

Identifikasi Perubahan Karakter Agronomis Padi Transgenik Penanda Aktivasi cv. Asemandi Generasi T₁

Atmitri Sisharmini^{1*}, Aniversari Apriana¹, Diah Nurmaliki², Tri J. Santoso¹, dan Kurniawan R. Trijatmiko¹

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: mitri_ss@yahoo.com

²Mahasiswa Fakultas Pertanian, Universitas Jenderal Sudirman, Jl. Dr. Soeparno, Purwokerto 53123 JawaTengah

Diajukan: 19 Juli 2013; Diterima: 25 Oktober 2013

ABSTRACT

Identification of Changes of Agronomic Traits on the Activation-tagged Populations of T₁ Transgenic Rice cv. Asemandi. Atmitri Sisharmini, Aniversari Apriana, Diah Nurmaliki, Tri J. Santoso, and Kurniawan R. Trijatmiko.

The activation-tagged populations of transgenic rice cv. Asemandi have been developed by introducing construct of activation tag Ac/Ds into rice genome of cv. Asemandi. The T₁ transgenic rice populations cv. Asemandi containing construct of activation tag have been obtained and needed to be characterized. This study aimed to identify the Basta herbicide resistant plants, transgenic plants containing *hpt* and *bar* genes, and changes in agronomic traits. Basta resistant plant was identified by treating leaf with basta solution. *Hpt* and *bar* genes were detected by PCR using specific primers. Phenotype characters were identified by observing and measuring their agronomic parameters. The study results showed that out of 315 rice transgenic cv. Asemandi T₁ treated with Basta solution, 176 (55.87%) plants were indicated to be resistant to Basta. The results of PCR analysis revealed that eight rice transgenic cv. Asemandi tested contained both *hpt* and *bar* genes. In general, compared to the nontransgenic plants, there were changes in several agronomic parameters of T₁ transgenic plants cv. Asemandi, including plant height, days to flowering, days to harvesting, periods of grain filling, and weight of 100 grains. Correlation analysis showed that there was no correlation between days of harvesting to weight of 100 grains in transgenic rice, but there was correlation in nontransgenic rice. Transgenic rice plants cv. Asemandi with changes in the agronomic characters will be useful for further study, such as to analyze the function of the genes.

Keywords: Rice, transgenic, activation tagging, gene identification.

ABSTRAK

Identifikasi Perubahan Karakter Agronomis Padi Transgenik Penanda Aktivasi cv. Asemandi Generasi T₁. Atmitri Sisharmini, Aniversari Apriana, Diah Nurmaliki, Tri J. Santoso, dan Kurniawan R. Trijatmiko. Populasi T₁ padi transgenik penanda aktivasi cv. Asemandi telah dibentuk dengan cara mengintroduksi konstruk penanda aktivasi transposon Ac/Ds ke genom padi cv. Asemandi. Populasi tersebut telah mengandung konstruk penanda aktivasi,

tetapi belum diketahui perubahan karakter fenotipenya. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi galur yang tahan herbisida Basta, mengandung gen *hpt* dan *bar*, dan mengidentifikasi perubahan karakter agronomis populasi padi transgenik cv. Asemandi generasi T₁. Tanaman tahan Basta diidentifikasi dengan perlakuan larutan Basta pada daun. Gen *hpt* dan *bar* dideteksi dengan analisis PCR menggunakan primer spesifik. Karakter fenotipe tanaman diidentifikasi dengan mengamati dan mengukur beberapa parameter agronomisnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 315 tanaman cv. Asemandi mutan transgenik generasi T₁ yang diuji, 176 (55,87%) tanaman mempunyai ketahanan terhadap herbisida Basta. Secara umum, tanaman transgenik penanda aktivasi cv. Asemandi generasi T₁ mengalami perubahan karakter agronomis jika dibandingkan dengan tanaman nontransgenik. Perubahan itu terjadi pada tinggi tanaman, umur berbunga, umur panen, waktu pengisian malai, dan bobot 100 butir. Pada tanaman transgenik tidak ada korelasi antara umur panen dengan bobot 100 butir, sedangkan pada tanaman nontransgenik ada korelasi antara umur panen dengan bobot 100 butir. Hasil analisis PCR menunjukkan bahwa delapan tanaman padi transgenik penanda aktivasi cv. Asemandi yang diuji mengandung gen *hpt* dan *bar*. Tanaman padi transgenik penanda aktivasi cv. Asemandi generasi T₁ yang mempunyai karakter agronomis yang berbeda dengan tanaman nontransgenik akan bermanfaat untuk penelitian lebih lanjut, misalnya penelitian fungsi gen-gen.

Kata kunci: Padi, transgenik, penanda aktivasi, identifikasi gen.

PENDAHULUAN

Tanaman padi telah menjadi model dalam penelitian rekayasa genetika dan pengungkapan atau identifikasi fungsi suatu gen. Pengungkapan fungsi suatu gen dapat dilakukan dengan pendekatan *forward genetics* (dari mutan ke sekuen gen yang bertanggung jawab) dan *reverse genetics* (dari sekuen gen ke mutan) (Bouchez dan Hofte, 1998). Pendekatan *forward genetics* dapat dilakukan dengan menguji perbedaan fenotipe tanaman mutan dengan tipe liar atau melakukan skrining populasi mutan over ekspresi dengan teknik penanda aktivasi (*activation tagging*) (Trijatmiko *et al.*, 2005). Secara umum, dengan pendekatan *forward genetic* maka gambaran fungsi-fungsi

biologi dari suatu gen dapat dilihat dari mutasi *knock out* atau *loss of function* (Pereira, 2000).

Teknik penanda aktivasi merupakan pengembangan dari metode penanda T-DNA atau transposon (*transposon tagging*). Inseri mutagen dapat dilakukan dengan cara transformasi melalui transfer fragmen DNA (T-DNA) yang terletak pada plasmid Ti (*tumor inducing*) dari bakteri *Agrobacterium tumefaciens* (Sallaud *et al.*, 2004). Inseri transposon diharapkan terjadi pada gen penting dan menghasilkan fenotipe tanaman tertentu sehingga fungsi gen dapat diamati (Mulyaningsih *et al.*, 2010).

