

Respon Morfologis dan Ekspresi Gen *Aquaporin* pada Padi IR 64 yang Mengalami Cekaman Kekeringan pada Fase Reproduksi (Morphological Responses and Aquaporin Gene Expression in Rice IR64 under Drought Stress at the Reproductive Stage)

Made Pharmawati^{1)*}, Ni Nyoman Wirasiti¹⁾, Luh Putu Wrasiat²⁾

¹⁾Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran Bali, 80361, Telp/Fax: (0361)703137

²⁾Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran, Bali, 80361, Telp/Fax: (0361)701801

Email korespondensi: made_pharmawati@unud.ac.id

Diterima 7 Agustus 2017, diterima untuk dipublikasikan 28 Agustus 2017

Abstrak

Cekaman kekeringan merupakan faktor pembatas penting bagi pertumbuhan dan produktivitas tanaman termasuk padi. Penelitian ini bertujuan menganalisis respon padi IR64 terhadap cekaman kekeringan dengan pemberian polietilen glikol (PEG) pada fase reproduktif. Penelitian juga bertujuan menganalisis ekspresi gen aquaporin akibat cekaman kekeringan. Bibit padi ditanam dalam pot dan perlakuan PEG dengan konsentrasi 108g/L (-0.25MPa) dan 178g/L (-0.52 MPa) diberikan saat munculnya panikula. Perlakuan diberikan selama 2 minggu, kemudian tanaman disiram kembali. Ekspresi gen diamati pada akhir perlakuan dengan semi kuantitatif real time PCR. Ekstraksi RNA menggunakan RNeasy plant mini kit, sedangkan sintesis cDNA menggunakan Transcriptor First Strand cDNA Kit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah malai dan berat total malai berkurang akibat cekaman kekeringan. Persentase gabah kosong mencapai 84,6% pada perlakuan PEG-0,52 MPa, sedangkan pada perlakuan PEG -0,25 MPa persentase gabah kosong sebesar 67,8%. Pada kontrol persentase gabah kosong adalah 10,3%. Ekspresi gen OsPIP2;7 sedikit menurun pada perlakuan PEG -0,52 MPa.

Kata kunci: ekspresi gen, IR64, kekeringan, padi, PEG

Abstract

Drought stress is one of the limiting factors of plant growth and productivity including rice. The aim of this study was to analyze responses of IR64 rice to polyethylene glycol (PEG)-induced-drought stress at the reproductive stage. This study also aimed to analyze the expression of aquaporin under drought stress. Rice seedlings were grown in pot system and PEG treatment at concentration of -0.25MPa (108g/L) and -0.52 MPa (178g/L) were given when the panicles arose. Treatments were conducted for 2 weeks, after that the plants were rewatered. Gene expression was evaluated at the end of PEG treatment using semi quantitative real time PCR. RNA was extracted using RNeasy plant mini kit, while cDNA synthesis was done using Transcriptor First Strand cDNA Kit. The results showed that the number and weight of rice ear were less in plant treated with PEG than in control. The percentage of empty rice grain reached 84.6% at PEG -0.52 MPa, while at PEG -0.25 MPa the percentage of empty grain was 67.8%. In control plant, the percentage of empty grain was 10.3%. Drought stress did not alter the expression of OsPIP2;7.

Keywords: drought, gene expression, IR64, PEG, rice

PENDAHULUAN

Padi (*Oryza sativa* L.) merupakan komoditas penting, karena merupakan sumber makanan pokok bagi penduduk di banyak negara termasuk Indonesia. Produktivitas padi dipengaruhi oleh faktor biotik dan abiotik. Faktor abiotik utama yang membatasi produksi padi adalah cekaman kekeringan yang diakibatkan oleh defisit air (Majeed *et al.* 2011). Kondisi kekeringan menyebabkan menurunnya fotosintesis karena menutupnya stomata, kerusakan membran sel, dan terganggunya aktivitas beberapa enzim khususnya yang terlibat dalam sintesis ATP (Farooq *et al.* 2012).

