

TOLERANSI TEMBAKAU TRANSGENIK YANG MENGEKSPRESIKAN GEN P5CS TERHADAP STRES KEKERINGAN

Ahmad Riduan^{1*}, Hajrial Aswidinnoor², Sudarsono², Djoko Santoso³, Endrizal⁴

¹⁾ Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Jambi, Jl. Mendalo Raya Km 15, Kampus Universitas Jambi Mendalo, Jambi 36361. ²⁾ Departemen Agronomi dan Hortikultura (AGRO-HORT), Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680. ³⁾ Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Perkebunan. Taman Kencana Bogor. ⁴⁾ Balai Pengkajian Teknologi Pertanian (BPTP) Jambi, Jln. Samarinda Paal Lima, Kotak Pos 118, Kota Baru 3600 Jambi. *Penulis untuk korespondensi, e-mail: riduan_sy@yahoo.com Telp. (0741) 64331 ; 081366450667

Diterima : 3 Maret 2010 ; Disetujui untuk publikasi : 15 Juni 2010

ABSTRACT

Tolerance of Transgenic Tobacco Expressing P5CS Gene Against Drought Stress. Drought is major osmotic stress that dramatically limit plant growth and productivity. Proline accumulation has been correlated with tolerance to drought stress in plants. Therefore, overproduction of proline in plants may lead to increased tolerance against these abiotic stresses. The objectives of this experiment were to determine the effects of drought stress at the period of 15 – 90 days after planting (DAP) on growth of T1 plants derived from transgenic GS tobacco, to evaluate their tolerance against drought stress, and to determine their leaf proline content. One group of the tobacco plants were grown in plastic pots and subjected to stress condition during the period of 15 – 90 DAP. The other group was grown optimally in plastic pot up to harvest period. All tobacco plants were harvested at 91 DAP. Leaf proline content was determined at 63 DAP (after six periods of stress). The results indicated reduced plant height, shoot diameter, leaf number, leaf dry weight and leaf area of all tobacco plants. Stress sensitivity index calculated using leaf dry weight character grouped T1 plants derived from P5CS transgenic GS tobacco into tolerance, medium tolerance and sensitive against drought stress while that of non-transgenic GS tobacco were only medium tolerance and sensitive against drought stress. Higher leaf proline content under drought stress was observed in all T1 plants derived from P5CS transgenic tobacco than that of non-transgenic GS tobacco. These data demonstrated that proline accumulation as an osmoprotectant and that over-expression P5CS gene results in the increased tolerance to osmotic stress in T1 plants derived from P5CS transgenic tobacco.

Key words: *Proline biosynthesis, proline accumulation, sensitivity index, biomass yield*

ABSTRAK

Stres kekeringan merupakan masalah utama stres osmotik yang dapat menjadi faktor pembatas pertumbuhan dan produktivitas tanaman. Akumulasi prolina berkorelasi dengan tingkat toleransi tanaman terhadap stres kekeringan. Oleh karena itu over-produksi prolina diduga dapat meningkatkan toleransi tanaman terhadap stres kekeringan. Tujuan penelitian ini adalah (1) untuk mengevaluasi pengaruh stres kekeringan melalui pengurangan air terhadap pertumbuhan dan hasil tanaman TI zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi TO, (2) menganalisis akumulasi prolina daun tanaman TI zurlat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi TO kondisi stres dan non-stres, serta (3) menganalisis hubungan antara akumulasi prolina daun pada kondisi stres kekeringan dengan pertumbuhan dan hasil tanaman. Percobaan dua faktor (tembakau transgenik dan stres kekeringan) disusun dengan rancangan acak kelompok. Sebagian tanaman yang diuji disiram setiap

hari hingga mencapai kondisi kapasitas lapang dari awal tanam sampai dengan 90 HST dan digunakan sebagai perlakuan non-stres. Sedangkan kelompok tanaman yang lain dipelihara dalam kondisi kapasitas lapang hingga 14 HST dan diberi perlakuan stres kekeringan dari umur 15 HST hingga panen (90 HST). Kandungan prolina diukur pada umur 63 HST (setelah 6x periode stres). Hasil penelitian menunjukkan semua tanaman tembakau yang diuji mempunyai tinggi tanaman, diameter batang, jumlah, berat kering dan luas daun yang lebih rendah akibat perlakuan stres kekeringan yang diberikan dibandingkan dengan kondisi non-stres. Berdasarkan hasil perhitungan indeks sensitivitas terhadap stres kekeringan menggunakan peubah bobot daun kering per tanaman maka tanaman TI zurlat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi TO yang diuji bersegregasi untuk kategori toleran, medium toleran dan peka, sedangkan tembakau GS non-transgenik dikategorikan sebagai medium toleran dan peka terhadap stres kekeringan. Tanaman TI zurlat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi TO menunjukkan kandungan prolina yang lebih tinggi dalam kondisi stres kekeringan dibandingkan dengan tembakau GS non-transgenik. Peningkatan akumulasi prolina yang cukup tinggi akibat over-ekspresi dari gen P5CS diduga berkorelasi dengan peningkatan toleransi tanaman terhadap stres kekeringan.