Penelitian Sisharmini *et al.* (2009) telah menghasilkan populasi padi transgenik cv. Asemendi generasi T₁. Populasi dibentuk dengan cara mengintroduksi konstruk penanda aktivasi transposon Ac/Ds (*activator/dissociation*) ke tanaman padi cv. Asemendi dengan bantuan *A. tumefaciens*. Populasi tersebut sudah diketahui positif mengandung konstruk penanda aktivasi, namun belum diketahui perubahannya akibat aktivasi dari sisipan konstruks tersebut. Karakter agronomis suatu tanaman dapat diamati berdasarkan sifat yang tampak secara visual. Menurut Poespodarsono (1988), penampakan suatu sifat tanaman ditentukan oleh interaksi antara komponen genotipe dan faktor lingkungan. Karakter kualitatif merupakan karakter yang dapat diamati dan dibedakan dengan jelas secara visual, karena wujud fenotipe yang berbeda antara satu dengan yang lainnya (Nasir, 2001).

Sistem transposon Ac/Ds merupakan metode alternatif yang lebih efisien untuk memperoleh tanaman padi mutan. Posisi mutasi yang berbeda-beda pada sejumlah besar tanaman padi dapat diperoleh melalui perpindahan (aktivitas) transposon (Marsch-Martinez *et al.*, 2002). Greco *et al.* (2001) menyatakan bahwa transposisi sistem heterolog Ac/Ds telah menunjukkan aktivitas dan potensial digunakan sebagai penyisipan mutagen yang efektif dan dapat digunakan untuk mengidentifikasi fungsi gen-gen penting pada padi. Populasi tanaman padi transgenik penanda aktivasi cv. Asemendi generasi T₁ diindikasikan mengandung individu yang beraneka ragam sifatnya sebagai akibat dari inseri transposon Ac/Ds.

Pertumbuhan tanaman padi dibagi ke dalam tiga fase, yaitu (1) vegetatif, (2) reproduktif, dan (3) pematangan. Fase vegetatif merupakan pertumbuhan organ vegetatif, seperti penambahan jumlah anakan, tinggi tanaman, jumlah, bobot, dan luas daun. Lamanya fase ini beragam sehingga menyebabkan adanya perbedaan umur tanaman (Datta, 1981; Yoshida, 1981). Identifikasi karakter agronomis dari populasi padi transgenik

penanda aktivasi cv. Asemendi akan bermanfaat untuk pemuliaan tanaman dan penelitian biologi molekuler, misalnya untuk isolasi gen.

Pada penelitian ini, identifikasi karakter agronomis yang dilakukan meliputi tinggi tanaman, umur berbunga, umur panen, lama waktu pengisian malai, dan bobot 100 butir. Karakter-karakter tersebut termasuk dalam fase reproduktif, fase pematangan sampai fase panen. Fase reproduktif dimulai dari terbentuknya primordia sampai pembungaan, sedangkan fase pematangan dimulai dari pembungaan sampai gabah matang. Fase pematangan merupakan fase akhir dari perkembangan pertumbuhan tanaman padi. Fase ini meliputi gabah matang susu, gabah setengah matang, dan gabah matang penuh. Periode ini memerlukan waktu kira-kira 30 hari dan ditandai dengan penebaran daun. Suhu sangat mempengaruhi periode pemasakan gabah (Vergara, 1980; Yoshida, 1981). Di daerah tropis, untuk kebanyakan varietas padi, lama fase reproduktif umumnya 35 hari dan fase pematangan sekitar 30 hari. Perbedaan umur tanaman hanya ditentukan oleh lamanya fase vegetatif.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi galur-galur tanaman dari populasi padi cv. Asemendi transgenik penanda aktivasi generasi T₁ yang tahan terhadap herbisida Basta, galur-galur yang mengandung gen *hygromycin phosphor transferase* (*hpt*) dan gen *biolapox resistance* (*bar*), serta galur-galur yang berubah karakter agronomisnya.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada tahun 2010 di Rumah Kaca dan Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen).

Penelitian ini dilakukan dengan tiga tahapan, yaitu (1) identifikasi galur tanaman yang tahan herbisida Basta dengan metode pengolesan herbisida Basta untuk memilih individu dari populasi generasi T₁ yang mengandung integrasi rakitan penanda aktivasi, (2) identifikasi karakter agronomis, yang meliputi tinggi tanaman, umur berbunga, lama waktu pengisian malai, umur panen, dan bobot 100 butir, dan (3) deteksi gen *hpt* dan gen *bar* menggunakan teknik PCR.

Identifikasi Galur Padi Transgenik T₁ dengan Herbisida Basta

Dua puluh satu galur transgenik dan kontrol, masing-masing 15 biji, dikecambahkan di dalam cawan petri yang berisi kertas saring yang selalu basah. Setelah 10 hari, kecambah dipindahkan ke bak plastik berukuran 44 cm x 34 cm x 15 cm yang berisi tanah.

Setelah berumur 4 minggu, tanaman dipindahkan ke ember plastik volume 10 l yang berisi tiga per empat bagian tanah sawah dan dipelihara sampai panen dengan pemberian pupuk urea dilakukan dua kali, pengendalian hama dengan pestisida, dan penyiraman secara teratur.

Uji ketahanan terhadap herbisida Basta dilakukan pada 21 galur (315 tanaman) padi transgenik penanda aktivasi cv. Asemandi generasi T₁ dan cv. Asemandi nontransgenik sebagai kontrol. Pengujian dilakukan dengan pengolesan larutan Basta pada daun tanaman padi berumur 3 minggu sesuai dengan penelitian Sisharmini *et al.* (2009). Tanaman tidak tahan Basta diindikasikan dengan terbentuknya nekrosis pada ujung daun atau daun menjadi terbakar setelah diberi perlakuan, sedangkan tanaman tahan tidak mengalami nekrosis dan daun tidak terbakar. Tanaman padi transgenik tahan herbisida Basta kemudian dipindahkan ke ember yang berisi tanah dan dipelihara di rumah kaca.

