

Deteksi Gen *HptII* dan Keragaan Agronomis pada Populasi BC₁F₁ Tanaman Padi Transgenik

Budi Santosa*, Kurniawan R. Trijatmiko, dan Tri J. Santoso

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: budi_sandy@yahoo.co.id

Diajukan: 24 Mei 2013; Diterima: 18 September 2013

ABSTRACT

Detection of *HptII* Gene and Agronomic Performance of F₁ and BC₁F₁ Populations of Transgenic Rice. Budi Santosa, Kurniawan R. Trijatmiko, and Tri J. Santoso.

Rice varieties tolerant to drought stress are needed to stabilize rice production under drought stress condition. We developed transgenic rice cv. Nipponbare carrying *hptII* gene that might also contain *OsDREB1A* gene. *OsDREB1A* gene responsible to drought tolerance trait need to be transferred into cultivated rice in order to obtain new local rice variety tolerant to drought stress. The aims of this research were to detect the presence of *hptII* gene in the F₁ and BC₁F₁ transgenic rice and to observe the agronomic performance of those populations and their plant physiology. F₁ population was developed by crossing transgenic Nipponbare, as donor parent, with Batutegi, Code, Ciherang, and Konawe genotypes, as recipient parents. BC₁F₁ population was developed by backcrossing F₁ transgenic line with recipient parents, respectively. The presence of *hptII* gene was analyzed by PCR using a pair of primers for *hptII*. The observation of agronomic performance was carried out in the green house, meanwhile the observation of stomata was done using microscope. The result of PCR analysis showed that BC₁F₁ Batutegi trans, BC₁F₁ Code trans, BC₁F₁ Konawe trans1, BC₁F₁ Konawe trans3, dan BC₁F₁ Konawe trans4 were detected carrying the *hptII* gene. Agronomic data showed that BC₁F₁ transgenic rice lines yielded panicles, filled grains, and total grains higher than those of recipient parents. Comparing to the recipient parents, BC₁F₁ Konawe trans1 and BC₁F₁ Konawe trans3 had less stomata on the lower side of the leaf, but had more stomata on the upper side of the leaf.

Keywords: *HptII* gene, transgenic rice, backcross, agronomic performance.

ABSTRAK

Deteksi Gen *HptII* dan Keragaan Agronomis pada Populasi BC₁F₁ Tanaman Padi Transgenik. Budi Santosa, Kurniawan R. Trijatmiko, dan Tri J. Santoso. Varietas unggul padi toleran terhadap cekaman kekeringan dibutuhkan untuk mengurangi kehilangan hasil akibat cekaman tersebut. Padi Nipponbare transgenik yang mengandung gen *hptII* telah dihasilkan oleh BB Biogen. Padi transgenik ter-

sebut diduga juga membawa gen *OsDREB1A*, karena gen *hptII* berada dalam satu konstruk dengan gen *OsDREB1A*. Padi kultivar Nipponbare bukan merupakan padi yang dibudidayakan di Indonesia, sehingga gen *OsDREB1A* yang ada pada padi Nipponbare tersebut perlu dipindahkan ke dalam varietas budi daya untuk memperoleh varietas unggul baru yang toleran terhadap kekeringan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keberadaan gen *hptII* pada tanaman F₁ dan BC₁F₁ transgenik dan keragaan agronomisnya. Populasi F₁ dibentuk dengan menyilangkan Nipponbare transgenik, sebagai tetua donor, dengan genotipe padi Batutegi, Code, Ciherang, dan Konawe, sebagai tetua penerima. Populasi BC₁F₁ dibentuk dengan silang balik antara tanaman padi F₁ transgenik dengan tetua penerimanya. Keberadaan gen *hptII* dianalisis dengan PCR menggunakan sepasang primer *hptII*. Pengamatan terhadap beberapa karakter agronomis dan fisiologis tanaman dilakukan di rumah kaca. Hasil penelitian menunjukkan bahwa padi BC₁F₁ Batutegi trans, BC₁F₁ Code trans, BC₁F₁ Konawe trans1, BC₁F₁ Konawe trans3, dan BC₁F₁ Konawe trans4 mengandung gen *hptII* setelah dianalisis dengan PCR. Berdasarkan pengamatan agronomis diketahui bahwa kelima tanaman padi BC₁F₁ transgenik menghasilkan jumlah malai, jumlah gabah isi maupun jumlah gabah total yang lebih banyak daripada tetua penerima. Jika dibandingkan dengan padi tetua penerima, padi BC₁F₁ Konawe trans1 dan BC₁F₁ Konawe trans3 memiliki jumlah stomata lebih sedikit pada permukaan daun bagian bawah dan jumlah stomata lebih banyak pada permukaan daun bagian atas.

Kata kunci: Gen *hptII*, padi transgenik, silang balik, keragaan agronomis.