Kata kunci : *Biosintesis prolina, akumulasi prolina, indeks sensitivitas terhadap stres, produksi biomasa*

PENDAHULUAN

Kekeringan atau terbatasnya ketersediaan air merupakan faktor pembatas utama produksi tanaman. Hasil panen di lahan kering relatif rendah akibat stres kekeringan yang dapat terjadi pada setiap tahap perkembangan tanaman, khususnya tahap pembungaan sampai terbentuknya biji (Mitra 2001). Pengaruh yang besar muncul karena kekeringan biasanya berinteraksi dengan stres abiotik lainnya (suhu yang ekstrim) dan dengan stres biotik (Ceccarelli & Grando 1996).

Kemampuan tanaman untuk menghindari kondisi kekeringan sangat tergantung pada kemampuan atau strategi yang dilakukan tanaman dalam merespons stres. Hasil yang relatif lebih baik dalam kondisi stres kekeringan dapat diperoleh dengan penggunaan kultivar yang toleran terhadap stres kekeringan. Tanaman-tanaman yang mampu memberikan respons dalam bentuk toleransi atau menghindar akan lolos dari kondisi tersebut dan memiliki peluang untuk menghasilkan panen.

Tanaman mampu memperlihatkan tipe strategi adaptasi yang berbeda untuk meringankan efek merusak dari stres kekeringan (Palva *et al.*, 1996). Adaptasi sebagai respons terhadap stres kekeringan tersebut dapat terjadi secara biokimia, fisiologi dan morfologi (Molnar *et al.*, 2004.). Defisit air pada jaringan tanaman akan membahayakan berbagai proses fisiologi. Untuk menghindari defisit air, tanaman toleran memiliki

kemampuan menahan air pada daun dalam selang waktu tertentu, dan ini dapat dijadikan indikator toleran terhadap stres kekeringan (Mc Caig and Romagosa 1991).

Dalam proses pertumbuhan tanaman, penyerapan air oleh akar sangat ditentukan oleh besarnya gradien hidrostatik atau gradien osmotik (Steudle and Frensch 1996). Penyerapan air dilakukan melalui jalur simplastik. Perkiraan ini didukung dengan ditemukannya protein integral membran (*aquaporin*) yang berperan sebagai *channel* spesifik air (Chrispeel and Maurel 1994; Magio and Joly 1995). Pertumbuhan akar yang ekstensif akan menguntungkan dalam pemeliharaan potensial air yang tinggi di bawah stres kekeringan. Pada kacang tanah karakter morfologi sebagai respons toleransi yang paling jelas adalah sistem perakaran yang tumbuh terus secara kontinu sampai melampaui masa reproduktif (Williams and Boote 1995).

Agar air tetap dapat mengalir ke arah jaringan tanaman atau akar maka potensial osmotik (PO) akar harus lebih negatif dari PO air tanah. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ketahanan terhadap stres kekeringan berhubungan dengan peningkatan kandungan prolina yang berperan sebagai osmotic adjustment maupun osmoprotektan (Irigoyen *et al.*, 1992).

Menurut Mc Cue and Hanson (1990), perkembangan adaptasi struktur atau fisiologi terhadap stres kekeringan selalu berdasarkan mekanisme kompleks yang dimunculkan

oleh sejumlah gen. Beberapa gen mengkode polipeptida dengan peran yang diduga sebagai pelindung sel yang sedang tercekam, antara lain sebagai pengisolasi ion, stabilisasi membran, dan sebagai molekul pendamping (Bray 1997; Palva et al., 1996). Salah satu gen yang berperan dalam mengatasi kekeringan pada tanaman yaitu gen yang mengkode pembentukan prolina (gen P5CS). Transformasi gen P5CS (*Pyrroline-5-carboxylate synthetase*) yang merupakan penyandi enzim dalam biosintesis prolina ke tanaman tembakau di bawah kendali promoter konsitutif CaMV 35S, secara nyata terbukti meningkatkan produksi prolina dan meningkatkan pula toleransi tanaman transgenik tersebut terhadap stres kekeringan (Kavi-Kishor et al., 1995).

Percobaan ini bertujuan (1) untuk mengevaluasi pengaruh stres kekeringan melalui pengurangan air terhadap pertumbuhan tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0, (2) menguji pengaruh pengurangan air terhadap pertumbuhan dan hasil tanaman, (3) menganalisis akumulasi prolina daun tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 kondisi stres dan non-stres, serta (4) menganalisis hubungan antara akumulasi prolina daun pada kondisi stres kekeringan dengan pertumbuhan dan hasil tanaman.

METODOLOGI

Bibit Tembakau Transgenik

Lima tanaman tembakau transgenik generasi T0 yang mengekspresikan gen P5CS telah diregenerasikan dari tembakau cv. GS dalam percobaan sebelumnya (Riduan et al., 2006). Benih T1 dipanen dari masing-masing tanaman tembakau transgenik T0 (tembakau transgenik T0 no. GS-1, GS-2, GS-3, GS-4, dan GS-5) ditanam dalam medium MS (Murashige and Skoog 1962) dengan penambahan kanamisin 100 mg/l. Jumlah bibit yang mampu tumbuh dari benih dan yang mati dalam medium dengan penambahan kanamisin diamati dan digunakan untuk menentukan jumlah transgen yang terintegrasi dalam genom masing-masing

tanaman transgenik T0. Hanya bibit tembakau yang tumbuh dalam medium yang mengandung kanamisin yang digunakan dalam percobaan.