Cekaman kekeringan menyebabkan terprogramnya kembali ekspresi gen-gen (Romo *et al.* 2001), misalnya menurunnya level mRNA yang berhubungan dengan proses fotosintesis (Bartels dan Nelson 2004). Gen-gen tertentu akan diinduksi jika tanaman yang mengalami cekaman kekeringan. Produk dari gen-gen tersebut terlibat dalam perlindungan seluler terhadap kerusakan yang diakibatkan oleh cekaman (*stress*). Adaptasi tanaman terhadap cekaman kekeringan melibatkan perubahan ekspresi gen-gen yang merespon terhadap kekeringan. Salah satu gen yang memberikan respon terhadap kekeringan adalah gen *aquaporin* (Afzal *et al.* 2015).

Aquaporin memfasilitasi transpor air dan molekul netral terlarut seperti molekul air, karbon monoksida melalui membran plasma sel (Afzal *et al.* 2015). *Aquaporin* pada tumbuhan diklasifikasikan ke dalam empat subfamili yaitu *plasma membrane intrinsic proteins* (PIPs), *tonoplast intrinsic proteins* (TIPs), *nodulin26-like membrane intrinsic protein* (NIPs), *small membrane intrinsic proteins* (SIPs) dan *basic*

membrane intrinsic proteins (BIPs) (Forrest dan Bhave 2008).

Stimulasi cekaman kekeringan dapat dilakukan dengan pemberian PEG (Polietilen Glikol). Polietilen Glikol yang memiliki berat molekul tinggi merupakan pengatur osmotik yang menurunkan potensial air pada larutan nutrisi tanpa diserap oleh tanaman dan tidak bersifat toksik (Roy *et al.* 2009). Larutan PEG 6000 telah banyak digunakan dalam penelitian cekaman kekeringan terhadap tanaman (Afa *et al.* 2012).

IR64 merupakan padi sawah unggul yang dilepas oleh IRRI pada tahun 1986 (Suprihatno *et al.* 2009). Padi IR64 merupakan kultivar padi yang banyak ditanam di Indonesia (Hadi *et al.* 2005). Padi ini berumur genjah yaitu 110-120 hari dengan tinggi tanaman 115-126cm (Suprihatno *et al.* 2009). Pengujian padi IR64 terhadap cekaman kekeringan telah banyak dilakukan pada fase perkecambahan dan fase bibit (Afa *et al.* 2012). Respon padi IR64 terhadap cekaman kekeringan pada fase reproduktif sangat jarang dilaporkan.

Tujuan penelitian ini adalah menganalisis respon padi IR64 terhadap cekaman kekeringan yang diinduksi dengan PEG pada fase reproduktif. Di samping itu, penelitian ini bertujuan menganalisis ekspresi gen *aquaporin* yaitu *OsPIP2;7* pada padi IR64 saat mengalami cekaman kekeringan pada fase reproduktif. Gen *OsPIP2;7* merupakan salah satu gen anggota keluarga gen *aquaporin* yang memiliki ekspresi tinggi pada daun (Afzal *et al.* 2015) dan banyak dipelajari pada padi (Guo *et al.* 2006).

METODE

Benih padi IR64 diperoleh dari petani di Kabupaten Tabanan, Bangli. Benih dikecambahkan dalam

media *rockwool*. Setelah berumur 2 minggu, bibit ditransfer ke dalam pot dengan diameter 25 cm dan tinggi 20 cm yang berisi medium tanah dan kompos dengan perbandingan 1:1. Sebanyak 10 bibit ditanam untuk tiap pot.