PENDAHULUAN

Produksi padi secara nasional seringkali mengalami kendala abiotik termasuk salah satunya kekeringan. Pemanasan global menyebabkan perubahan iklim yang tidak menentu yang mengakibatkan frekuensi tanam padi per tahun menjadi berkurang, yang biasanya tiga kali menjadi dua atau satu kali setahun. Berkurangnya ketersediaan air tanah untuk tanaman padi pada lahan sawah dapat menyebabkan kekeringan sehingga dapat menurunkan produksi padi bahkan dapat gagal panen. Akibat cekaman kekeringan, penurunan hasil tanaman padi dapat mencapai 50% (Jongdee *et al.*, 2006).

Penggunaan varietas padi toleran kekeringan merupakan salah satu alternatif untuk mengatasi masalah kekeringan, sehingga tanaman padi masih dapat berproduksi. Keberhasilan memperbaiki sifat toleransi kekeringan pada tanaman padi, baik lokal maupun unggul masih sangat terbatas (Suardi *et al.*, 2004). Hal ini terjadi karena sifat toleran kekeringan dikendalikan oleh banyak gen, sehingga sulit dan membutuhkan waktu lama untuk menghasilkan varietas padi unggul toleran kekeringan melalui persilangan konvensional. Perakitan varietas padi toleran kekeringan dapat dilakukan dengan menggunakan teknik rekayasa genetik, yaitu transformasi gen *DREB* ke dalam tanaman padi yang diinginkan.

Gen *OsDREB1* termasuk gen faktor transkripsi yang berperan dalam meregulasi sejumlah gen lain yang berhubungan dengan karakter cekaman kekeringan, salinitas tinggi, dan suhu dingin (Dubouzet *et al.*, 2003; Ping *et al.*, 2005). Tanaman tomat transgenik yang membawa gen *CBF1/DREB1B* menunjukkan penampilan yang lebih toleran terhadap kekeringan (Hsieh *et al.*, 2002). Tanaman padi subspecies *japonica* yang ditransformasi dengan gen *35S::OsDREB1A* memperlihatkan sifat lebih toleran terhadap kekeringan (Ito *et al.*, 2006). Pada tanaman gandum transgenik, gen *DREB1A* meningkatkan toleransi terhadap kekurangan air (Pellegrineschi *et al.*, 2004). Padi subspecies *japonica* (Nipponbare) toleran terhadap defisit air pada kondisi suhu rendah dengan gen *OsDREB1A* (JIRCAS, 2005). Transformasi gen *OsDREB1A* melalui vektor bakteri *Agrobacterium tumefaciens* ke tanaman padi Nipponbare telah menghasilkan tanaman padi Nipponbare transgenik generasi T_0 yang positif mengandung gen *hptII* (Santosa *et al.*, 2011). Genotipe padi Nipponbare transgenik generasi T_1 telah diuji untuk toleran terhadap kekeringan dan menghasilkan empat tanaman padi Nipponbare transgenik toleran kekeringan, yaitu genotipe B11, B14, C10, dan C14 (Santosa, 2012).

Pada saat ini, empat genotipe padi F_1 transgenik, yaitu Batutegi transgenik, Ciherang transgenik, Code transgenik, dan Konawe transgenik yang telah dihasilkan belum dievaluasi terhadap cekaman kekeringan. Genotipe-genotipe tersebut merupakan hasil persilangan antara padi Batutegi, Ciherang, Code, dan Konawe dengan Nipponbare transgenik yang mengandung gen *hptII* dan diduga juga mengandung gen *OsDREB1A*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keberadaan gen *hptII* pada tanaman F_1 dan BC_1F_1 transgenik, serta keragaan agronomis dan fisiologis tanaman.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Rumah Kaca dan Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah empat genotipe padi Nipponbare transgenik (B10, B14, C10, dan C14) dan empat genotipe padi generasi F_1 transgenik (Batutegi, Ciherang, Code, dan Konawe), yang mengandung gen *hptII* dan gen *OsDREB1A*, sebagai tetua jantan (donor). Empat genotipe padi nontransgenik Batutegi, Ciherang, Code, dan Konawe sebagai tetua betina (tetua penerima), Singkarak (kontrol peka), dan Kalimutu (kontrol toleran).

Pembentukan Populasi F_1 Transgenik

Populasi padi F_1 transgenik berasal dari sepuluh kombinasi persilangan dengan menggunakan metode Jennings *et al.* (1979). Persilangan dilakukan antara genotipe tanaman padi Nipponbare transgenik galur B11, B14, C10, dan C14, sebagai tetua donor, dengan genotipe Batutegi, Ciherang, Code, dan Konawe, sebagai tetua penerima.