Penyiapan Bibit Tembakau

Bibit tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 dan tembakau GS non-transgenik ditanam dalam pot plastik (250 ml) berisi medium campuran tanah:pasir:pupuk kandang (2:1:1) dan diaklimatisasi dalam ruangan yang terkontrol kelembaban (100%) dan peninarannya (1000 lux) selama satu minggu. Setelah periode aklimatisasi, tanaman tembakau dipindah kedalam pot plastik (30x30x30 cm³) yang berisi medium campuran tanah:pasir:pupuk kandang (2:1:1) dan dipelihara di rumah kaca sampai umur 2 minggu (14 hari). Pemeliharaan yang dilakukan meliputi penyiraman hingga kapasitas lapang setiap pagi dan sore hari.

Pengaruh Stres Kekeringan Terhadap Pertumbuhan Dan Hasil

Setelah berumur 15 HST, bibit tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 yang resisten terhadap kanamisin sebagian dipelihara dengan penyiraman setiap hari sehingga mencapai kondisi kapasitas lapang hingga 90 hari sesudah tanam (HST) dan digunakan sebagai perlakuan non-stres. Sedangkan kelompok tanaman yang lain, diberi perlakuan stres kekeringan dari umur 15 HST hingga panen (90 HST) dengan membiarkan tanaman tidak disiram sampai menunjukkan gejala layu pada 70% dari seluruh jumlah daun per tanaman, kemudian disiram kembali sebanyak 50% kapasitas lapang dan setelah itu diberi perlakuan stres kekeringan kembali dan seterusnya

Unit percobaan atas terdiri 5 bibit tembakau T1 dan untuk setiap perlakuan diulang 3 kali. Percobaan dua faktor (tembakau transgenik dan stres kekeringan) disusun dengan rancangan acak kelompok dengan persamaan matematis sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu$$

Data dianalisis menggunakan uji jarak berganda Duncan pada $\alpha = 0.05$. Pengamatan dilakukan terhadap tinggi tanaman, jumlah dan

luas daun, diameter batang, rata-rata panjang buku serta bobot daun kering,

Indeks Sensitivitas Terhadap Stres

Indeks sensitivitas terhadap stres (S) dihitung dengan rumus yang dikembangkan oleh Fischer and Maurer (1978), yaitu: $S = (1 - [Y/Y_p]) / (1 - [X/X_p])$; Y dan Y_p : masing-masing adalah nilai rata-rata pengamatan untuk satu genotipe tertentu pada kondisi stres kekeringan dan dalam kondisi non-stres, sedangkan X dan X_p adalah nilai rata-rata pengamatan untuk semua genotipe dalam kondisi stres kekeringan dan dalam kondisi non-stres. Indeks S dihitung dengan menggunakan semua peubah pengamatan yang dikumpulkan. Berdasarkan indeks S yang didapat, tanaman tembakau transgenik yang diuji dikategorikan sebagai toleran jika $S \leq 0.5$, medium toleran jika $0.5 < S \leq 1$, dan peka jika $S > 1$.

Analisis Kandungan Prolina

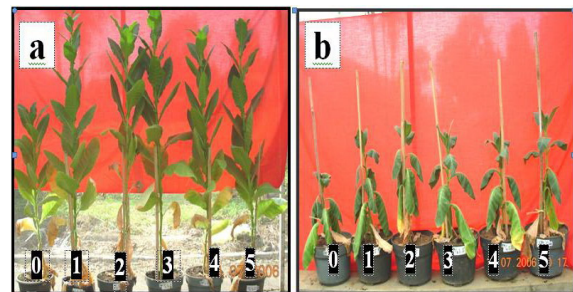
Bibit tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 yang ditanam dalam pot plastik dengan perlakuan stres dan non-stres dipanen contoh daunnya pada umur 63 HST dan dianalisis kandungan prolina. Analisis kandungan prolina daun dilakukan dengan menggunakan metode yang dikembangkan oleh Bates *et al.*, (1973). Kandungan prolina contoh daun tanaman tembakau GS non-transgenik yang ditanam dengan perlakuan stres dan non-stres digunakan sebagai kontrol.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Stres Kekeringan terhadap Pertumbuhan dan Hasil

Perlakuan stres kekeringan pada umumnya dapat menurunkan pertumbuhan tanaman tembakau, baik tanaman non-transgenik maupun transgenik P5CS (Gambar 1). Perlakuan stres kekeringan nyata menurunkan tinggi tanaman, panjang buku, diameter batang, bobot daun kering, jumlah dan luas daun pada semua tanaman tembakau yang diuji (Tabel 1; Tabel 2).

