui tiga tahap yaitu preparasi ekstrak sel, pemurnian DNA, dan pemekatan DNA (Doyle and Doyle, 1990). DNA pelet yang diperoleh kemudian dilarutkan dalam buffer TE atau ddH₂O dan siap digunakan untuk analisis PCR.

Analisis molekuler dengan PCR pada tanaman padi putatif transgenik

Analisis molekuler dilakukan hanya pada tanaman terpilih yang menunjukkan respon lebih baik dibandingkan dengan kontrol untuk pengujian cekaman 25 mM NaCl dan tanaman terpilih yang toleran dan sangat toleran pada pengujian cekaman 150 mM NaCl. Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan primer gen spesifik *hpt* (*hygromycin phospho-transferase*) yang berada satu kaset dengan gen target dan memiliki sekuen basa nukleotida untuk primer *forward* (F): 5'-GATGCCTCCGCTCGAAGTAGCG-3' dan primer *reverse* (R): 5'-GCATCTGCCGTGCACATG-3'. Reaksi amplifikasi PCR mempunyai total volume 20 µl dengan konsentrasi akhir dari masing-masing komponen adalah sebagai berikut: 1x buffer PCR (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mix, 0,5 uM primer F dan R, 1 unit Taq *DNA polymerase* dan 1 µl DNA cetakan dengan konsentrasi 50 ng/µl. Program amplifikasi PCR adalah sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 94--°C selama 3 menit sebanyak 1 siklus, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri atas: denaturasi pada suhu 94--°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 60°C selama 30 detik, pemanjangan primer pada suhu 72⁰C selama 45 detik. Pemanjangan primer terakhir selama 7 menit pada suhu 72⁰C. Selain DNA sampel juga digunakan DNA plasmid pCAMBIA-*OsDREB1A* sebagai kontrol positif dan DNA padi non transgenik serta air (tanpa DNA cetakan) masing-masing sebagai kontrol negatif. Produk PCR (amplikon) kemudian dielektroforesis dengan menggunakan gel agarosa

dan divisualisasi dengan *Chemidoc gel system* (Biorad).

HASIL

Respon padi transgenik Nipponbare generasi T1 terhadap cekaman 25 mM NaCl

Terdapat respon yang berbeda dari tanaman padi transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* setelah diberi perlakuan cekaman 25 mM NaCl. Hal ini dapat dilihat dari indeks pertambahan panjang akar dan tinggi tanaman yang diamati (Tabel 1). Berdasarkan angka indeks pertambahan panjang akar dan tinggi tanaman, respon individu-individu tanaman transgenik generasi T1 dapat dibandingkan dengan tanaman kontrol (Nipponbare non-transgenik). Pada galur transgenik 4D diperoleh 17

tanaman dari 48 tanaman uji yang menunjukkan indeks pertambahan panjang akar dan tinggi tanaman yang lebih baik dibandingkan dengan kontrol. Sementara itu pada galur transgenik 5D, hasil pengujian telah diperoleh 12 tanaman dari 48 tanaman uji yang menunjukkan respon lebih baik dibandingkan dengan tanaman kontrol (Tabel 1, Foto 1).

Respon padi putatif transgenik Nipponbare terhadap cekaman 150 mM NaCl

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa skor gejala dan toleransi yang diperlihatkan oleh tanaman padi putatif transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* generasi T1 baik galur 4D atau 5D setelah diberi perlakuan cekaman salinitas 150 mM NaCl juga bervariasi. Berbeda dengan cekaman 25 mM NaCl,

Tabel 1. Indeks pertambahan panjang akar dan tinggi tanaman padi Nipponbare-*OsDREB1A* generasi T1 (48 tanaman galur 4D dan 5D) pada 25 mM NaCl

No.	Galur Tanaman 4D	Indeks Pertambahan	
		Panjang akar	Tinggi tanaman
1	I-4D1	5,6	16,0
2	I-4D2	6,2	5,7
3	I-4D3	4,3	5,4
4	I-4D4	2,8	3,8
5	I-4D5	9,0	19,5
6	I-4D6*	11,8	26,0
7	I-4D7	8,0	19,1
8	I-4D8	9,0	16,5
9	I-4D9*	10,8	29,6
10	I-4D10*	12,2	22,4
11	I-4D11*	13,5	24,5
12	I-4D12	0,0	0,0
13	I-4D13	7,5	16,6
14	I-4D14*	11,7	23,7
15	I-4D15	5,5	16,5
16	I-4D16	8,7	21,3
17	I-4D17	8,6	15,8
18	I-4D18	0,7	0,1
19	I-4D19*	11,7	25,3
20	I-4D20*	14,9	22,9
21	I-4D21	6,4	16,8
22	I-4D22	2,1	0,4
23	I-4D23*	10,6	22,0
24	I-4D24	4,1	7,8
25	I-4D25	7,1	15,3
26	I-4D26*	12,9	24,4
27	I-4D27*	13,0	28,6
28	I-4D28*	12,9	25,7
29	I-4D29*	11,3	24,9
30	I-4D30*	11,5	25,4