Uji Kekeringan

Metode untuk pengujian toleransi kekeringan pada fase bibit mengikuti prosedur dari Oh *et al.* (2005). Biji-biji padi F_1 transgenik dikecambahkan pada cawan petri yang telah diberi kertas saring dan air. Bibit padi F_1 transgenik kemudian ditanam ke dalam pot sebanyak lima tanaman/pot. Media tanam dalam pot (diameter 13 cm, tinggi 11 cm) adalah campuran antara tanah + pasir + pupuk organik (1 : 1 : 1). Sebelum perlakuan, tanaman disiram air sebanyak 750 ml/10 kg sekali menyiram (Sammaullah dan Daradjat, 2001) dan penyiraman satu atau dua hari sekali sampai tanaman berumur sekitar empat minggu. Perlakuan cekaman kekeringan diberikan dengan menghentikan penyiraman sampai tanaman kontrol peka (Singkarak) menunjukkan gejala layu, kemudian dilakukan pengamatan pertama (daun menggulung pada fase vegetatif). Pengamatan kedua dilakukan pada saat semua daun tanaman kontrol peka mengering. Setelah pengamatan selesai, dilakukan pemulihan tanaman dengan cara disiram air. Pada tanaman yang masih tumbuh selanjutnya dilakukan penilaian kesembuhan tanaman. Penilaian skor penggulungan daun, pengeringan tanaman/daun dan kesembuhan tanaman dilakukan berdasarkan *Standard Evaluation System for Rice* (IRRI, 1996; Silitonga *et al.*, 2003).

Pembentukan Populasi BC₁F₁ Transgenik

Tanaman padi generasi F₁ transgenik yang terseleksi dari pengujian kekeringan kemudian dipindahkan ke media tumbuh normal, dipelihara sampai fase generatif dan digunakan sebagai tetua jantan (donor) untuk *backcross* (silang balik) dengan tanaman padi nontransgenik berdasarkan metode Jennings *et al.* (1979). Biji padi generasi BC₁F₁ yang diperoleh dari hasil *backcross* kemudian ditanam pada pertumbuhan normal (disiram normal). Analisis molekuler dilakukan dengan teknik PCR menggunakan primer *hptII*. Pengamatan agronomis dilakukan untuk variabel tinggi tanaman, jumlah malai per tanaman, panjang malai per tanaman, hasil biji per tanaman, dan jumlah stomata pada daun menggunakan mikroskop.

Analisis *HptII* pada Populasi F₁ dan BC₁F₁ Transgenik

Keberadaan gen *OsDREB1A* dideteksi berdasarkan keberadaan gen *hptII* menggunakan PCR dengan sepasang primer untuk gen *hptII*. DNA daun muda tanaman padi diisolasi dari sampel tanaman menggunakan metode Dellaporta *et al.* (1983). DNA diamplifikasi dengan sepasang primer untuk gen *hptII* campuran reaksi (2 µl 10× bufer PCR, 1,2 µl MgCl₂, 0,4 µl dNTPs, 2 µl primer *hptII*, 0,16 µl Taq DNA polimerase, 9,24 µl ddH₂O, dan 5 µl sampel DNA) diamplifikasi dengan mesin PCR pada program Hyg-60. Profil suhu yang digunakan adalah predenaturasi 94°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus meliputi pemisahan (*denaturation*) pada suhu 94°C selama 1 menit, penempelan primer (*annealing*) pada suhu 55°C selama 1 menit, dan pemanjangan primer (*extension*) pada suhu 72°C selama 2 menit. Pada tahap akhir PCR dilakukan pemanjangan akhir pada 72°C selama 5 menit. Hasil amplifikasi dicek dengan elektroforesis gel agarosa 0,8%. Sebanyak 8 µl DNA + 1 µl *loading dye* dicampur kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel. Separasi dilakukan pada voltase 80-100 V selama 1,5 jam. Gel direndam di dalam larutan 0,5 g/ml EtBr dan pita DNA divisualisasi dan didokumentasi menggunakan *Chemidoc*.

Bahan tanaman yang dianalisis adalah tujuh Tanaman F₁ transgenik, yaitu Code trans1, Code trans2, Code trans3, Code trans4, Konawe trans1, Konawe trans2, dan Batutegi trans, dan enam tanaman BC₁F₁ transgenik, yaitu Batutegi trans, Code trans, Konawe trans1, Konawe trans2, Konawe trans3, Konawe trans4.

Pengamatan Jumlah Stomata

Pengamatan jumlah stomata dilakukan pada tanaman BC₁F₁ transgenik dan tanaman kontrol dengan cara mengolesi permukaan daun padi dengan cat

kuku yang transparan. Setelah cat kuku kering kemudian diambil dengan selotip dan ditempelkan pada gelas preparat yang selanjutnya diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40× dan jumlah stomata tiap bidang pandang dihitung. Penghitungan dilakukan pada tiga bidang pandang yang berbeda.

$$\text{Kerapatan stomata} = \frac{\text{Jumlah stomata}}{\text{Satuan luas bidang pandang}}$$

$$\text{Diameter bidang pandang} = 0,5 \text{ mm}$$

$$\text{Luas bidang pandang} = \frac{1}{4}\pi d^2$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi F₁ Transgenik

Pada persilangan antara padi Nipponbare transgenik yang mengandung gen *OsDREB1A* sebagai tetua jantan (donor) dengan padi genotipe Ciherang, Batutegi, Code, dan Konawe sebagai tetua betina telah berhasil dilakukan dengan indikasi diperolehnya biji-biji hasil persilangan. Biji yang diperoleh dari masing-masing kombinasi jumlahnya bervariasi, yaitu antara 3-27 biji (Tabel 1).