Perlakuan kekeringan diberikan pada konsentrasi PEG 6000 108g/L (-0.25 MPa) yang merupakan cekaman tingkat sedang dan 178g/L (-0.52 MPa) yang merupakan cekaman tingkat tinggi (Castillo *et al.* 2007). Tiap perlakuan diulang 4 kali. Penyiraman dengan PEG dilakukan pada fase reproduktif yaitu pada saat munculnya *panicle* (61 HST). Perlakuan diberikan selama dua minggu. Penyiraman dengan PEG dilakukan 3 kali dalam rentang waktu 2 minggu. Setelah 2 minggu, tanaman kembali disiram dengan air. Parameter morfologis yang diamati pada saat panen adalah berat kering jerami, jumlah malai dan berat total malai yang diamati saat panen setelah penyiraman kembali. Data dianalisis dengan *one way ANOVA*.

Eksresi gen aquaporin *OsPIP2;7* dilakukan dengan semi kuantitatif real time PCR. Daun tanaman diambil pada hari terakhir periode perlakuan kekeringan, RNA diekstrak menggunakan RNeasy mini plant kit (Qiagen). Sintesis cDNA dilakukan dengan menggunakan Transcriptor First Strand cDNA Kit (Roche). PCR dilakukan dengan menggunakan cDNA sebagai template. PCR terdiri dari 1 µl cDNA, 1 x PCR buffer, 200 µM dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 0.5µM forward primer (GTG AGG AAG ACG ACG ATG TTC) dan 0.5 µM reverse primer (CAG ATA CAT ACA GGC ACT CCA C) (Ramya *et al.* 2010) serta H₂O hingga mencapai total reaksi 25 µL. Siklus PCR terdiri dari 1 kali denaturasi awal pada 95°C selama 5 menit, diikuti dengan 40 kali denaturasi pada 95°C selama 1 menit, penempelan primer pada 52°C

selama 1 menit, pemanjangan pada 72°C selama 1 menit. Siklus berikutnya adalah 1 kali pemanjangan akhir pada 72°C selama 10 menit.

Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan 1,5% gel agarosa dalam buffer 1xTAE (Tris Acetic Acid, EDTA). Gel diwarnai dengan etidium bromida. Elektroforesis dilakukan pada 100 volt selama 45 menit. Selanjutnya gel diamati dengan sinar UV menggunakan GelDoc UV transiluminator. Level ekspresi gen diamati dari perpendaran fragmen DNA hasil amplifikasi dengan PCR.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perlakuan PEG diberikan saat munculnya *panicle*. Daun tanaman mulai menggulung setelah hari ke-5 perlakuan pada -0,52MPa dan hari ke-7 pada perlakuan -0,25MPa. Pada hari ke-12 semua helai daun menggulung dengan maksimal dengan skor penggulangan 5 berdasarkan penentuan skor oleh De Datta *et al.* (1988).

Berat basah jerami menurun mencapai 55,3% pada perlakuan -0.52 MPa. Penurunan berat basah tajuk padi akibat kekeringan telah umum diamati (Centritto *et al.* 2009), sedangkan penurunan berat kering tanaman bagian di atas tanah pada kondisi kekeringan pada padi IR64 telah dilaporkan (Nio dan Ludong 2013). Jumlah malai tidak berbeda antara tanaman kontrol dengan tanaman perlakuan, tetapi berat total malai pada kontrol lebih tinggi dibandingkan pada kedua perlakuan PEG (Tabel 1). Hal ini menunjukkan terdapatnya malai atau gabah kosong pada perlakuan dengan PEG.

Aquaporin memegang peranan penting dalam pertahanan tanaman terhadap cekaman biotik dan abiotik (Afzal *et al.* 2015).

Eksresi gen *OsPIP2;7* hampir tidak berubah akibat perlakuan PEG. Hasil elektroforesis dengan agarosa menunjukkan perpendaran pita DNA yang sedikit lebih rendah pada tanaman yang mendapat 178g/L (Gambar 1).

Tanaman yang mendapat cekaman kekeringan melakukan adaptasi molekular, biokimia, fisiologi, anatomi dan morfologi. Menggulgungnya daun merupakan salah satu respon morfologi tanaman terhadap kekeringan (Courtois dan Lafitte 1999). Menggulgungnya daun merupakan upaya untuk mengurangi luas permukaan daun. Cekaman kekeringan mengakibatkan terhambatnya pembelahan sel dan pembesaran sel, sehingga pertumbuhan terhambat (Sarvestani *et al.* 2008).