No.	Galur Tanaman 5D	Indeks pertambahan	
		Panjang Akar	Tinggi Tanaman
1	I-5D1	8,3	15,8
2	I-5D2*	13,5	26,2
3	I-5D3	8,7	15,1
4	I-5D4	9,8	18,7
5	I-5D5	9,7	21,2
6	I-5D6	7,7	17,0
7	I-5D7*	12,3	28,5
8	I-5D8*	11,7	26,9
9	I-5D9*	10,2	26,4
10	I-5D10	7,9	15,5
11	I-5D11*	12,9	27,8
12	I-5D12	9,4	18,6
13	I-5D13	7,9	17,1
14	I-5D14	9,0	19,8
15	I-5D15*	12,2	25,4
16	I-5D16	8,9	12,0
17	I-5D17	9,3	13,7
18	I-5D18*	13,3	26,9
19	I-5D19	8,4	18,3
20	I-5D20*	15,8	26,8
21	I-5D21	8,9	19,4
22	I-5D22	9,5	21,4
23	I-5D23	6,2	16,1
24	I-5D24	4,8	13,4
25	I-5D25	9,3	18,0
26	I-5D26*	12,0	28,7
27	I-5D27	4,0	19,6
28	I-5D28	9,1	18,5
29	I-5D29	9,5	17,4
30	I-5D30	8,2	20,9

No.	Galur Tanaman 4D	Indeks Pertambahan	
		Panjang akar	Tinggi tanaman
31	I-4D31*	11,4	24,4
32	I-4D32	6,7	19,5
33	I-4D33*	13,2	27,4
34	I-4D34	8,3	19,3
35	I-4D35	7,7	18,5
36	I-4D36	2,3	5,0
37	I-4D37	9,0	17,2
38	I-4D38	9,2	19,9
39	I-4D39	7,3	18,2
40	I-4D40*	13,9	26,5
41	I-4D41*	12,3	23,0
42	I-4D42	5,1	19,0
43	I-4D43	6,4	9,7
44	I-4D44	9,3	8,4
45	I-4D45	6,0	20,2
46	I-4D46	5,5	16,8
47	I-4D47	6,1	23,9
48	I-4D48	4,2	6,6
Nipponbare NT 1		8,6	17,7
Nipponbare NT 2		7,8	18,3
Nipponbare NT 3		6,2	12,9

No.	Galur Tanaman 5D	Indeks pertambahan	
		Panjang Akar	Tinggi Tanaman
31	I-5D31	8,9	12,2
32	I-5D32	7,3	16,4
33	I-5D33	8,2	20,6
34	I-5D34	9,7	19,6
35	I-5D35	8,1	18,0
36	I-5D36	8,6	17,0
37	I-5D37	5,6	19,0
38	I-5D38*	12,4	28,4
39	I-5D39	8,1	19,4
40	I-5D40	7,3	17,5
41	I-5D41	9,6	16,3
42	I-5D42	8,2	9,3
43	I-5D43	9,0	19,7
44	I-5D44*	11,7	26,1
45	I-5D45	8,7	19,0
46	I-5D46*	11,1	26,3
47	I-5D47	8,9	22,5
48	I-5D48	3,4	6,7
Nipponbare NT 4		9,4	18,5
Nipponbare NT 5		6,7	17,6

*) Tanaman transgenik yang mempunyai respon lebih baik dibandingkan tanaman kontrol (Nipponbare NT, non-transgenik)