Penurunan pertumbuhan tanaman tembakau GS non-transgenik akibat stres kekeringan cenderung lebih besar dibandingkan tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0, kecuali untuk peubah panjang buku. Stres kekeringan menghambat tinggi tanaman tembakau non-transgenik sebesar 69,5%, panjang buku 28,01%, diameter batang 20,73%, bobot daun kering 42,52%, luas daun 45,73% dan jumlah daun 54,34%. Sedangkan pada tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0, stres kekeringan menghambat pertumbuhan dengan kisaran yang beragam yaitu untuk tinggi tanaman terhambat sebesar 64,58 - 68,31%, panjang buku 33,32 - 43,64%, diameter batang 15,57 - 27,18%, bobot daun kering 27,18 - 46,90%, luas daun 27,98 - 32,75% dan jumlah daun 37,53 - 47,12% (Tabel 1; Tabel 2).



Gambar 1. Tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 dan tembakau GS non-transgenik pada kondisi non-stres (a) dan stres (b) kekeringan (umur tanam 78 HST) No. 0 = non-transgenik GS, 1 = transgenik GS-1, 2 = GS-2, 3 = GS-3, 4 = GS-4 dan 5 = GS-5.

Tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 dan tembakau GS non-transgenik, pada kondisi stres kekeringan, secara umum masih menunjukkan pertumbuhan yang lebih baik dibandingkan dengan tembakau GS non-transgenik (Gambar 1.b). Pada peubah tinggi tanaman, diameter batang dan jumlah daun, tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 menunjukkan pertumbuhan yang nyata lebih tinggi dibandingkan dengan

tembakau GS non-transgenik. Tetapi untuk peubah BK daun, hanya tanaman T1 zuriat dari tembakau transgenik P5CS generasi T0 nomor GS-5 yang menunjukkan BK daun yang sama dengan tanaman tembakau non-transgenik. Untuk peubah luas daun, tanaman T1 zuriat dari tembakau transgenik P5CS generasi T0 nomor GS-3 dan GS-4 menunjukkan luas daun yang paling besar, sedangkan tanaman tanaman T1 zuriat dari tembakau transgenik P5CS generasi T0 nomor GS-1, GS-2 dan GS-5 menunjukkan luas daun yang sama dengan tembakau GS non-transgenik. Untuk peubah pertumbuhan panjang buku, semua tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 tidak menunjukkan panjang buku yang berbeda nyata dengan tanaman tembakau GS non-transgenik. (Tabel 1; Tabel 2). Pada pengamatan terhadap peubah umur berbunga, stres kekeringan hanya dapat menghambat waktu berbunga pada tanaman tembakau GS non-transgenik, sedangkan pada tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 tidak menunjukkan keterlambatan waktu pembungaan yang nyata akibat stres kekeringan. Tanaman tembakau GS non-transgenik akibat stres kekeringan menunjukkan keterlambatan pembungaan selama ± 22 hari, sedangkan tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 hanya mengalami keterlambatan pembungaan berkisar 1 sampai 11 hari (Tabel 3).

Pengujian ekspresi gen P5CS sebagai penyandi enzim kunci biosintesis prolina serta fungsinya dalam mengatasi stres kekeringan perlu dilakukan dengan memberikan perlakuan stres kekeringan pada tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 dan tembakau GS non-transgenik. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa stres kekeringan pada periode umur 15 sampai 90 HST dapat menghambat pertumbuhan semua tanaman yang diuji. Perlakuan stres kekeringan yang diberikan dapat dikategorikan sebagai stres yang cukup berat, karena tanaman dibiarkan tidak disiram sampai menunjukkan gejala layu hampir 70% dari setiap populasi tanaman, dan dilakukan sebanyak 9 (sembilan) kali periode stres. Titik kritis pengaruh stres kekeringan adalah kelayuan, yaitu suatu gejala defisit air yang terjadi jika besarnya transpirasi melampaui laju penyerapan air yang dilakukan akar, sehingga

dapat mengganggu berbagai proses fisiologis tanaman. Menurut Bray (1997), tanaman akan mengalami kelayuan sebagai respons terhadap defisit air dan seberapa besar pengaruhnya terhadap pertumbuhan tanaman sangat tergantung pada jumlah air yang hilang, laju kehilangan dan lamanya kondisi stres.

Tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 dalam kondisi stres kekeringan masih menunjukkan pertumbuhan yang lebih tinggi dibandingkan tembakau GS non-transgenik, terutama pada peubah tinggi tanaman, diameter batang, jumlah, luas dan BK daun. Hal ini diduga tanaman tembakau transgenik P5CS lebih mampu dan siap menghadapi kondisi lingkungan yang kurang optimal, melalui peningkatan kandungan prolina yang berperan sebagai *osmotic adjustment* maupun osmoprotektan. Tanaman dalam kondisi kekeringan akan dapat tumbuh lebih baik, jika molekul air tanah tetap dapat mengalir ke arah jaringan akar melalui penurunan potensial osmotik (PO) akar yang lebih negatif dari PO air tanah (Moinuddin and Khanna-Chopra, 2004). Dari hasil pengamatan terlihat jelas bahwa tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 memiliki kandungan prolina yang jauh lebih tinggi (2618 – 4449 ug/g daun segar) dibandingkan tembakau GS non-transgenik (2044 ug/g daun segar). Peningkatan kandungan prolina yang cukup tinggi diduga disebabkan oleh over-ekspresi gen P5CS sebagai penyandi enzim kunci dalam biosintesis prolina.