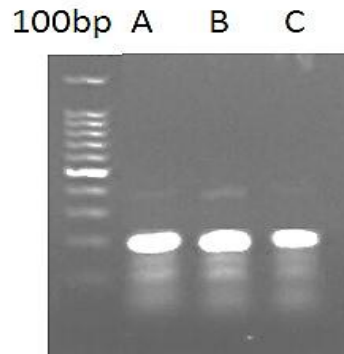
Pada penelitian ini, kondisi kekeringan pada saat fase reproduktif menurunkan hasil panen. Pengaruh kekeringan pada fase reproduktif antara lain meningkatkan sterilitas polen dan gugurnya malai. Reproduksi tanaman tergantung pada produk fotosintesis. Pada kondisi kekeringan, fotosintesis terganggu sehingga menurunkan *supply* nutrien ke organ reproduktif (Barnabas *et al.* 2008) karena fotosintat lebih banyak dialokasikan

pada akar sebagai upaya tanaman untuk mengeksplorasi air di lapisan tanah yang lebih dalam. Aktivitas seluler tidak dapat berlangsung tanpa substrat yang dihasilkan dalam proses fotosintesis (Barnabas *et al.* 2008). Sarvestani *et al.* (2008) melaporkan bahwa cekaman kekeringan pada tahap pembungaan menyebabkan penurunan produksi paling tinggi pada padi lokal Iran dibandingkan kekeringan pada fase vegetatif. Cekaman kekeringan pada saat pembungaan menyebabkan penurunan hasil panen sampai 60% (Garrity dan O'Toole 1994).

Tahap pengisian biji adalah tahap akhir pada pertumbuhan tanaman serealia. Durasi dan kecepatan pengisian biji menentukan berat akhir biji. Kekeringan merupakan faktor cekaman utama dalam pemasakan biji serealia yang dapat mengakibatkan kehilangan hasil. Penurunan hasil disebabkan pengurangan akumulasi pati (Barnabas *et al.* 2008). Penurunan berat biji akibat kekeringan pada awal periode pengisian biji berhubungan dengan sedikitnya jumlah sel endosperm (Nicolas *et al.* 1985), sedangkan penurunan berat biji pada tahap pengisian biji selanjutnya, disebabkan oleh terganggunya sintesis pati akibat

Tabel 1. Pengaruh Kekeringan terhadap Rata-rata Berat Basah Jerami, Rata-rata Jumlah Malai dan Rata-rata Berat Malai Total pada Padi IR64

| Perlakuan | Rata-rata Berat Basah Jerami (g) | Rata-rata Jumlah Malai (g) | Rata-rata Berat Total Malai (g) |
|-----------|----------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| Kontrol | 12.14 ^a | 9 ^a | 9.73 ^a |
| -0,25 MPa | 7.20 ^b | 9.25 ^a | 6.08 ^b |
| -0,52 MPa | 6.71 ^b | 8 ^a | 4.74 ^c |



Gambar 1. Ekspresi Gen Aquaporin (*OsPIP2;7*) Pada Padi IR64 saat Kekeringan yang Diinduksi dengan PEG. (A) Kontrol, (B) -0.25 MPa, (C) -0,52 MPa

terbatasnya *supply* asimilat ke biji (Blum 1998). Pada penelitian ini, rata-rata jumlah malai tidak berbeda antara kontrol dan perlakuan kekeringan, sedangkan berat malai menurun pada perlakuan kekeringan yang menandakan terganggunya proses pengisian biji yang dapat terjadi pada fase awal maupun fase lanjut.