Benih padi F₁ transgenik (Batutegi, Ciherang, Code, dan Konawe) selanjutnya ditanam untuk dilakukan uji terhadap cekaman kekeringan berdasarkan metode Oh *et al.* (2005). Hasil pengujian tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil pengujian kekeringan menunjukkan, dari sembilan genotipe tanaman padi F₁ transgenik yang diuji, terdapat tiga genotipe tanaman padi F₁ transgenik yang toleran terhadap kekeringan dan mengalami pemulihan kembali setelah 10 hari perlakuan kekeringan (Tabel 2). Ketiga genotipe tanaman padi F₁ transgenik tersebut adalah F₁ Batutegi transgenik (F₁ Batutegi x B11) sebanyak satu tanaman pulih dan 19 tanaman mati, F₁ Code transgenik (F₁ Code x B14) sebanyak empat tanaman pulih dan enam tanaman mati, serta F₁ Konawe transgenik (F₁ Konawe x C10) sebanyak dua tanaman pulih dan tiga tanaman mati. Tujuh genotipe tanaman padi F₁ transgenik lainnya

Tabel 1. Kombinasi dan ulangan persilangan serta jumlah biji padi F₁ transgenik.

Kombinasi persilangan	Ulangan	Jumlah biji
Batutegi x B11	1	27
Ciherang x B11	1	3
Ciherang x B14	4	14
Ciherang x C10	1	9
Code x B14	1	14
Code x C10	2	6
Code x C14	1	10
Konawe x B11	1	7
Konawe x B14	1	9
Konawe x C10	1	8

dan enam tanaman kontrol tidak mengalami pemulihan kembali atau semua mati (Tabel 2). Tanaman transgenik yang pulih dari kelayuan menunjukkan warna daun yang hijau dan dapat memproduksi biji (Gambar 1A, 1B, dan 1C).

Hasil analisis PCR dari tujuh sampel DNA padi F₁ transgenik dengan menggunakan primer *hptII* memperlihatkan adanya pita DNA berukuran 500 bp (Gambar 1D). Hal tersebut menunjukkan bahwa ketujuh tanaman padi yang berasal dari tiga genotipe padi F₁ transgenik tersebut membawa gen *hptII* dan diduga juga membawa gen *OsDREB1A*. Hal ini didasarkan pada keberadaan gen *hptII* dan gen *OsDREB1A* dalam satu konstruk dan terletak pada daerah T-DNA yang diapit oleh *left* dan *right border*.

Pengamatan agronomis menunjukkan empat genotipe padi F₁ Code transgenik memiliki jumlah malai maupun gabah isi lebih rendah dibandingkan dengan genotipe kontrol Code (Tabel 3). Pada genotipe F₁

Konawe transgenik, dari dua tanaman yang diamati, terdapat satu tanaman yang jumlah malai dan produksi gabah kering maupun totalnya lebih banyak dibandingkan dengan kontrol Konawe. Genotipe F₁ Batutegi transgenik memperlihatkan jumlah malai dan produksi gabah yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol Batutegi. Hal ini mungkin disebabkan oleh adanya akumulasi alel-alel positif untuk komponen hasil dari Nipponbare dan tetua penerima.

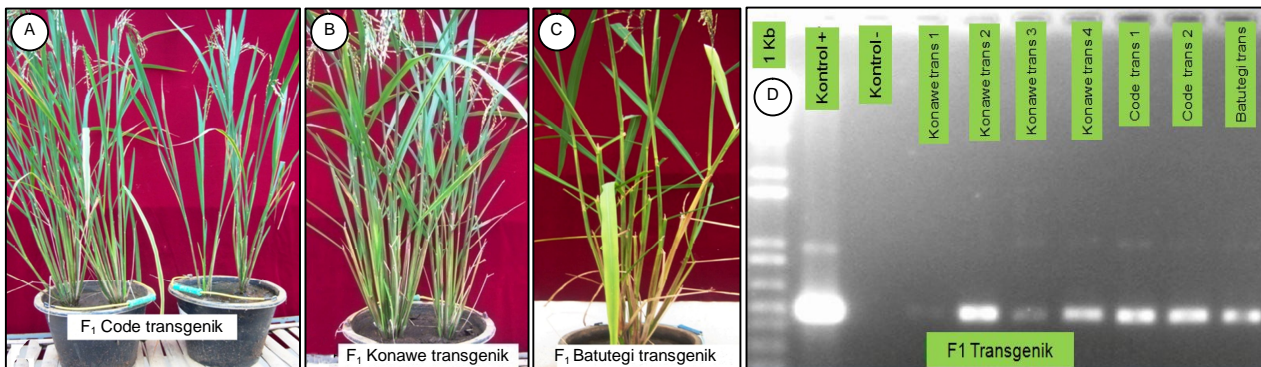
Karakterisasi BC₁F₁ Padi Transgenik

Tanaman padi F₁ transgenik yang terpilih berdasarkan jumlah malai yang mendekati atau melebihi jumlah malai tanaman kontrol (F₁ Code trans1, F₁ Konawe trans1, dan F₁ Batutegi trans) kemudian disilangkan dengan tanaman padi nontransgenik (Code, Konawe, dan Batutegi). Banyaknya biji hasil silang balik (*backcross*) tersebut disajikan pada Tabel 4.