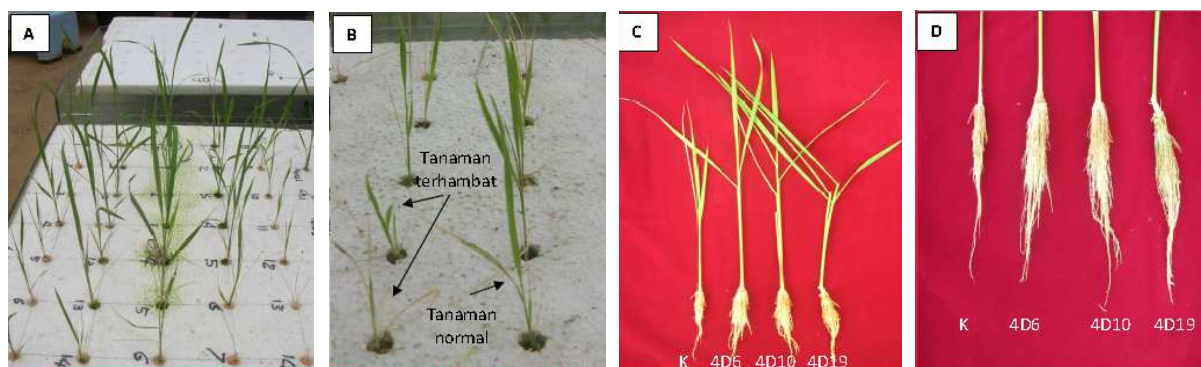


Foto 1. Respon perkembangan dari contoh tanaman padi Nipponbare transgenik generasi T1 galur 4D pada perlakuan cekaman salinitas 25 mM NaCl di rumah kaca. A. Kondisi tanaman setelah pengujian 25 mM NaCl, B. Beberapa tanaman ada yang menunjukkan penghambatan pertumbuhan dan tumbuh normal (tanda panah), C. Penampilan pertumbuhan tiga tanaman transgenik dibandingkan dengan kontrol, dan D. Penampilan panjang akar tiga tanaman transgenik dibandingkan dengan kontrol. Keterangan, K=Kontrol (Nipponbare), dan 4D6, 4D10, 4D19 merupakan contoh tanaman yang mempunyai respon pertumbuhan (tinggi tanaman dan panjang akar) lebih baik dibandingkan dengan kontrol

respon galur-galur tanaman padi putatif transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* pada cekaman 150 mM didasarkan pada skoring kerusakan tanaman seperti yang dilakukan oleh Gregorio (1997). Berdasarkan skoring dan penentuan toleransi terhadap cekaman salinitas, galur 4D menghasilkan tanaman toleran dan sangat toleran masing-masing 2 dan 7 tanaman. Sementara itu, untuk galur transgenik 5D menghasilkan tanaman yang toleran dan sangat toleran masing-masing sebanyak 1 dan 10 tanaman (Tabel 2). Galur toleran atau sangat toleran ditandai dengan pertumbuhan normal tanaman tersebut (daun masih hijau segar), sementara galur tanaman peka atau sangat peka diindikasikan dengan kering atau matinya tanaman (Foto 2).

Analisis molekuler tanaman padi putatif transgenik menggunakan teknik PCR

Sampel-sampel tanaman putatif transgenik yang dianalisis PCR adalah tanaman padi Nipponbare-*OsDREB1A* yang menunjukkan respon perkembangan tanaman lebih baik dibandingkan dengan kontrol pada perlakuan 25 mM NaCl dan tanaman toleran (T) dan sangat toleran (ST) pada perlakuan 150 mM NaCl. Hasil analisis PCR tanaman-tanaman padi terpilih pada perlakuan 25 mM NaCl menunjukkan bahwa dari 17 tanaman terpilih galur 4D diperoleh 12 tanaman yang positif PCR (Tabel 3, Foto 3). Tanaman positif PCR diindikasikan dengan dihasilkannya amplicon berukuran 500 bp (Foto 3). Sementara itu, hasil analisis 12 tanaman terpilih



Foto 2. Respon tanaman padi Nipponbare transgenik generasi T1 galur 5D pada pengujian cekaman salinitas 150 mM NaCl di rumah kaca. Beberapa tanaman menunjukkan respon toleran dan beberapa tanaman yang lain peka (masing-masing ditunjukkan dengan anak panah).

Tabel 2. Hasil skoring 48 galur tanaman 4D dan 5D padi putatif transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* generasi T1 setelah diberi perlakuan cekaman 150 mM NaCl

No	Galur Tanaman 4D	Skor kerusakan	Toleransi	No.	Galur Tanaman 5D	Skor kerusakan	Toleransi
1	II-4D1*	1	ST	1	II-5D1	7	P
2	II-4D2	7	P	2	II-5D2	9	SP
3	II-4D3	7	P	3	II-5D3	9	SP
4	II-4D4	9	SP	4	II-5D4	9	SP
5	II-4D5	7	P	5	II-5D5	9	SP
6	II-4D6	5	MT	6	II-5D6	7	P
7	II-4D7	5	MT	7	II-5D7	5	MT
8	II-4D8	7	P	8	II-5D8*	1	ST
9	II-4D9	5	MT	9	II-5D9	7	P
10	II-4D10	5	MT	10	II-5D10	5	MT
11	II-4D11*	1	ST	11	II-5D11	9	SP
12	II-4D12	5	MT	12	II-5D12	7	P
13	II-4D13	9	SP	13	II-5D13	5	MT
14	II-4D14	7	P	14	II-5D14	7	P
15	II-4D15	9	SP	15	II-5D15	9	SP
16	II-4D16*	3	T	16	II-5D16	5	MT
17	II-4D17	5	MT	17	II-5D17	9	SP
18	II-4D18	5	MT	18	II-5D18*	1	ST
19	II-4D19	9	SP	19	II-5D19*	1	ST
20	II-4D20*	1	ST	20	II-5D20*	1	ST
21	II-4D21	5	MT	21	II-5D21	5	MT
22	II-4D22	5	MT	22	II-5D22*	1	ST
23	II-4D23*	1	ST	23	II-5D23	5	SP
24	II-4D24	5	MT	24	II-5D24*	1	ST
25	II-4D25	5	MT	25	II-5D25	9	SP
26	II-4D26*	1	ST	26	II-5D26	7	P
27	II-4D27	5	MT	27	II-5D27	9	SP
28	II-4D28*	3	T	28	II-5D28	5	MT
29	II-4D29*	1	ST	29	II-5D29	7	P
30	II-4D30	9	SP	30	II-5D30*	1	ST
31	II-4D31	5	MT	31	II-5D31	7	P
32	II-4D32	5	MT	32	II-5D32	7	P
33	II-4D33	9	SP	33	II-5D33*	3	T
34	II-4D34	7	P	34	II-5D34	5	MT
35	II-4D35	9	SP	35	II-5D35*	1	ST
36	II-4D36	9	SP	36	II-5D36	7	P
37	II-4D37*	1	ST	37	II-5D37	5	MT
38	II-4D38	7	P	38	II-5D38	7	P
39	II-4D39	7	P	39	II-5D39	9	SP
40	II-4D40	5	MT	40	II-5D40*	1	ST
41	II-4D41	5	MT	41	II-5D41	9	SP
42	II-4D42	7	P	42	II-5D42	7	P
43	II-4D43	5	MT	43	II-5D43	5	MT
44	II-4D44	5	MT	44	II-5D44	9	SP
45	II-4D45	9	SP	45	II-5D45	7	P
46	II-4D46	5	MT	46	II-5D46	5	MT
47	II-4D47	7	P	47	II-5D47	7	P
48	II-4D48	9	SP	48	II-5D48*	1	ST
	Nipponbare NT 1	9	SP		Nipponbare NT 4	9	SP
	Nipponbare NT 2	9	SP		Nipponbare NT 5	9	SP
	Nipponbare NT 3	9	SP				