Identifikasi Karakter Agronomis Galur Padi Transgenik T₁

Tanaman padi transgenik yang mengandung penanda aktivasi (*activation tagging*) berarti mengandung 4× elemen *enhancer* dari promotor CaMV 35S yang ditempatkan dalam transposon yang berfungsi sebagai pembawa (*carrier*). *Enhancer* dapat mengaktifkan transkripsi, sehingga apabila telah terintegrasi dalam genom dapat mengaktifkan ekspresi gen yang berada di dekatnya. Ekspresi yang meningkat dari gen dapat menghasilkan fenotipe baru yang berbeda dengan tanaman nontransgenik, sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi fungsi suatu gen (Trijatmiko *et al.*, 2005). Demikian juga dengan hilangnya ekspresi atau fungsi dari suatu gen dapat juga digunakan untuk mengidentifikasi fungsi gen, karena insersi transgen berada pada bagian dari gen yang kehilangan fungsinya sehingga akan menghasilkan fenotipe baru.

Identifikasi karakter agronomis dilakukan dengan membandingkan tanaman padi cv. Asemandi transgenik yang mengandung penanda aktivasi dengan tanaman nontransgenik. Tanaman padi cv. Asemandi transgenik penanda aktivasi tersebut diharapkan mempunyai karakter agronomis yang berbeda dengan cv. Asemandi nontransgenik akibat adanya sisipan elemen 4× *enhancer* di dekat atau di tengah gen yang mengatur perubahan sifat sehingga menimbulkan adanya perbedaan fenotipe dengan tipe liarnya.

Identifikasi karakter agronomis dilakukan pada saat tanaman memasuki fase generatif, dengan meng-

amati tinggi tanaman, umur berbunga, waktu pengisian malai, umur panen, dan bobot 100 butir.

Tinggi tanaman padi diukur mulai dari pangkal batang di atas permukaan tanah hingga ujung daun tertinggi. Berdasarkan tingginya, tanaman padi dapat digolongkan ke dalam tiga golongan, yaitu tinggi (>130 cm), sedang (110-130 cm), dan rendah (<110cm) (Departemen Pertanian, 2003). Umur berbunga, dihitung dari hari mulai tanam sampai 50% bunga telah keluar. *Heading* (keluarnya bunga atau malai) dikenal juga sebagai tahap keluar malai. *Heading* ditandai dengan munculnya ujung malai dari pelepah daun bendera. Fase *heading* memerlukan waktu 10-14 hari karena terdapat laju perkembangan antar tanaman maupun antar anakan. Apabila 50% bunga telah keluar, maka pertanaman tersebut sudah berada dalam fase pembungaan (Yoshida, 1981). Waktu pengisian malai 100% dihitung dari lamanya waktu malai mulai terisi sampai malai terisi penuh (Yoshida, 1981). Umur panen dihitung dari hari mulai tanam sampai gabah matang penuh (hari setelah tanam). Penggolongan umur panen berdasarkan Samaullah (2009), yaitu ultra genjah (<90 hari), sangat genjah (90-104 hari), genjah (105-124 hari), sedang (125-150 hari), dan dalam (>150 hari). Bobot 100 butir dihitung dari berat 100 biji isi.

Identifikasi Galur Padi Transgenik T₁ yang Mengandung Gen *Hpt* dan *Bar*

Adanya elemen Ac dan Ds dalam genom tanaman padi dapat menimbulkan perubahan susunan genetik, yang dapat menimbulkan ketidakstabilan. Sallaud *et al.* (2004) menyatakan bahwa tanaman padi mutan dikatakan stabil apabila tanaman hanya mengandung elemen Ds namun tidak disertai oleh elemen Ac. Adanya elemen Ac akan menghasilkan enzim transposase, sehingga mampu bertransposisi yang menyebabkan elemen Ds, tidak stabil berada dalam genom sehingga masih bisa berpindah-pindah. Untuk mendeteksi adanya elemen Ac dalam genom tanaman mutan, dilakukan analisis PCR menggunakan primer spesifik untuk gen marka seleksi yang berada pada elemen tersebut, yaitu gen *hpt*, sedangkan untuk mendeteksi adanya elemen Ds, dilakukan PCR menggunakan primer spesifik untuk gen marka seleksi yang berada pada elemen tersebut, yaitu gen *bar*.

Isolasi DNA

Isolasi DNA padi menggunakan metode Shure *et al.* (1983). DNA digunakan sebagai cetakan untuk analisis keberadaan gen *hpt* dan gen *bar* menggunakan PCR.

Analisis PCR

Keberadaan gen *hpt* dan gen *bar* dianalisis dengan PCR menggunakan sepasang primer spesifik (Tabel 1).

Analisis PCR untuk deteksi gen *hpt* dilakukan sesuai dengan penelitian Apriana *et al.* (2011), sedangkan untuk deteksi gen *bar* dilakukan sesuai dengan penelitian Sisharmini *et al.* (2009).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Galur Padi Transgenik T₁ dengan Herbisida Basta

Hasil pengujian ketahanan tanaman padi cv. Asemendi transgenik penanda aktivasi terhadap herbisida Basta disajikan pada Tabel 2. Persentase tanaman padi yang tahan terhadap herbisida Basta pada tiap galur tanaman menunjukkan hasil yang berbeda dan mempunyai kisaran antara 0-100% (Tabel 2).

Lima belas tanaman dari galur As.12.10 yang diuji, tidak ada yang menunjukkan ketahanan terhadap Basta, sedangkan hasil pengolesan pada 15 tanaman

galur As.4.10, semuanya menunjukkan respon tahan. Secara keseluruhan, dari 315 tanaman padi yang diuji, 176 (55,9%) tanaman menunjukkan respon tahan terhadap herbisida Basta.

Ketahanan terhadap herbisida Basta ditunjukkan dengan daun yang tetap berwarna hijau dan tidak terbakar (nekrosis) setelah diolesi dengan larutan Basta. Tanaman yang tidak tahan ditandai dengan terbakarnya daun (mengalami nekrosis) dan warna daun berubah menjadi coklat pada daerah yang diolesi dengan larutan Basta (Gambar 1). Ketahanan terhadap herbisida Basta merupakan ekspresi dari gen *bar* yang telah terintegrasi dan terekspresi pada tanaman yang diuji. Tanaman transgenik penanda aktivasi yang tahan terhadap Basta, selanjutnya ditanam di rumah kaca dan diamati umurnya.