Tabel 2. Skor evaluasi kekeringan padi F₁ transgenik di rumah kaca FUT berdasarkan *Standard Evaluation System for Rice* (IRRI, 1996; Silitonga *et al.*, 2003).

Genotipe	Jumlah tanaman	Fase vegetatif		Kesembuhan (skor)	Kematian (%)
		Daun menggulung	Daun mengering		
F₁ (Batutegi x B11)	20**	0-7	0-9	9	95
F ₁ (Ciherang x B10)	5	3-7	9	9	100
F ₁ (Ciherang x B14)	10*	5-7	9	9	100
F₁ (Code x B14)	10*	0-3	0-9	5	60
F ₁ (Code x C10)	5	3-5	9	9	100
F ₁ (Code x C14)	5	3-7	9	9	100
F ₁ (Konawe x B11)	5	3-7	9	9	100
F ₁ (Konawe x B14)	5	5-9	9	9	100
F₁ (Konawe x C10)	5	0-7	0-9	5	60
Ciherang	5	9	9	9	100
Code	5	0	9	9	100
Batutegi	5	0	9	9	100
Konawe	5	3-7	9	9	100
Kalimutu	5	0	9	9	100
Singkarak	5	5-7	9	9	100

* = 2 pot, ** = 4 pot. Skor kesembuhan: 5 = 40-69% tanaman sembuh, 9 = 0-19% tanaman sembuh.



Gambar 1. Penampilan tanaman padi F₁ transgenik setelah pengujian cekaman kekeringan. A = F₁ Code transgenik, B = F₁ Konawe transgenik, C = F₁ Batutegi transgenik yang mengalami pemulihan kembali, dan D = hasil analisis PCR tujuh sampel DNA tanaman padi F₁ transgenik menggunakan primer *hptII*.

Biji padi yang dihasilkan dari silang balik sedikit, yaitu berkisar 8-13 biji (Tabel 4). Hal ini disebabkan oleh suhu ruang di rumah kaca FUT yang sangat panas, yaitu lebih 45°C. Suhu tinggi tersebut yang menyebabkan tepung sari cepat kering dan sekam padi juga mudah kering sehingga berpengaruh terhadap kualitas tepung sari dan banyaknya biji yang dihasilkan dari silang balik tersebut. Biji padi yang terbentuk tidak sama ukurannya dan ada yang berwarna cokelat, sehingga pada waktu dikecambahkan ada biji padi yang tidak dapat tumbuh menjadi bibit tanaman padi (Gambar 2).

Tiga puluh tiga biji padi hasil silang balik yang berasal dari tiga genotipe padi BC₁F₁ transgenik, dikecambahkan dan ditanam. Penanaman dilakukan pada media tumbuh tanah yang dicampur dengan pupuk organik pada kondisi pertumbuhan normal tanpa perlakuan cekaman kekeringan. Keragaan perkecambah-

an dan pembibitan tanaman transgenik dapat dilihat pada Tabel 5.