Keterangan: *) Tanaman yang mempunyai respon toleran (T) atau sangat toleran (ST). ST=sangat toleran, T=toleran, MT=moderat toleran, P=peka dan SP=sangat peka

Tabel 3. Hasil analisis PCR pada 17 tanaman galur 4D dan 12 tanaman galur 5D padi transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* generasi T1 terpilih pada perlakuan 25 mM NaCl menggunakan primer spesifik *hptII*

No.	Galur tanaman	Hasil PCR	No	Galur Tanaman	Hasil PCR
1.	I-4D6	-	1.	I-5D2	+
2.	I-4D9	+	2.	I-5D7	+
3.	I-4D10	-	3.	I-5D8	+
4.	I-4D11	-	4.	I-5D9	+
5.	I-4D14	+	5.	I-5D11	+
6.	I-4D19	-	6.	I-5D15	+
7.	I-4D20	+	7.	I-5D18	+
8.	I-4D23	+	8.	I-5D20	+
9.	I-4D26	+	9.	I-5D26	+
10.	I-4D27	+	10.	I-5D38	+
11.	I-4D28	+	11.	I-5D44	+
12.	I-4D29	+	12.	I-5D46	-
13.	I-4D30	+			
14.	I-4D31	+			
15.	I-4D33	-			
16.	I-4D40	+			
17.	I-4D41	+			

Keterangan: Hasil PCR: (+) menghasilkan amplikon berukuran 500 bp, (-) tidak menghasilkan amplikon berukuran 500 bp

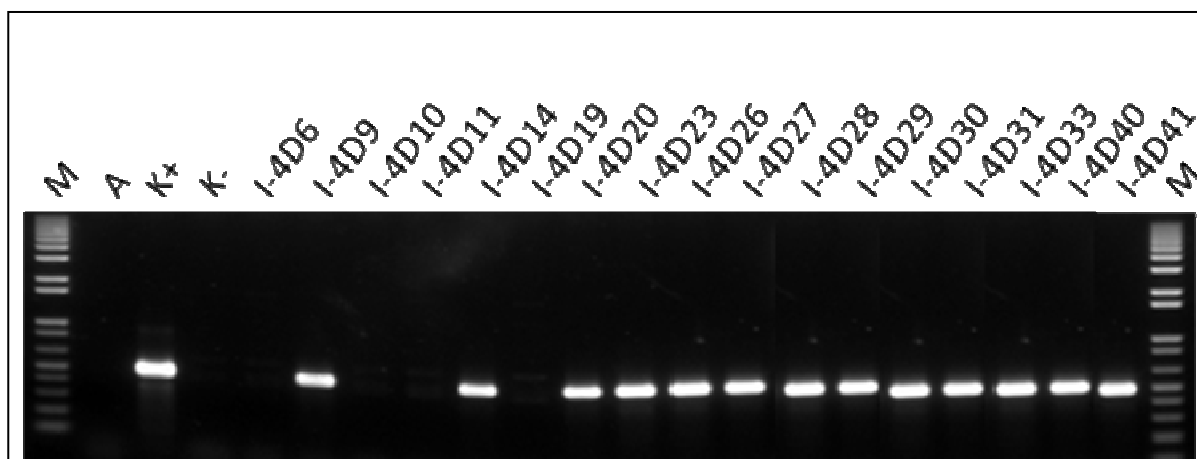


Foto 3. Gel elektroforesis hasil amplifikasi 17 tanaman galur 4D padi transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* generasi T1 pada perlakuan salinitas 25 mM NaCl menggunakan primer spesifik gen *hptII*