Stres kekeringan secara nyata menghambat tanaman tembakau non-transgenik untuk berbunga, sedangkan pada tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 tidak terjadi penghambatan pembungaan secara nyata. Menurut Pelah *et al.*, (1997), salah satu respon tanaman terhadap stres kekeringan dapat teramati pada level perkembangan antara lain perubahan waktu pembungaan dan pembentukan polong. Ditambah juga oleh Pelah *et al.*, (1997), perubahan waktu berbunga dan pembentukan polong akibat stres kekeringan, disebabkan antara lain terjadinya perubahan kadar protein dan meningkatnya aktivitas RNase. Stres kekeringan menyebabkan penurunan ketersediaan nitrogen dan mengakibatkan protein-protein daun

Tabel 1. Pengaruh Stres Kekeringan pada Periode 15 – 90 Hari Sesudah Tanam (HST) terhadap Tinggi Tanaman, Panjang Buku dan Diameter Batang Tanaman T1 Zuriat dari Tembakau GS Transgenik P5CS Generasi T0 dan Tembakau GS Non-Transgenik.

Peubah dan Geno-tipe Tembakau	Lingkungan				Persentase Penurunan
	Non-stres		Stres		
	Tinggi tanaman (cm)				
Non-transgenik GS	95.231	aC	28.971	bB	69.578
Transgenik GS-1	124.417	aB	42.267	bA	66.028
Transgenik GS-2	126.909	aAB	43.846	bA	65.451
Transgenik GS-3	136.733	aA	46.467	bA	66.016
Transgenik GS-4	130.083	aAB	46.067	bA	64.586
Transgenik GS-5	127.909	aAB	40.533	bA	68.311
Panjang buku (cm)					
Non-transgenik GS	4.437	aD	3.194	bA	28.014
Transgenik GS-1	5.141	aC	3.428	bA	33.320
Transgenik GS-2	5.539	aB	3.467	bA	37.407
Transgenik GS-3	6.007	aA	3.385	bA	43.649
Transgenik GS-4	5.618	aB	3.535	bA	37.077
Transgenik GS-5	5.861	aAB	3.330	bA	43.184
Diameter batang (mm)					
Non-transgenik GS	9.319	aC	7.387	bB	20.732
Transgenik GS-1	13.283	aA	10.198	bA	23.225
Transgenik GS-2	12.200	aAB	10.300	bA	15.574
Transgenik GS-3	12.017	aB	9.614	bA	19.997
Transgenik GS-4	12.935	aAB	9.419	bA	27.182
Transgenik GS-5	13.049	aAB	9.485	bA	27.312

Keterangan: Data rata-rata pada baris dengan huruf kecil atau kolom dengan huruf kapital yang sama, tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada $\alpha = 0.05$.

Tabel 2. Pengaruh Stres Kekeringan Pada Periode 15 – 90 Hari Sesudah Tanaman (HST) terhadap Berat Kering Daun, Luas Daun dan Jumlah Daun Tanaman T1 Zuriat dari Tembakau GS Transgenik P5CS Generasi T0 Dan Tembakau Gs Non-transgenik

Peubah dan Geno-tipe Tembakau	Lingkungan				Persentase Penurunan
	Non-stres		Stres		
Berat daun kering (gr)					
Non-transgenik GS	9.055	aB	5.205	bC	42.520
Transgenik GS-1	11.792	aA	7.729	bAB	34.452
Transgenik GS-2	12.518	aA	9.115	bA	27.183
Transgenik GS-3	13.113	aA	7.787	bAB	40.620
Transgenik GS-4	12.925	aA	7.660	bAB	40.735
Transgenik GS-5	12.418	aA	6.593	bBC	46.906
Luas daun (cm ²)					
Non-transgenik GS	4643.787	aB	2519.813	bC	45.738
Transgenik GS-1	3919.163	aB	2635.394	bBC	32.756
Transgenik GS-2	4585.869	aB	3302.666	bABC	27.982
Transgenik GS-3	5192.88	aA	3514.133	bAB	32.328
Transgenik GS-4	5546.145	aA	3795.170	bA	31.571
Transgenik GS-5	4493.555	aB	3072.734	bABC	31.619
Jumlah daun (lembar)					
Non-transgenik GS	22.154	aC	10.114	bB	54.347
Transgenik GS-1	25.250	aA	13.350	bA	47.129
Transgenik GS-2	23.909	aAB	13.692	bA	42.733
Transgenik GS-3	23.800	aABC	14.867	bA	37.534
Transgenik GS-4	24.250	aAB	14.133	bA	41.720
Transgenik GS-5	22.909	aBC	13.333	bA	41.800

Keterangan: Data rata-rata pada baris dengan huruf kecil atau kolom dengan huruf kapital yang sama, tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada $\alpha = 0.05$