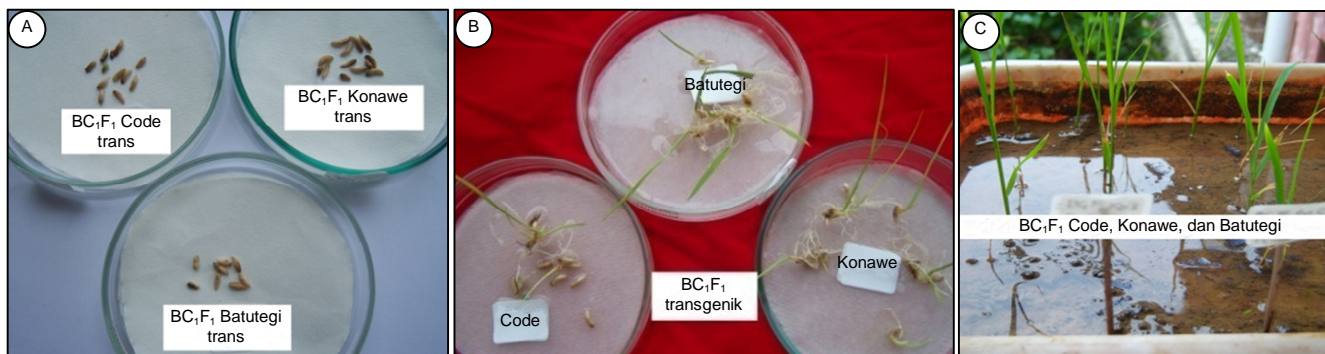
Berdasarkan data pada Tabel 5, terdapat enam tanaman padi BC₁F₁ transgenik (18,18% dari 33 biji padi) yang dapat tumbuh setelah sekitar lima minggu dalam pembibitan. Enam biji yang tidak dapat berkecambah, disebabkan biji berwarna coklat tua sampai hitam, ukurannya lebih kecil daripada yang dapat berkecambah. Pada fase pembibitan, terdapat 21 bibit tanaman padi yang mati, sehingga hanya enam tanaman padi BC₁F₁ transgenik yang dapat digunakan untuk penelitian selanjutnya. Banyaknya bibit yang mati itu mungkin disebabkan oleh suhu yang tinggi, yaitu lebih dari 45°C. Suhu yang tinggi dapat menyebabkan proses fisiologis dalam pembentukan biji tidak berjalan dengan sempurna. Hasil analisis molekuler terhadap enam tanaman padi BC₁F₁ transgenik menggunakan PCR dengan primer *hptII* menunjukkan bahwa lima

Tabel 3. Jumlah malai, panjang malai, gabah isi, gabah hampa, dan total gabah per individu tanaman padi F₁ transgenik di rumah kaca FUT.

Genotipe	Jumlah malai (cm)	Panjang malai (cm)	Jumlah gabah		
			Isi	Hampa	Total
F ₁ Code trans1	10	21,5-29,5	453	846	1.299
F ₁ Code trans2	6	26,5-31	225	486	711
F ₁ Code trans3	2	21-22,5	66	90	156
F ₁ Code trans4	6	21,5-25	161	280	441
Code	12	19-26	658	499	1.157
F ₁ Konawe trans1	11	21-28	819	721	1.540
F ₁ Konawe trans2	6	19-22,5	230	177	407
Konawe	9	18-24,5	417	413	830
F ₁ Batutegi trans	8	21-30	795	2.345	3.140
Batutegi	4	25-27	121	1.039	1.160

Tabel 4. Kombinasi persilangan, ulangan, dan jumlah biji padi BC₁F₁ transgenik di rumah kaca FUT.

Kombinasi persilangan	Ulangan	Jumlah biji
Batutegi transgenik	4	8
Code transgenik	4	12
Konawe transgenik	4	13



Gambar 2. Keragaan beberapa galur padi BC₁F₁ transgenik. A = biji padi BC₁F₁ transgenik, B = perkecambahan biji padi BC₁F₁ transgenik, C = Bibit padi BC₁F₁ transgenik.

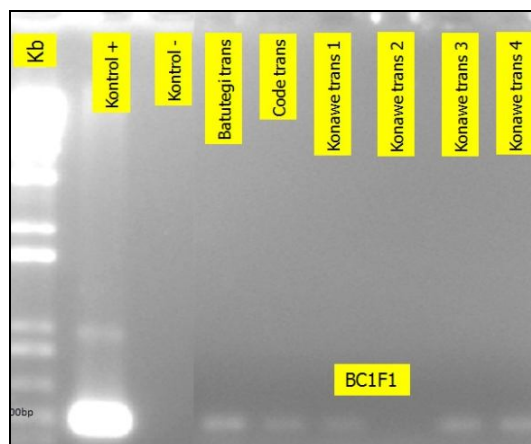
genotipe padi mengandung gen *hptII* berukuran 500 bp, sedangkan genotipe BC₁F₁ Konawe trans2 tidak mengandung gen tersebut. Lima genotipe padi BC₁F₁ yang mengandung gen *hptII*, yaitu satu genotipe BC₁F₁ Batutegi transgenik, satu genotipe BC₁F₁ Code transgenik, dan tiga genotipe Konawe BC₁F₁ transgenik (Gambar 3). Tanaman transgenik yang mengandung gen *hptII* tersebut diduga juga mengandung gen *OsDREB1A*.

Ketiga genotipe padi Konawe BC₁F₁ transgenik lebih unggul daripada genotipe padi Konawe kontrol, baik berdasarkan tinggi tanaman, jumlah malai jumlah gabah isi maupun jumlah total gabah (Tabel 6). Rerata jumlah gabah isi per malai lebih kurang 31 butir untuk genotipe Konawe kontrol, sedangkan untuk semua genotipe padi BC₁F₁ Konawe transgenik lebih tinggi dibandingkan dengan kontrolnya. BC₁F₁. Konawe trans3