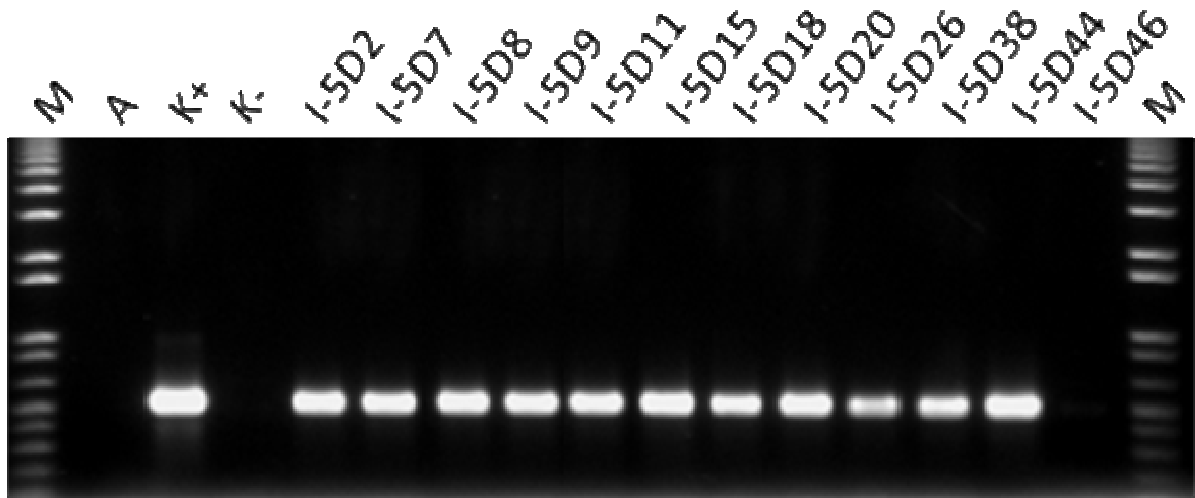


Foto 4. Gel elektroforesis hasil amplifikasi 12 tanaman galur 5D padi transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* generasi T1 pada perlakuan salinitas 25 mM NaCl menggunakan primer spesifik gen *hptII*

Tabel 4. Hasil analisis PCR pada 9 tanaman 4D dan 11 tanaman galur 5D padi transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* generasi T1 terpilih pada perlakuan 150 mM NaCl menggunakan primer spesifik *hptII*

No.	Galur tanaman	Toleransi	Hasil PCR	No.	Galur Tanaman	Toleransi	Hasil PCR
1.	II-4D1	ST	+	1.	II-5D8	ST	+
2.	II-4D11	ST	+	2.	II-5D18	ST	+
3.	II-4D16	T	-	3.	II-5D19	ST	+
4.	II-4D20	ST	+	4.	II-5D20	ST	+
5.	II-4D23	ST	+	5.	II-5D22	ST	+
6.	II-4D26	ST	+	6.	II-5D24	ST	+
7.	II-4D28	T	-	7.	II-5D30	ST	+
8.	II-4D29	ST	+	8.	II-5D33	T	-
9.	II-4D37	ST	+	9.	II-5D35	ST	+
				10.	II-5D40	ST	+
				11.	II-5D48	ST	+

Keterangan: Hasil PCR: (+) menghasilkan amplikon berukuran 500 bp, (-) tidak menghasilkan amplikon berukuran 500 bp

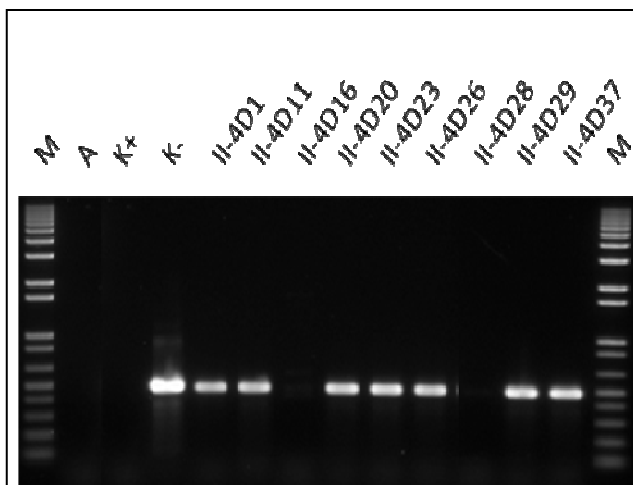


Foto 5. Gel elektroforesis hasil amplifikasi 9 galur tanaman 4D padi transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* generasi T1 pada perlakuan salinitas 150 mM NaCl menggunakan primer spesifik gen *hptII*