Tabel 3. Pengaruh Stres Kekeringan Periode 15 – 90 Hari Sesudah Tanam (HST) terhadap Umur Berbunga Tanaman T1 Zuriat dari Tembakau GS Transgenik P5CS Generasi T0 dan Tembakau GS Non-Transgenik

Genotipe Tembakau	Lingkungan				Jumlah hari keterlambatan
	Non-stres		Stres		
Non-transgenik GS	80	bA	102,6	aA	22,6
Transgenik GS-1	84,8	aA	96,3	aB	11,5
Transgenik GS-2	93,5	aA	94,4	aB	0,9
Transgenik GS-3	90	aA	96,3	aB	6,3
Transgenik GS-4	94,25	aA	96,8	aB	2,6
Transgenik GS-5	82,75	aA	93,3	aB	10,6

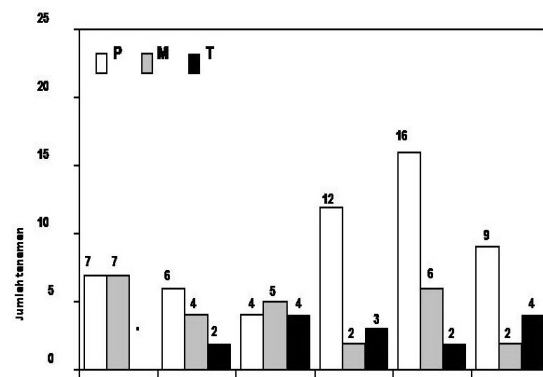
Keterangan: Data rata-rata pada baris dengan huruf kecil atau kolom dengan huruf kapital yang sama, tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada $\alpha=0.05$

terdegradasi untuk menyediakan nitrogen bagi organ-organ yang baru tumbuh.

Indeks Sensitivitas terhadap Stres Kekeringan

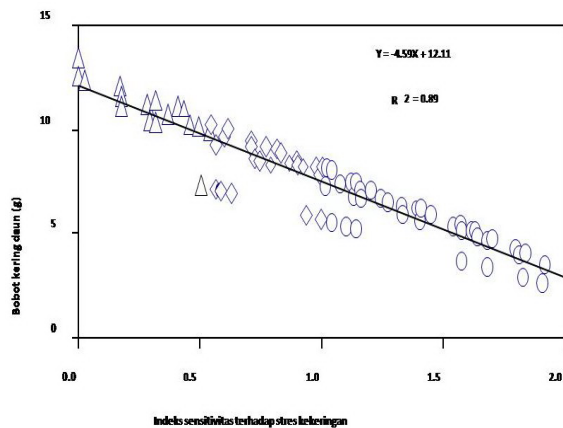
Berdasarkan indeks sensitivitas terhadap stres kekeringan (S) yang dihitung menggunakan berat daun kering pada semua tanaman yang diuji menunjukkan bahwa tanaman tembakau GS non-transgenik hanya dikategorikan peka dan medium toleran, sedangkan tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 bersegregasi untuk kategori peka dan medium toleran dan peka terhadap stres kekeringan. Jumlah tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 yang dikategorikan toleran yaitu transgenik GS-1 berjumlah 2 tanaman, GS-2 4 tanaman, GS-3 3 tanaman, GS-4 2 tanaman dan GS-5 4 tanaman (Gambar 2).

Adanya korelasi yang nyata antara nilai indeks sensitivitas dengan bobot daun kering tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 dan tembakau GS non-transgenik (nilai $R^2=0,89$), menunjukkan bahwa semakin rendah nilai indeks sensitivitas terhadap stres kekeringan, maka bobot daun keringnya akan semakin tinggi. Kelompok tanaman dengan indeks $S \leq 0,5$ yang dikategorikan toleran terhadap stres kekeringan memiliki bobot daun kering rata-rata diatas 5 g/tanaman (Gambar 3).



Gambar 2. Distribusi frekuensi respons tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 dan tembakau GS non-transgenik terhadap stres kekeringan berdasarkan bobot daun kering; P: peka, M: medium toleran, dan T: toleran terhadap stres kekeringan dengan pengurangan air.

Hasil perhitungan indeks sensitivitas terhadap kekeringan, menunjukkan tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 bersegregasi untuk kategori toleran, medium toleran dan peka, sedangkan tembakau GS non-transgenik hanya dikategorikan medium toleran dan peka. Munculnya tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 yang toleran terhadap stres kekeringan diduga sangat berhubungan erat dengan peningkatan



Gambar 3. Keterkaitan antara indeks sensitivitas terhadap stres kekeringan dengan bobot daun kering dari tanaman tembakau GS non-transgenik dan tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 dengan respons (O) peka, (◇) medium toleran, dan (Δ) toleran terhadap stres kekeringan.

kandungan prolina yang lebih tinggi dibandingkan tembakau GS non-transgenik. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian terdahulu yang menunjukkan bahwa ketahanan terhadap stres kekeringan berhubungan dengan peningkatan kandungan prolina yang berperan sebagai *osmotic adjustment* (Ober and Sharp 1994). Hasil penelitian diketahui terjadi peningkatan konsentrasi prolina secara cepat pada ujung akar primer jagung ketika kondisi potensial air (ψ_w) rendah (Palfi and Juhasz 1971). Hasil ini memberi implikasi bahwa peranan prolina dalam mengatasi stres kekeringan sangatlah penting dan bisa dipakai sebagai indikasi tingkat toleransi tanaman terhadap stres kekeringan (Singh *et al.*, 1972).