Identifikasi Karakter Agronomis Galur Padi Transgenik Generasi T₁

Identifikasi tinggi tanaman populasi padi transgenik penanda aktivasi generasi T₁ dikelompokkan ke dalam 3 golongan (Tabel 3). Persentase tinggi tanaman terbesar dari populasi tersebut adalah pada kate-

Tabel 1. Sekuen primer *forward* dan *reverse* gen *hpt* dan gen *bar*.

Nama primer	
<i>hpt forward</i>	5'-GCATCTCCCGCCGTGCAC-3'
<i>hpt reverse</i>	5'-GATGCCTCCGCTCGAAGTAGCG-3'
<i>bar forward</i>	5'-ACCATGAGCCCAGAACGACGC-3'
<i>bar reverse</i>	5'-CAGGCTGAAGTCCAGCTGCCA G-3'

Tabel 2. Ketahanan tanaman padi cv. Asemendi transgenik penanda aktivasi terhadap larutan herbisida Basta.

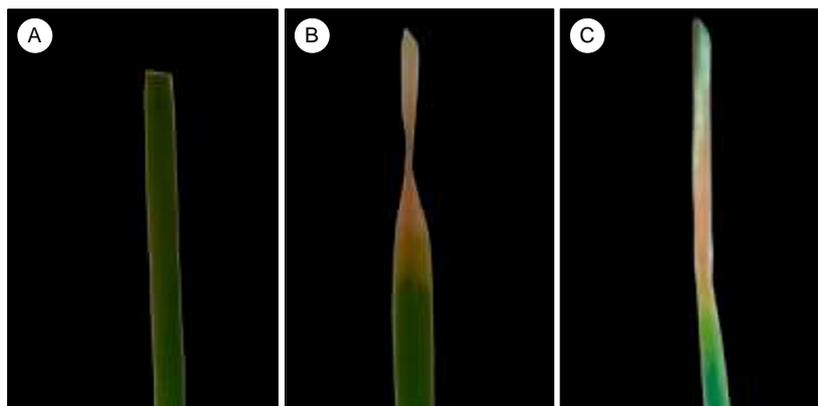
Galur tanaman	Jumlah tanaman yang diuji	Jumlah tanaman yang tahan herbisida Basta	Persentase tanaman yang tahan herbisida Basta
As.1.10	15	1	6,7
As.2.10	15	11	73,3
As.3.10	15	13	86,7
As.4.10	15	15	100
As.5.10	15	11	73,3
As.6.10	15	10	66,7
As.7.10	15	13	86,7
As.8.10	15	10	66,7
As.9.10	15	11	73,3
As.10.10	15	10	66,7
As.11.10	15	10	66,7
As.12.10	15	0	0
As.13.10	15	10	66,7
As.14.10	15	9	60
As.15.10	15	7	46,7
As.16.10	15	8	53,3
As.17.10	15	2	13,3
As.18.10	15	2	13,3
As.19.10	15	10	66,7
As.20.10	15	2	13,3
As.21.10	15	11	73,3
Jumlah	315	176	Rata-rata = 55,8

gori sedang, yaitu 47,21%. Sebanyak 81,99% tanaman transgenik penanda aktivasi yang diteliti menunjukkan perubahan tinggi tanaman, yaitu masuk dalam kategori rendah dan sedang. Tinggi tanaman populasi tanaman transgenik penanda aktivasi yang termasuk dalam kategori sedang berkisar antara 110-130 cm, sedangkan yang termasuk dalam kategori tinggi berkisar antara 131-156 cm. Tanaman nontransgenik mempunyai rata-rata tinggi tanaman 135,2 cm yang termasuk dalam kategori tinggi. Perubahan karakter tinggi tanaman diduga akibat adanya insersi konstruk penanda aktivasi.

Umur berbunga dihitung dari hari mulai tanam sampai hari ketika 50% bunga telah keluar (fase pembungaan). Identifikasi umur berbunga dilakukan pada 161 galur padi transgenik penanda aktivasi cv. Asemamdi generasi T_1 . Hasil pengamatan pada tanaman transgenik padi cv. Asemamdi penanda aktivasi menunjukkan bahwa 161 tanaman yang diuji mempunyai umur berbunga yang bervariasi dengan kisaran 74-109

hari, sedangkan umur berbunga pada tanaman cv. Asemamdi nontransgenik adalah 81,8 hari (Tabel 3).

Target dari penelitian ini adalah tanaman transgenik yang mempunyai umur berbunga lebih cepat atau lebih lambat dari tanaman nontransgenik. Tanaman padi cv. Asemamdi nontransgenik mempunyai rata-rata umur berbunga sekitar 81,8 hari. Sebanyak 30 tanaman mutan (18,63%) ternyata mempunyai umur berbunga <80 hari (Tabel 4) dan yang mempunyai umur berbunga paling pendek adalah As.11.10.4, yaitu 72 hari. Hal ini mungkin disebabkan oleh adanya insersi dari elemen *enhancer* pada bagian dekat gen yang berkaitan dengan waktu pembungaan padi. Tanaman yang mempunyai umur lebih lama daripada tanaman nontransgenik ada 12 tanaman (7,45%) dan yang mempunyai umur berbunga paling panjang adalah As.8.10.8, yaitu 109 hari. Hal ini mungkin disebabkan oleh adanya insersi penanda aktivasi pada bagian gen yang berkaitan dengan waktu pembungaan pada padi sehingga fungsi gen terganggu. Dengan diperolehnya



Gambar 1. Respon terhadap pengolesan herbisida Basta pada tanaman transgenik padi penanda aktivasi cv. Asemamdi dan cv. Asemamdi nontransgenik. Daerah yang ditandai dengan lingkaran menunjukkan adanya nekrosis pada daun. A = tanaman yang mengandung gen *bar*, B = tanaman yang tidak mengandung gen *bar*, dan C = tanaman cv. Asemamdi nontransgenik.

Tabel 3. Tinggi tanaman padi cv. Asemamdi transgenik penanda aktivasi.