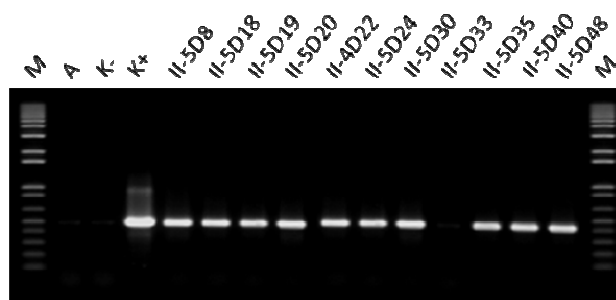


Foto 6. Gel elektroforesis hasil amplifikasi 11 tanaman galur 5D padi transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* generasi T1 pada perlakuan salinitas 150 mM NaCl menggunakan primer spesifik gen *hptII*

galur 5D diperoleh 11 tanaman yang positif PCR (Tabel 3, Foto 4).

Hasil analisis PCR terhadap 9 galur tanaman 4D padi transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* generasi T1 dengan kategori toleran dan sangat toleran berdasarkan perlakuan 150 mM NaCl menunjukkan bahwa terdapat 7 tanaman positif mengandung gen *hpt* (Tabel 4, Foto 5). Sementara itu, hasil analisis 11 tanaman terpilih galur tanaman 5D padi transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* generasi T1 pada perlakuan 150 mM NaCl diperoleh 10 tanaman yang positif PCR (Tabel 4, Foto 6).

PEMBAHASAN

Over-ekspresi gen faktor transkripsi *OsDREB1A* pada padi dapat meningkatkan toleransi tanaman terhadap cekaman salinitas (Hu *et al.*, 2008). Gen tersebut merupakan gen penyandi protein yang berperan dalam peningkatan proses transkripsi dari gen-gen yang meregulasi cekaman abiotik termasuk salinitas. Hasil penelitian menunjukkan adanya variasi respon toleransi galur tanaman padi transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* generasi T1 terhadap perlakuan cekaman salinitas 25 mM maupun 150 mM NaCl. Pada cekaman salinitas 25 mM, variasi respon ditunjukkan dengan adanya perbedaan pertumbuhan tanaman yang meliputi tinggi tanaman dan panjang akar (Tabel 1). Beberapa tanaman galur 4D dan 5D padi transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* generasi T1 pada pengujian salinitas 25 mM NaCl menunjukkan respon pertumbuhan yang lebih baik dibandingkan dengan tanaman padi Nipponbare non-transgenik. Sementara

itu pada cekaman salinitas 150 mM, variasi respon ditunjukkan oleh perbedaan toleransi galur tanaman yang berkisar dari sangat peka sampai sangat toleran (Tabel 2). Beberapa tanaman galur 4D dan 5D padi transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* generasi T1 pada pengujian salinitas 150 mM NaCl menunjukkan respon toleran dan sangat toleran.

Adanya variasi respon ini diduga berkaitan dengan generasi tanaman padi putatif transgenik yang diuji dimana galur-galur tanaman transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* adalah tanaman transgenik generasi T1. Generasi T1 galur tanaman padi transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* yang dikembangkan melalui pendekatan rekayasa genetik merupakan generasi yang setara dengan generasi F2 pada persilangan konvensional/biasa sehingga individu-individu tanaman pada generasi tersebut masih mengalami segregasi (ada yang transgenik dan tidak transgenik) dan sebagai indikasinya adalah adanya variasi respon terhadap perlakuan cekaman salinitas yang diberikan.

Tanaman padi putatif transgenik perlu diuji secara molekuler dengan teknik PCR untuk mengetahui tanaman-tanaman yang transgenik (membawa gen target). Karena materi tanaman padi transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* ini belum diketahui jumlah kopi gen yang terintegrasi (belum dilakukan), maka analisis segregasi tidak dilakukan. Sementara itu, data analisis PCR tidak mencakup semua tanaman uji sehingga analisis segregasi juga tidak bisa dilakukan pada penelitian ini. Analisis PCR pada tingkat awal dilakukan dengan menggunakan primer spesifik *hpt* (*hygromycin*

phospho-transferase). Tidak digunakannya primer spesifik untuk gen target *OsDREB1A* karena secara alami (indigenus) gen tersebut ada dalam tanaman padi. Oleh karena itu diperlukan strategi lain salah satunya menggunakan primer spesifik untuk gen penyeleksi (dalam hal ini gen *hpt*) yang posisinya berada dalam satu konstruk vektor dengan gen target (gen *OsDREB1A*).