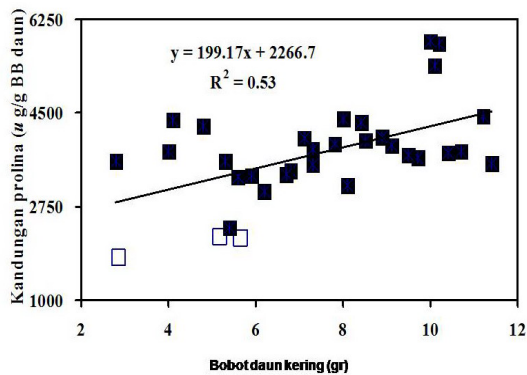
Tabel 4. Pengaruh Perlakuan Stres Kekeringan pada Periode 15-90 Hari Sesudah Tanam (HST) terhadap Kandungan Prolina Daun Tanaman T1 Zuriat dari Tembakau GS Transgenik P5cs Generasi T0 Dan Tembakau GS Non-transgenik. Contoh Daun Diambil setelah 6x Periode Stres (63 Hst)

Genotipe tembakau	Prolina daun (ug/g bobot kering)		Persentase Peningkatan
	Non-stres	Stres	
Non-transgenik GS	1099 aB	2044 bB	85,99
Transgenik GS-1	2936 aA	3639 aA	23,94
Transgenik GS-2	3824 aA	4449 aA	16,34
Transgenik GS-3	3002 aA	3927 aAB	30,81
Transgenik GS-4	2796 aA	3618 aB	29,40
Transgenik GS-5	3358 aA	3946 aA	17,51

Keterangan: Data rata-rata pada baris dengan huruf kecil atau kolom dengan huruf kapital yang sama, tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada $\alpha = 0,05$

Pengaruh Stres Kekeringan terhadap Kandungan Prolina

Pada kondisi lingkungan tumbuh non-stres, tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0, telah menunjukkan kandungan prolina yang nyata lebih tinggi dibandingkan dengan tembakau GS non-transgenik. Pengaruh stres kekeringan, pada umumnya cenderung meningkatkan kandungan prolina daun pada semua tanaman tembakau yang diuji (non-transgenik dan transgenik P5CS), tetapi hanya tanaman T1 zuriat dari tembakau transgenik P5CS generasi T0 nomor GS-3 yang menunjukkan peningkatan kandungan prolina akibat stres kekeringan yang nyata secara statistik dibandingkan kondisi non-stres (Tabel 4).



Gambar 4 : Regresi antara bobot daun kering (gr) dengan kandungan prolina daun tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 dan tembakau GS non-transgenik pada kondisi stres kekeringan. Tembakau non-transgenik (□) dan transgenik (■).

Semua tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 yang diuji menunjukkan kandungan prolina yang cenderung lebih tinggi dibandingkan tembakau GS non-transgenik. Pada kondisi stres kekeringan, kandungan prolina tembakau GS non-transgenik hanya 2044 $\mu\text{g/g}$ daun segar, sedangkan tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 memiliki kandungan prolina antara 3618 sampai 4449 $\mu\text{g/g}$ daun segar (Tabel 4).

Peningkatan kandungan prolina daun tanaman tembakau yang relatif tinggi secara nyata sangat berkorelasi dengan peningkatan bobot daun kering tanaman tembakau pada kondisi stres kekeringan ($R^2 = 0,53$). Dari perhitungan regresi antara bobot daun kering per tanaman dengan kandungan prolina daun tanaman tembakau, terlihat jelas tanaman tembakau transgenik yang mengekspresikan gen P5CS mampu mengakumulasi prolina lebih tinggi dibandingkan tanaman non-transgenik dan secara nyata pula mempunyai bobot daun kering per tanaman yang lebih tinggi dalam kondisi stres kekeringan (Gambar 4).

Diduga tanaman tembakau transgenik P5CS yang mengakumulasi prolina lebih banyak lebih mampu mengatasi kerusakan protein akibat stres kekeringan, karena disamping sebagai *osmotic adjustment*, prolina juga berperan

sebagai osmoprotektan yang mampu menetralkan pengaruh toksik NH_3 hasil hidrolisis protein dan sebagai sumber nitrogen bagi pemulihan fisiologi tanaman pasca stres kekeringan (Levitt, 1980).