Genotipe	Tinggi tanaman (cm)	Jumlah tanaman	Persentase (%)
Asemamdi transgenik penanda aktivasi	Rendah (<110)	56	34,78
	Sedang (110-130)	76	47,21
	Tinggi (>130)	29	18,01
Asemamdi nontransgenik	135,2 cm		

Tabel 4. Umur berbunga tanaman padi cv. Asemamdi transgenik penanda aktivasi.

Genotipe	Umur berbunga (hari)	Jumlah tanaman	Persentase (%)
Asemamdi transgenik penanda aktivasi	<80	30	18,63
	81-90	119	73,91
	>90	12	7,45
Asemamdi nontransgenik	81,8		

beberapa tanaman mutan yang mempunyai umur berbunga lebih pendek atau lebih panjang dibandingkan dengan tanaman nontransgenik, diharapkan tanaman tersebut dapat digunakan sebagai materi untuk mengisolasi gen-gen penting yang berkaitan dengan umur berbunga padi.

Umur panen atau umur tanaman ditentukan dari hari mulai tanam sampai gabah matang penuh. Umur panen tanaman padi cv. Asemandi nontransgenik adalah 120 hari, yang termasuk dalam kelompok umur genjah. Hasil pengamatan terhadap umur panen dari tanaman cv. Asemandi transgenik penanda aktivasi menunjukkan hasil yang bervariasi (Tabel 5). Jika dikelompokkan berdasarkan klasifikasi umur genjah menurut Balai Besar Penelitian Tanaman Padi (Samaullah, 2009), ternyata umur panen tanaman cv. Asemandi transgenik penanda aktivasi berada pada tiga kelompok, yaitu genjah (90-104 hari), sedang (125-150 hari), dan dalam (> 150 hari).

Di samping umur berbunga, pada penelitian ini juga diamati tanaman transgenik yang mempunyai umur panen lebih pendek atau lebih panjang dibandingkan dengan tanaman nontransgenik. Umur panen paling pendek dari populasi tanaman cv. Asemandi transgenik adalah 119 hari. Jika dibandingkan dengan tanaman padi cv. Asemandi nontransgenik hanya terdapat selisih satu hari. Namun dari populasi tanaman Asemandi transgenik tersebut, didapatkan 37 tanaman yang mempunyai umur panen lebih panjang dibandingkan dengan tanaman nontransgenik. Dari tiga puluh tujuh tanaman tersebut, 36 tanaman masuk dalam kategori berumur sedang dan satu tanaman berumur dalam. Umur panen tanaman Asemandi transgenik paling panjang adalah 148 dan 151 hari, yaitu As.3.10.10 dan As.3.10.11 dengan selisih umur

panen sekitar 27-29 hari jika dibandingkan dengan tanaman nontransgenik. Hal ini mungkin disebabkan oleh adanya pengaruh insersi konstruk penanda aktivasi pada bagian gen yang berkaitan dengan sifat kegenjahan pada padi.

Lama waktu pengisian malai adalah waktu yang diperlukan untuk pengisian malai pada padi, yang dihitung dari lamanya waktu malai mulai terisi sampai malai terisi penuh dan gabah matang penuh. Rata-rata waktu pengisian malai tanaman cv. Asemandi nontransgenik adalah 38,25 hari. Tanaman cv. Asemandi transgenik yang mempunyai waktu pengisian malai lebih cepat dari tanaman nontransgenik ada 13 tanaman (8,07%), dengan waktu pengisian kurang dari 30 hari. Tanaman cv. Asemandi transgenik yang mempunyai waktu pengisian malai lebih lambat dari tanaman nontransgenik ada 52 tanaman. Dari 52 tanaman tersebut, 40 tanaman cv. Asemandi transgenik mempunyai waktu pengisian malai 41-50 hari dan 12 tanaman dengan waktu pengisian ≥ 51 hari (Tabel 6). Waktu pengisian malai paling cepat adalah 17 hari, yaitu pada individu nomor As.7.10.5, As.8.10.1, dan As.8.10.3, sedangkan waktu pengisian malai paling lambat adalah 65 hari, yaitu As.13.10.11.

Penghitungan bobot 100 butir merupakan salah satu parameter untuk mengukur produktivitas tanaman padi. Pada penelitian ini bobot 100 butir digolongkan dalam tiga kategori (Tabel 7). Bobot 100 butir tanaman padi Asemandi transgenik paling banyak (72,04%) terdapat dalam kategori 2,00-2,99 g, sedangkan rata-rata bobot 100 butir pada tanaman nontransgenik adalah 2,32 g. Bobot paling tinggi dari tanaman padi cv. Asemandi transgenik adalah 2,97 g. Dari populasi tersebut 11 tanaman (6,83%) tidak menghasilkan biji isi atau hampa.

Tabel 5. Umur panen tanaman padi cv. Asemandi transgenik penanda aktivasi.

Genotipe	Umur panen (hari)*	Jumlah tanaman	Persentase (%)
Asemandi mutan penanda aktivasi	Ultra genjah (<90)	-	-
	Sangat genjah (90-104)	-	-
	Genjah (105-124)	124	77,02
	Sedang (125-150)	36	22,36
	Dalam (>150)	1	0,62
Asemandi tipe liar	120 hari		

*klasifikasi umur genjah berdasarkan pada Samaullah (2009).

Tabel 6. Lama waktu pengisian malai tanaman padi cv. Asemandi transgenik penanda aktivasi.

Genotipe	Lama pengisian malai (hari)	Jumlah tanaman	Persentase (%)
Asemandi transgenik penanda aktivasi	≤ 30	13	8,07
	31-40	96	59,63
	41-50	40	24,85
	≥ 51	12	7,45
Asemandi nontransgenik	38,25		

Umur berbunga, lama waktu pengisian malai, dan umur panen merupakan hal yang berkaitan dengan sifat kegenjahan pada tanaman. Untuk melihat ada tidaknya korelasi antara sifat tersebut maka dilakukan analisis korelasi untuk menentukan kuatnya atau derajat hubungan linier antara umur berbunga terhadap umur panen dan waktu pengisian malai. Semakin nyata hubungan linier, maka semakin kuat atau tinggi derajat hubungan garis lurus antara kedua variabel atau lebih (Sardjonopermono, 2001). Hasil analisis korelasi antar parameter yang diamati pada populasi tanaman padi transgenik penanda aktivasi juga dibandingkan dengan analisis korelasi pada tanaman nontransgenik.