Berdasarkan hasil analisis PCR pada tanaman transgenik generasi T1 (bersegregasi) yang menunjukkan pertumbuhan yang lebih baik pada perlakuan 25 mM, maka dapat diketahui tanaman yang transgenik (positif PCR) dan yang bukan transgenik (negatif PCR). Tanaman transgenik (PCR positif) diindikasikan dengan terbentuknya ampikon DNA berukuran 500 bp. Meskipun sampel tanaman yang dianalisis PCR merupakan tanaman dengan pertumbuhan yang lebih baik dari control (diperkirakan transgenik) namun masih ditemukan adanya tanaman yang negatif PCR. Diduga ada beberapa hal yang tidak terkontrol (*escape*). Pertama, konsentrasi NaCl pada media larutan Yoshida sudah menurun selama 15 hari perlakuan karena selama pengujian tidak dilakukan penggantian larutan Yoshida. Oleh karena itu beberapa tanaman padi yang bukan transgenik mampu melakukan *recovery* (pulih dari tekanan cekaman dan hidup normal kembali). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Harjadi dan Yahya (1988) yang menyatakan bahwa bentuk ketahanan tanaman terhadap cekaman lingkungan bersifat dapat balik, artinya tanaman akan tumbuh normal kembali apabila kondisi lingkungannya dikembalikan pada keadaan normal. Kedua, lamanya waktu yang digunakan untuk perlakuan pemaparan NaCl kemungkinan tidak cukup untuk bisa menghambat pertumbuhan tanaman-tanaman tersebut, karena tanaman-tanaman tersebut memiliki vigor atau pertumbuhan yang lebih baik dibandingkan dengan tanaman bukan transgenik yang lain. Oleh karena itu, tanaman-tanaman tersebut mempunyai pertumbuhan yang juga lebih baik dibandingkan dengan kontrol. Apabila waktu pemaparan NaCl 25 mM diperpanjang ada kemungkinan tanaman-tanaman tersebut juga pada akhirnya akan menunjukkan pertumbuhan yang

terhambat seperti yang ditunjukkan tanaman padi Nipponbare non-transgenik (tipe liar). Namun hal ini memerlukan penelitian lebih lanjut.

Hasil analisis PCR galur-galur tanaman padi transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* generasi T1 yang toleran dan sangat toleran pada perlakuan cekaman 150 mM NaCl juga terdapat tanaman yang PCR negatif atau bukan transgenik. Dari data toleransi, tanaman-tanaman yang negatif PCR tersebut ternyata merupakan galur-galur tanaman padi dengan kategori toleran (T), sementara galur tanaman yang PCR positif merupakan galur tanaman yang sangat toleran (ST) (Tabel 4). Hal ini mengindikasikan bahwa toleransi yang sangat tinggi terhadap cekaman salinitas tinggi dari galur-galur tanaman transgenik tersebut diharapkan merupakan ekspresi dari gen *OsDREB1A* yang telah terintegrasi ke dalam tanaman.

Padi termasuk ke dalam kelompok tanaman yang memiliki toleransi sedang terhadap salinitas (Soertini, 2001). Hal ini dibuktikan pada pengujian galur-galur tanaman padi transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* generasi T1 dengan cekaman salinitas 25 mM NaCl. Tanaman padi Nipponbare tipe liar (non-transgenik) hanya mengalami sedikit penghambatan pertumbuhan diindikasikan dari nilai indeks tinggi tanaman dan panjang akar (Tabel 1). Namun pada perlakuan cekaman salinitas dengan konsentrasi 150 mM NaCl, padi Nipponbare tipe liar (non-transgenik) mempunyai respon sangat peka (Tabel 2). Cekaman salinitas 25 mM NaCl hanya berpengaruh terhadap penghambatan pertumbuhan baik akar maupun tinggi tanaman, tetapi tanaman tidak sampai mengalami kerusakan atau bahkan kematian tanaman. Oleh karena itu untuk keperluan seleksi atau skrining padi transgenik toleran terhadap cekaman salinitas karena adanya over-ekspresi gen faktor transkripsi *OsDREB1A* diperlukan konsentrasi NaCl yang lebih tinggi. Hal ini dilakukan supaya dapat diperoleh perbedaan toleransi yang lebih nyata antara padi transgenik Nipponbare yang toleran dan yang peka. Padi transgenik yang toleran salinitas akan dapat bertahan hidup secara normal pada kondisi cekaman salinitas tinggi dengan indikasi

tidak/sedikit memperlihatkan gejala kerusakan akibat konsentrasi NaCl yang tinggi. Sementara padi peka akan memperlihatkan adanya gejala kerusakan yang jelas akibat konsentrasi NaCl yang tinggi. Gejala kerusakan yang terlihat dapat berupa pertumbuhan tanaman terhenti, daun menggulung dan mengering pada bagian ujung, terjadi gejala klorosis, dan bahkan terjadi kematian pada beberapa tanaman yang sangat rentan (Gregorio, 1997). Pada penelitian ini, galur-galur tanaman yang mengalami kerusakan yang parah (daun menggulung, tanaman mengering bahkan sampai mengalami kematian) diindikasikan dengan skor 7 dan 9 juga dapat dijumpai pada hasil pengamatan (Tabel 2).