Perbedaan tingkat toleransi tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 terhadap stres kekeringan, diduga disebabkan oleh segregasi genetik dari gen P5CS didalam genom tanaman tembakau dan juga konstitusi genetik dalam kondisi *heterozigot* atau *homozigot* serta adanya interaksi dengan faktor lingkungan sehingga menimbulkan perbedaan tingkat akumulasi prolina yang dapat disintesis oleh tanaman tembakau transgenik P5CS. Kemampuan tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 dalam mengurangi dampak negatif stres kekeringan diduga sangat erat hubungannya tingkat akumulasi prolina yang dapat disintesis oleh tanaman akibat over-ekspresi gen P5CS sebagai enzim penyandi biosintesis prolina.

KESIMPULAN

1. Akibat stres kekeringan yang cukup berat maka pertumbuhan tinggi tanaman, diameter batang, jumlah daun, berat kering dan luas daun tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 dan tembakau GS non-transgenik terhambat. Namun dalam kondisi lingkungan stress kekeringan, tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 masih menunjukkan perbedaan tinggi tanaman, diameter batang, jumlah, berat kering, dan luas daun yang nyata lebih tinggi dibandingkan dengan tembakau GS non-transgenik.
2. Pertumbuhan tanaman T1 zuriat dari tembakau GS transgenik P5CS generasi T0 yang lebih baik, berkorelasi nyata dengan peningkatan akumulasi prolina akibat over-ekspresi gen P5CS yang bersifat konstitutif.
3. Peningkatan kandungan prolina daun tanaman tembakau berkorelasi nyata dengan peningkatan bobot daun kering tanaman tembakau pada kondisi stress kekeringan.

DAFTAR PUSTAKA

- Bates LS, Waldren RP, Teare ID. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207.
- Bray EA 1997. Plant responses to water deficit. *Trend in Plant Science* 2: 48-54
- Ceccarelli S, Grando S. 1996. Drought as achallenge for the plant breeder. *Plant Growth Regul.* 20: 149-155.
- Chrispeels M.J, Maurel C. 1994. Aquaporins: The molecular basis of facilitated water movement through living plant cells. *Plant Physiol.* 105: 9-13
- Fischer RA, Maurer R. 1978. Drought resistance in spring wheat cultivars: I. Grain yield responses. *Aust J Agric Res* 29: 897-912.
- Irigoyen JJ, Emerich DW, Sanches-Diaz M. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfafa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol Plant* 84: 55-60.
- Kavi-Kishor PB, Hong Z, Miao GH, Hu CA, Verma DPS. 1995. Overexpression of delta- pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol* 108:1387-1394
- Levitt J. 1980. Responses of plants to enviromental stresses: water, radiation, salt, and other stresses. Vol. II. New York: Academic Press.
- Maggio A, Joly R.J. 1995. Effects of mercuric chloride on the hydraulic conductivity of tomato root systems. *Plant Physiol.* 109: 331-335
- Mc Cue KF, Hanson AD. 1990. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotech.* 8: 358-362.
- Mc Caig TN, Romagosa I. 1991. Water status measurements of excised wheat leaves: position and ages effects. *Crop Sci* 31: 1583-1588
- Mitra J. 2001. Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Current Sci* 80:758-763.
- Moinuddin, Khanna-chopra R. 2004. Osmotic ajustment in chickpea in relation to seed yield and yield parameters. *Crop Sci* 44: 449-455.
- Molnar I, Gaspar L, Sarvari E, Dulai S, Hoffmann B, Molnar-Lang M, Galiba G. 2004. Physiological and morphological responses to water stress in *Aegilops biuncialis* and *Triticum aestivum* genotypes with differing tolerance to drought. *Funct Plant Biol* 31: 1149-1159.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 15: 473-497.
- Ober ES, Sharp RE. 1994. Proline accumulation in mazie (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. *Plant Physiol* 105:981-987.
- Palfi G, Juhaz J. 1971. The theoretical basis and practical application of new method of selection for determining water deficiency in plant. *Plant Soil* 34: 503-507.
- Palva ET, Holmstrom K, Mantyla E, Welin B, Mandal A, tunela OE, londesborough J. 1996. Enhanced desiccation survival by engineering osmolyte biosynthesis in plants. In Grillo, S. dan O.A. Leone (eds). *Physiol Stress in Plants*.
- Pelah D, Wang W, Altman A, Shoseyov O, Bartels D. 1997. Differential accumulation of water stress related protein, sucrose synthase and soluble sugar in *Populus* species that differ in their water stress response. *Physiol Plantarum* 99:153-159.

- Riduan A, Santoso D, Utomo SD dan Sudarsono. 2006. Regenerasi Tembakau Transgenik yang Mengintegrasikan Gen P5CS dan Analisis Ekspresi. *Jurnal Agrotropika* 11(2):101-109.
- Singh TN, Aspinal D, Paleg LG. 1972. Proline accumulation and varietal adaptability to drought in barley: A potential metabolic measure of drought resistance. *Nature New Biol.* 236: 188-190.
- Steudle E, Frensch J. 1996. Water transport in plants: Role of the apoplast. *Plant Soil* 187: 67-79
- Williams JH, Boote KJ. 1995. Physiology and modelling – predicting the “unpredictable legume”. In Pattee, H.E. dan H. T. Stalker (eds.) *Advances in Peanut Science*. American Peanut Research and Education Society, Inc. Stillwater.