Hasil analisis korelasi antara umur berbunga terhadap umur panen menunjukkan nilai $r = 0,1325$. Hal ini berarti bahwa korelasi antara dua variabel tersebut sangat lemah. Secara umum, umur berbunga dari populasi tanaman padi transgenik penanda aktivasi cv. Asemandi tidak mempengaruhi umur panen. Hal yang sama juga terjadi pada tanaman nontransgenik. Hasil analisis korelasi antara umur berbunga terhadap waktu pengisian malai menunjukkan nilai $r = -0,6249$, yang berarti korelasinya bersifat negatif. Hal ini berarti tidak ada korelasi antara umur berbunga dan waktu pengisian malai. Kondisi demikian juga terjadi pada tanaman nontransgenik. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa tidak ada korelasi antara umur berbunga dan waktu panen serta antara umur berbunga dan waktu pengisian malai antara tanaman

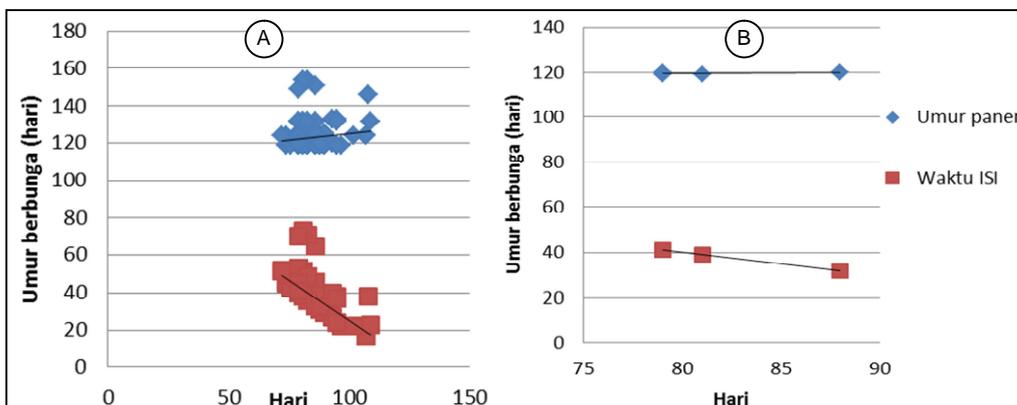
padi transgenik penanda aktivasi dan tanaman nontransgenik. Secara umum dapat dikatakan bahwa tidak ada perubahan karakter agronomis yang mempengaruhi hubungan antara umur berbunga terhadap umur panen dan waktu pengisian malai (Gambar 2).

Analisis korelasi juga dilakukan antara tinggi tanaman dan umur panen terhadap bobot 100 butir. Hasil analisis korelasi antara umur panen terhadap bobot 100 butir pada populasi padi transgenik penanda aktivasi menunjukkan nilai $r = -0,0338$, yang berarti korelasinya bersifat negatif. Hal ini berarti tidak ada korelasi antara bobot 100 butir dan umur panen. Hasil ini berbanding terbalik dengan tanaman nontransgenik yang mempunyai nilai $r = 0,67$, yang berarti bahwa umur panen mempengaruhi bobot 100 butir (Gambar 3B dan 3D). Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa secara umum ada perubahan karakter agronomis dari tanaman padi transgenik penanda aktivasi yang menyebabkan tidak adanya korelasi antara umur panen dan bobot 100 butir. Adanya perubahan karakter agronomis tersebut diduga karena adanya insersi konstruk penanda aktivasi.

Hasil analisis korelasi antara tinggi tanaman terhadap bobot 100 butir antara tanaman transgenik dan tanaman nontransgenik menunjukkan kecenderungan yang sama, yang ditunjukkan dengan nilai r positif (Gambar 3A dan 3C). Hal ini berarti bahwa antara tanaman transgenik penanda aktivasi dan tanaman nontransgenik menunjukkan adanya korelasi antara tinggi tanaman dan bobot 100 butir.

Tabel 7. Bobot 100 butir dari tanaman padi Asemandi transgenik penanda aktivasi.

Genotipe	Bobot 100 butir (g)	Jumlah tanaman	Persentase (%)
Asemandi transgenik penanda aktivasi	0-0,99	11	6,83
	1,00-1,99	35	21,74
	2,00-2,99	116	72,04
Asemandi nontransgenik	2,32		



Gambar 2. Korelasi antara umur berbunga terhadap umur panen dan waktu pengisian malai. A = populasi tanaman padi transgenik penanda aktivasi cv. Asemandi, B = tanaman cv. Asemandi nontransgenik.

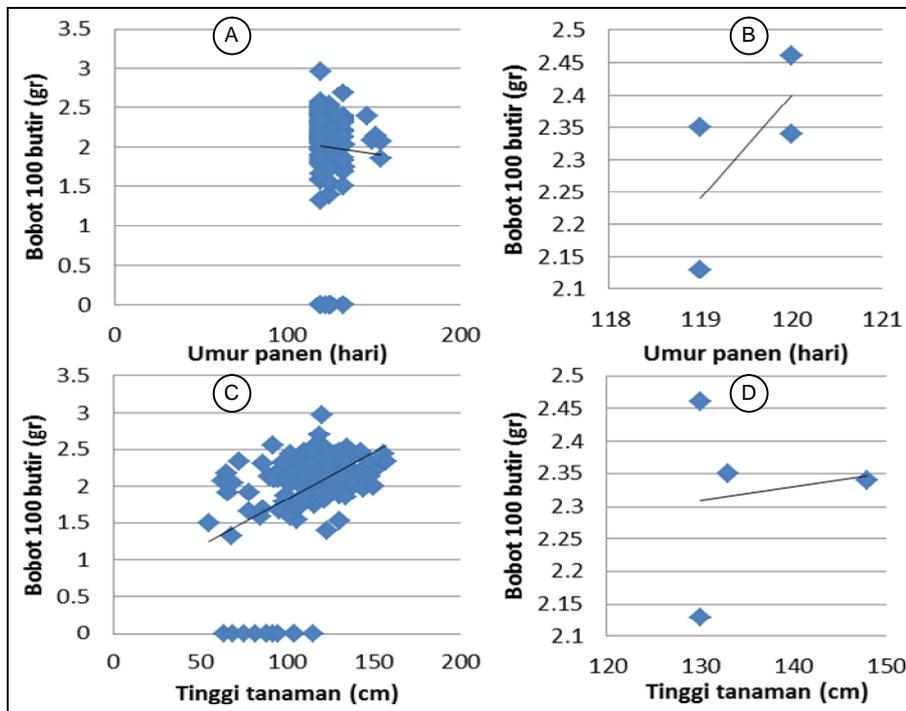
Deteksi Gen *Hpt* dan *Bar* dengan Teknik PCR