mempunyai rerata jumlah gabah isi paling banyak (50 gabah isi per malai). Rerata jumlah gabah total per malai untuk genotipe Konawe kontrol kurang lebih 105 gabah per malai, sedangkan untuk genotipe BC₁F₁ Konawe trans1 (105 gabah per malai), BC₁F₁ Konawe trans3 (94 gabah per malai), dan BC₁F₁ Konawe trans4 (107 gabah per malai). Genotipe padi BC₁F₁ Batutegi transgenik untuk tinggi tanaman lebih rendah, sedangkan jumlah malai, produksi gabah isi, dan total gabah lebih tinggi dibandingkan dengan genotipe Batutegi kontrol. Rerata jumlah gabah isi per malai genotipe Batutegi transgenik lebih sedikit dan jumlah gabah total lebih banyak dibandingkan dengan kontrol. Untuk genotipe padi BC₁F₁ Code transgenik, baik rerata jumlah gabah isi maupun jumlah gabah total lebih banyak dibandingkan dengan Code kontrolnya.

Tabel 5. Jumlah biji, perkecambahan, dan pembibitan genotipe padi BC₁F₁ transgenik.

Genotipe	Jumlah biji	Perkecambahan		Pembibitan	
		Mati	Berkecambah	Mati	Hidup
Batutegi transgenik	8	0	8	7	1
Code transgenik	12	4	8	7	1
Konawe transgenik	13	2	11	7	4



Gambar 3. Hasil analisis PCR enam sampel DNA tanaman padi BC₁F₁ transgenik menggunakan primer *hptII*.

Tabel 6. Tinggi tanaman, jumlah malai, panjang malai, dan jumlah gabah per individu tanaman padi BC₁F₁ transgenik di rumah kaca.

Genotipe	Tinggi tanaman (cm)	Jumlah malai	Rerata panjang malai (cm)	Jumlah gabah		
				Isi	Hampa	Total
Konawe	71	8	22,06	244	593	837
BC ₁ F ₁ Konawe trans1	77	16	21,16	635	1.033	1.686
BC ₁ F ₁ Konawe trans3	83	13	20,9	654	568	1.222
BC ₁ F ₁ Konawe trans4	81	11	20,55	477	694	1.171
Batutegi	133	4	23,13	428	409	837
BC ₁ F ₁ Batutegi trans	128	7	23,36	569	967	1.536
Code	82	7	21,71	179	595	774
BC ₁ F ₁ Code trans	77	13	22,21	623	1.028	1.709

Jumlah Stomata

Stomata pada tanaman berfungsi sebagai alat untuk pertukaran CO₂ dari udara pada proses fotosintesis yang berhubungan dengan produksi, dan sebagai jalan pernapasan (respirasi). Pada umumnya stomata lebih banyak terdapat pada permukaan daun bagian bawah daripada permukaan daun bagian atas (Haryanti, 2010), sehingga dapat mengurangi transpirasi karena permukaan daun bagian bawah lebih sedikit menerima cahaya matahari dibandingkan dengan permukaan atas daun. Tanaman padi Batutegei kontrol mempunyai stomata pada permukaan daun bawah maupun atas lebih sedikit dibandingkan dengan tanaman padi BC₁F₁ Batutegei transgenik, dan berdasarkan analisis statistik tidak berbeda nyata untuk jumlah stomata daun bagian bawah (Tabel 7). Tanaman padi Code kontrol mempunyai stomata daun lebih banyak dibandingkan dengan tanaman padi BC₁F₁ Code transgenik, baik jumlah stomata pada permukaan bawah maupun atas daun, namun tidak berbeda nyata berdasarkan analisis statistik (Tabel 7).

Tiga tanaman padi Konawe transgenik mempunyai jumlah stomata daun pada bagian bawah permukaan daun lebih sedikit, sedangkan pada permukaan daun bagian atas lebih banyak dibandingkan dengan tanaman padi Konawe kontrol. Tanaman padi Konawe transgenik trans3 mempunyai jumlah stomata daun paling sedikit pada permukaan daun bagian bawah dan paling banyak pada permukaan daun bagian atas dibandingkan dengan dua tanaman padi Konawe transgenik lainnya. Secara umum, pada tanaman padi Konawe transgenik terdapat perbedaan yang nyata dengan Konawe kontrol (Tabel 7).

Tanaman padi genotipe BC₁F₁ Batutegei transgenik dan BC₁F₁ Code transgenik secara umum tidak berbeda jumlah stomata daunnya dibandingkan dengan tanaman padi Batutegei kontrol dan Code kontrol. Pada tanaman padi genotipe BC₁F₁ Konawe transgenik

Tabel 7. Jumlah stomata daun tanaman padi BC₁F₁ transgenik dan padi kontrol.

Genotipe	Jumlah stomata daun (mm ²)	
	Bagian bawah	Bagian atas
Batutegei	292,1274 a	244,586 a
BC ₁ F ₁ Batutegei trans	300,6369 a	326,1146 b
Code	444,9936 a	327,7962 a
BC ₁ F ₁ Code trans	434,8028 a	288,7643 a
Konawe	373,673 a	244,586 c
BC ₁ F ₁ Konawe trans1	290,4459 b	302,3355 b
BC ₁ F ₁ Konawe trans3	266,6667 b	402,5478 a
BC ₁ F ₁ Konawe trans4	363,482 a	312,5265 b

Angka dalam satu lajur yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 0,05% menurut Uji Duncan.

jumlah stomata daun bagian bawah dan atas lebih banyak daripada Konawe kontrol.