Over-ekspresi gen faktor transkripsi *OsDREB1A* yang telah terintegrasi ke dalam padi Nipponbare diduga akan mengaktifkan gen-gen target terkait dengan cekaman abiotik, termasuk cekaman salinitas tinggi, sehingga tanaman padi Nipponbare-*OsDREB1A* menjadi toleran. Beberapa penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa over-ekspresi gen faktor transkripsi *OsDREB1A* dapat meningkatkan ekspresi dari gen-gen target yang berhubungan dengan ketahanan terhadap salinitas seperti gen yang menyandikan protein hidrofilik atau gen yang terlibat dalam lintasan respon asam absisat sehingga meningkatkan toleransi tanaman padi terhadap salinitas tinggi (Xiong dan Fei 2006; Oh *et al.* 2005).

KESIMPULAN

Respon padi transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* generasi T1 terhadap cekaman salinitas 25 mM dan 150 mM NaCl menunjukkan toleransi yang bervariasi dari pertumbuhan yang terhambat sampai normal (25 mM) dan dari sangat peka sampai sangat toleran (150 mM) karena adanya segregasi diantara individu tanaman. Perlakuan salinitas dengan menggunakan konsentrasi 150 mM NaCl dapat lebih membedakan tingkat toleransi secara nyata. Tanaman padi transgenik Nipponbare-*OsDREB1A* generasi T1 yang positif PCR menunjukkan toleransi yang sangat tinggi pada cekaman salinitas 150 mM NaCl dibandingkan dengan padi

Nipponbare non-transgenik.

DAFTAR PUSTAKA

- Balai Penelitian Rawa(Balittra). 2005. *Laporan Tahunan Penelitian Pertanian Lahan Rawa Tahun 2004*. Trip Alihamsyah dan Izzuddin Noor (Penyunting). Balai Penelitian Pertanian Lahan Rawa. Banjarbaru
- Doyle JJ and JL Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**, 13-15
- Dubouzet JG, Y Sakuma, Y Ito, M Kasuga, EG Dubouzet, S Miura, M Seki, K Shinozaki and K Yamaguchi-Shinozaki. 2003. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* encode transcription activators that function in drought, high-salt and cold-responsive gene expression. *Plant Journal* **33**, 751-763.
- Gregorio. 1997. Screening rice for salinity tolerance. *IRRI Discussion* **22**, 3-13.
- Haake V, DCook, JLRiechmann, MF Thomashow and JZ Zhang. 2002. Transcription faktor DREB is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **130**, 639-648.
- Harjadi SS dan S Yahya. 1988. *Fisiologi Stress Lingkungan*. PAU Bioteknologi-Institut Pertanian Bogor.
- Hu H, M Dai, J Yao, B Xiao, X Li, Q Zhang and L Xiong. 2008. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceeding National Academy Science USA* **103**, 12987-12992.
- Kasuga M, Q Liu, Miura S, K Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki K. 1999. Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *National Biotechnology* **17**, 287-291.
- Las I, E Surmaini dan A Ruskandar. 2008. Antisipasi perubahan iklim: inovasi teknologi dan arah penelitian padi di Indonesia. *Prosiding Seminar Nasional Padi 2008: Inovasi Teknologi Padi Mengantisipasi Perubahan Iklim Global Mendukung Ketahanan Pangan*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Padi, Sukamandi.
- Oh SJ, IS Sang, SK Youn, JJ Hyun, YK Soo, K Minjeong, KK Yeon, HN Baek and KK Ju. 2005. *Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in Transgenic Rice Increased Tolerance to Abiotic Stress Stunting Growth. *Plant Physiology*. **138**, 341-351.
- Santoso TJ, A Apriana, A Sisharmini, Tasliah, S Moel-jopawiro dan IH Soemantri. 2009. Perakitan Padi Transgenik Toleran Kekeringan dan Tahan Blas Yang Dapat Menekan 20% Kehilangan Hasil dengan Produktivitas 7-8,5 ton/ha. *Laporan Tahunan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian*. Bogor.
- Sembiring H, A Gani and T Iskandar. 2008. Implications of salinity research in Aceh for Indonesian rice growing. In: F Agus and G Tinning (Eds.). *Proceedings on International Workshop on Post Tsunami Soil Management*. Soil Research Institute-Ministry of Agriculture Indonesian-Soil Research Institute.
- Soertini S. 2003. Aplikasi mutasi induksi dan variasi somaklonal dalam pemuliaan tanaman. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian* **22(2)**, 70-78.
- Xiong YW and SZ Fei. 2006. Functional and phylogenetic analysis of a DREB/CBF-like gene in *Perennial ryegrass* (*Lolium perenne* L.). *Planta* **224**, 878-888.
- Yunus M, D Suardi, KR Trijatmiko, Tasliah dan A Dadang. 2007. Identifikasi gen toleran kekeringan pada padi dengan menggunakan analisis DNA microarrays. *Laporan Akhir Penelitian*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. Bogor.