Analisis PCR dilakukan pada delapan tanaman padi transgenik penanda aktivasi cv. Asemandi generasi T₁ (Tabel 8). Hasil analisis PCR menunjukkan bahwa delapan tanaman transgenik yang dianalisis mengandung gen *hpt*. Kandungan gen *hpt* ditunjukkan oleh keberadaan amplikon DNA yang berukuran 500 bp yang merupakan produk amplifikasi dari gen tersebut (Gambar 4). Hal ini menunjukkan bahwa elemen Ac masih terdapat dalam genom tanaman cv. Asemandi transgenik.

Hasil PCR untuk deteksi gen *bar* (Gambar 5) menunjukkan bahwa dari delapan tanaman yang dianalisis, semuanya mengandung gen *bar*, yang diindikasikan

dengan keberadaan amplikon berukuran 500 bp. Hal ini menunjukkan bahwa elemen Ds masih berada dalam genom tanaman cv. Asemandi transgenik.

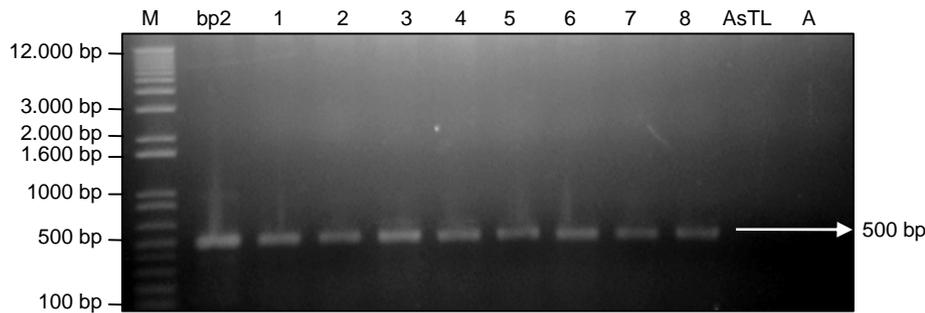
Hasil analisis PCR terhadap tanaman cv. Asemandi transgenik terpilih menunjukkan bahwa semua tanaman yang diuji masih mengandung elemen Ac maupun Ds. Hal ini berarti bahwa keberadaan elemen Ds yang mengandung 4× *enhancer* belum stabil terdapat dalam genom, yang masih memungkinkan terjadinya transposisi elemen Ds ke bagian genom lain pada generasi berikutnya. Namun demikian, untuk keperluan isolasi gen yang berkaitan dengan karakter target, genom tanaman cv. Asemandi mutan terpilih dapat digunakan sebagai materi untuk keperluan tersebut.



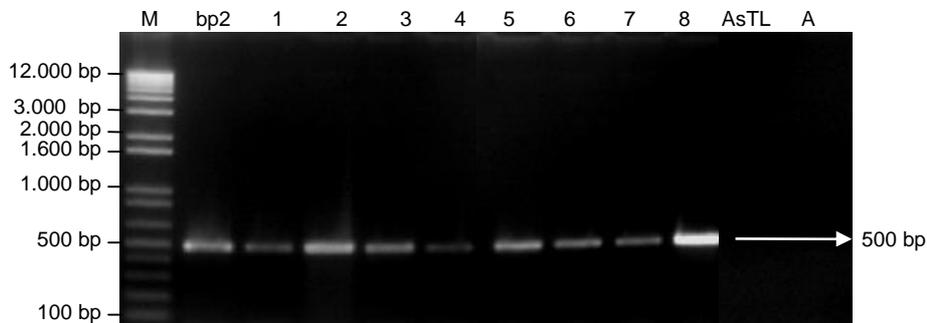
Gambar 3. Korelasi antara bobot 100 butir terhadap umur panen dan tinggi tanaman. A dan B = populasi padi transgenik penanda aktivasi cv. Asemandi. C dan D = tanaman cv. Asemandi nontransgenik.

Tabel 8. Keberadaan gen *hpt* dalam tanaman transgenik padi cv. Asemandi terpilih.

No.	Kode tanaman	Karakter	Gen <i>hpt</i> dan gen <i>bar</i>
1.	As.11.10.4	Umur berbunga cepat (72 hari)	Ada
2.	As.8.10.8	Umur berbunga lambat (109 hari)	Ada
3.	As.15.10.2	Umur panen cepat (119 hari)	Ada
4.	As.3.10.10	Umur panen lama (148 hari)	Ada
5.	As.3.10.11	Umur panen lama (151 hari)	Ada
6.	As.7.10.5	Waktu pengisian malai cepat (17 hari)	Ada
7.	As.8.10.1	Waktu pengisian malai cepat (17 hari)	Ada
8.	As.8.10.3	Waktu pengisian malai cepat (17 hari)	Ada
9.	As.3.10.11	Waktu pengisian malai lama (65 hari)	Ada



Gambar 4. Hasil amplifikasi gen *hpt* pada galur tanaman padi penanda aktivasi yang diuji. M = 1 kb plus DNA ladder; bp2 = plasmid B2 sebagai kontrol positif; 1-8 = sampel tanaman padi cv. Asemandi transgenik penanda aktivasi, berturut-turut 1 = As.11.10.4, 2 = As.8.10.8, 3 = As.15.10.2, 4 = As.3.10.10, 5 = As.3.10.11, 6 = As.7.10.5, 7 = As.8.10.1, 8 = As.8.10.3; AsTL= cv. Asemandi nontransgenik; dan A = air.