KESIMPULAN

Lima genotipe padi transgenik BC₁F₁ terbukti mengandung gen *hptII*, yaitu BC₁F₁ Batutegei trans, BC₁F₁ Code trans, BC₁F₁ Konawe trans1, BC₁F₁ Konawe trans3, dan BC₁F₁ Konawe trans4. Kelima genotipe padi transgenik tersebut memproduksi gabah isi maupun jumlah gabah total lebih tinggi dibandingkan dengan padi kontrol. Pada genotipe padi BC₁F₁ Konawe trans1 dan BC₁F₁ Konawe trans3, jumlah stomata daun pada permukaan daun bagian bawah lebih sedikit dan pada permukaan daun bagian atas lebih banyak dibandingkan dengan genotipe padi kontrol. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk membuktikan bahwa tanaman transgenik itu mengandung gen *OsDREB1A*.

DAFTAR PUSTAKA

- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1(4):19-21.
- Dubouzet, J.G., Y.Z.Y. Sakuma, Y.Y. Ito, M. Kasuga, E.G. Dubouzet, Z.S. Miura, M. Seki, K. Shinozaki, and K.Y. Shinozaki. 2003. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought, high-salt and cold-responsive gene expression. *Plant* 33:751-763.
- Haryanti, S. 2010. Jumlah dan distribusi stomata pada daun beberapa spesies tanaman dikotil dan monokotil. *Bul. Anatomi dan Fisiologi* 18(2):21-28.
- Hsieh, T.T., J.T. Lee, Y.Y. Charng, and M.T. Chan. 2002. Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis CBF1* show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiol.* 130:618-626.
- International Rice Research Institute. 1996. Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute. Los Banos, Philippines. 54 p.
- Ito, Y., K. Katsura, K. Maruyama, T. Taji, M. Kobayashi, M. Seki, K. Shinozaki, and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2006. Functional analysis of rice *DREB1/CBF*-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol.* 47(1):141-163.
- Jennings, P.R., W.R. Coffman, and H.E. Kauffman. 1979. Rice Improvement. International Rice Research Institute. 185 p.
- JIRCAS. 2005. Dehydration responsive element binding protein (*DREB*)1-type transcription factors in transgenic rice improve tolerance drought, salt, and freezing. Annual Report Topic 2. p. 40-41.
- Jongdee, B., G. Pantuwan, S. Fukai, and K. Fischer. 2006. Improving drought tolerance in rainfed lowland rice: An

- example from Thailand. *Agr. Water Manage.* (80):225-240.
- Oh, S.J., S.I. Song, Y.S. Kim, H.Y. Jang, S.Y. Kim, M. Kim, Y.K. Kim, B.H. Nahm, and J.K. Kim. 2005. *Arabidopsis CBF3/DREB1A* and *ABF3* in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiol.* 138(1):341-351.
- Pellegrineschi, A., M. Reynolds, M. Pacheco, R.M. Brito, R. Almeraya, K. Yamaguchi-Shinozaki, and D. Hoisington. 2004. Stress-induced expression in wheat of the *Arabidopsis thaliana DREB1A* gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. *Genome* 47:493-500.
- Ping, L., C. Feng, Q. Chao, and Z. Guiyou. 2005. *OsDREB1* gene from rice enhances cold tolerance in Tobacco. *Tsinghua Sci. Technol.* 10(4):473-483.
- Sammaullah, M.J. dan A.A. Darajat. 2001. Toleransi beberapa genotipe padi gogo terhadap cekaman kekeringan. *J. Penelitian Pertanian Tanaman Pangan* 20(1):17-23.
- Santosa, B., Sobir, S. Sujiprihati, dan K.R. Trijatmiko. 2011. Penyisipan gen *OsDREB1A* pada tanaman padi untuk regenerasi sifat toleran kekeringan. *J. Penelitian Pertanian Tanaman Pangan* 30(2):95-100.
- Santosa, B. 2012. Over-ekspresi gen *OsDREB1A* guna perbaikan toleransi cekaman kekeringan pada padi. Disertasi S3, Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana IPB. 86 hlm.
- Silitonga, T.S., I.H. Somantri, A.A. Daradjat, dan H. Kurniawan. 2003. Panduan Sistem Karakterisasi dan Evaluasi Tanaman Padi. Departemen Pertanian. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Komisi Nasional Plasma Nutfah. 58 hlm.
- Suardi, D., T.S. Silitonga, B. Abdullah, dan T. Suhartini. 2004. Evaluasi spesies padi liar toleran kekeringan. *J. Penelitian Pertanian Tanaman Pangan* 23(1):23-27.
-