Gambar 5. Amplifikasi gen *bar* pada tanaman cv. Asemandi transgenik penanda aktivasi yang diuji. M = 1 kb plus DNA ladder; B2 = plasmid B2 sebagai kontrol positif; 1-8 = sampel tanaman padi cv. Asemandi transgenik penanda aktivasi, berturut-turut 1 = As.11.10.4, 2 = As.8.10.8, 3 = As.15.10.2, 4 = As.3.10.10, 5 = As.3.10.11, 6 = As.7.10.5, 7 = As.8.10.1, 8 = 8.10.3; AsTL= cv. Asemandi nontransgenik; dan A = air.

KESIMPULAN

Dari 315 tanaman padi transgenik generasi T₁ yang diuji, 176 tanaman tahan Basta. Dibandingkan dengan tanaman nontransgenik, pada umumnya tanaman transgenik penanda aktivasi cv. Asemandi generasi T₁ mengalami perubahan beberapa karakter agronomisnya, yaitu tinggi tanaman, umur berbunga, umur panen, waktu pengisian malai, dan bobot 100 butir. Pada tanaman transgenik tidak ada korelasi antara umur panen dan bobot 100 butir, tetapi pada tanaman nontransgenik ada korelasi antara umur panen dan bobot 100 butir. Delapan tanaman padi transgenik penanda aktivasi cv. Asemandi yang diteliti terbukti mengandung gen *hpt* dan *bar*. Tanaman padi transgenik penanda aktivasi cv. Asemandi yang mempunyai karakter agronomis yang berubah, dapat digunakan untuk penelitian lanjutan, misalnya untuk mempelajari fungsi gen-gen.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Sutrisno yang telah menjadi pembimbing dalam penelitian dan penulisan makalah serta Nuryati dan Heri Hersusatio atas bantuan teknis selama penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Apriana A., A. Sisharmini, W. Enggarini, Sudarsono, N. Khumaida, dan K.R. Trijatmiko. 2011. Introduksi konstruk over ekspresi kandidat gen *OsWRKY76* melalui *Agrobacterium tumefaciens* pada tanaman padi Nipponbare. *J. AgroBiogen* 7(1):19-27.
- Bouchez, D. and H. Hofte. 1998. Functional genomics in plants. *Plant Physiol.* 118:725-732.
- Datta, S.K. 1981. Principle and Practices of Rice Production. Wiley-Interscience Publication. New York. 618 p.
- Departemen Pertanian. 2003. Panduan Sistem Karakterisasi dan Evaluasi Tanaman Padi. Komisi Nasional Plasma Nutfah. Bogor. 68 hlm.

- Greco, R., P.B.F. Ourwerkerk, A.J.C. Taal, C. Favali, T. Beguiristain, P. Puidogomenech, L. Colombo, J.H.C. Hoge, and A. Pereira. 2001. Early and multiple Ac transposition in rice regenerated by an adjacent strong enhancer. *Plant Mol. Biol.* 46:215-227.
- Marsch-Martinez, N., R. Greco, G.V. Arkel, L.H. Estrella, and A. Pereira. 2002. Activation tagging using the *En-1* maize transposon system in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129:1544-1556.
- Mulyaningsih, E.S., H. Aswidinoor, D. Sopandie, P.B.F. Ourwerkerk, S. Nugroho, dan I.H.S. Loedin. 2010. Perbandingan tiga metode transformasi *Agrobacterium* untuk pencarian gen-gen terkait toleransi kekeringan menggunakan transposon Ac/Ds pada padi cv. Batutegi. *J. Biologi Indones.* 6(3):367-381.
- Nasir, M. 2001. Pengantar Pemuliaan Tanaman. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Nasional, Jakarta. 325 hlm.
- Pereira, A. 2000. A transgenic prospective on plant functional genomics. *Transgenic Res.* 9(4-5):245-260.
- Poespodarsono, S. 1988. Dasar-dasar Ilmu Pemuliaan Tanaman. Kerjasama Pusat Antara Universitas. Institut Pertanian Bogor dan Lembaga Sumberdaya Informasi. Bogor. 23 hlm.
- Sallaud, C., C. Gay, P. Larmande, M. Bes, P. Piffanelli, B. Piegu, G. Droc, F. Regad, E. Bourgeois, D. Meynard, C. Perin, X. Sabau, A. Ghesquiere, J.C. Glazmann, M. Delseny, and E. Guiderdoni. 2004. High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step toward in silico reverse genetics. *Plant J.* 39:450-464.
- Samaulah, Y. 2009. Indeks pertanaman padi IP 400 strategi, kebijakan, program dan uji coba. <http://www.litbang.deptan.go.id/press/one/18/pdf/indeks%20> [Diakses 21 Mei 2010].
- Sardjonopermono, I. 2001. Sekelumit Analisis Regresi dan Korelasi. BPFE. Yogyakarta. 35 hlm.
- Shure, M., S. Wessler, and N. Fedorof. 1983. Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. *Cell* 35:225-233.
- Sisharmini, A., A. Apriana, W. Enggarini, dan K.R. Trijatmiko. 2009. Pengembangan populasi mutan penanda aktivasi: I. Transformasi padi *japonica* tropis lokal Sulawesi cv. Asemendi dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens*. *J. AgroBiogen* 5(2):49-56.
- Trijatmiko, K.R., G.V. Arkel, A. Karaba, E.V. Enckevort, and A. Pereira. 2005. Activation tagging using *En-1* dan Ac-Ds maize transposon in rice. Comparative analysis of drought resistance genes in *Arabidopsis* and rice. Doctoral Dissertation, University of Wageningen. Netherlands. p. 111-128.
- Vergara, B.S. 1980. Rice plant growth and development. p. 75-86. *In* B.S. Luh (ed.) *Rice: Production and Utilization*. AVI Publishing Company. Westport, Connecticut.
- Yoshida, S. 1981. *Fundamentals of Rice Crop Science*. International Rice Research Institute. Los Banos, Philippines. 279 p.
-