Cekaman kekeringan pada tahap pengisian biji dapat menginduksi penuaan dan memperpendek periode pengisian biji (Barnabas *et al.* 2008). Tersedianya air yang terbatas, secara signifikan mengganggu fotosintesis (Subrahmanyam *et al.* 2006), sehingga jumlah asimilat yang tersedia untuk biji menjadi menurun. Pada kondisi demikian maka mobilisasi cadangan pada batang menjadi penting untuk mendukung pengisian biji (Blum *et al.* 1998)

Pada penelitian ini, ekspresi gen aquaporin *OsPIP2;7* hampir tidak berubah pada kondisi normal (tanaman kontrol) dengan kondisi kekeringan. Ekspresi gen sedikit lebih rendah pada potensial air -0,52 MPa. Hal ini dapat diartikan bahwa tanaman padi kultivar IR64 tidak memiliki karakteristik ketahanan terhadap kekeringan. Pada tanaman tomat transgenik yang mengekspresikan secara berlebihan *SIP2;7*, menunjukkan sifat ketahanan terhadap kekeringan (Li *et al.* 2016). Aquaporin *SIP2;7*

berkontribusi pada penyerapan air melalui perbaikan kandungan air tanaman dan pemeliharaan keseimbangan osmotik (Li *et al.* 2016).

KESIMPULAN

Cekaman kekeringan dengan menggunakan PEG6000 pada fase generatif menyebabkan penurunan berat basah jerami dan berat total malai pada padi IR64. Penurunan berat malai tertinggi terjadi pada potensial air -0,52 MPa. Ekspresi gen aquaporin *OsPIP2;7* berada pada level yang sama antara tanaman kontrol dengan tanaman yang mendapat perlakuan -0,25 MPa.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari Penelitian Fundamental yang didanai oleh Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi tahun 2016.

DAFTAR PUSTAKA

- Afa LO, Purwoko BS, Junaedi A, Haridjaja O, Dewi IS (2012) Pendugaan toleransi padi hibrida terhadap kekeringan dengan Polyeten Glikol (PEG) 6000. *Jurnal Agrivigor* 11(2): 292-299
- Afzal Z, Howton TC, Sun Y, Mukhtar MS (2016) The roles of aquaporins in plant stress responses. *Journal of*

- Developmental Biology 4(1): 9; doi:10.3390/jdb4010009
- Barnabas B, Jager K, Feher A (2008) The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, Cell and Environment*, 31: 11–38
- Bartels D, Nelson D (1994) Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics. *Plant and Cell Environment* 17: 1659-1667
- Blum A (1998) Improving Wheat grain filling under stress by stem reserve mobilization. *Euphytica* 100: 77–83.
- Castillo E, Tuong TP, Ismail A, Inibushi K. (2007) Response to salinity in rice: Comparative effect of osmotic and ionic stresses. *Plant Production Science*, 10(2): 159-170
- Centritto M, Lauteri M, Monteverdi MC, Serraj R. (2009) Leaf gas exchange, carbon isotope discrimination, and grain yield in contrasting rice genotypes subjected to water deficits during the reproductive stage. *Journal of Experimental Botany* 60(8): 2325–2339.
- De Datta SK, Malabuyoc JA, Aragon EL (1988) A Field Screening Technique for Evaluating Rice Germplasm for drought tolerance during the vegetative stage. *Field Crops Research* 19(2): 123-134
- Farooq M, Hussain M, Wahid A, Siddique KHM (2012) Drought stress in plant: an overview. In R. Aroca. ed. *Plant Responses to Drought Stress*. Berlin; Springer
- Forrest K L, Bhavé M (2008) The PIP and TIP aquaporins in wheat form a large and diverse family with unique gene structures and functionally important features. *Functional Integrated Genomics* 8: 115–33
- Garrity, DP, O'Toole JC (1994) Screening rice for drought resistance at the reproductive phase. *Field Crops Research* 39; 99–110
- Guo L, Wang ZY, Lin H, Cui WE, Chen J, Liu M, Chen ZL, Qu LJ, Gu H.(2006) Expression and functional analysis of the rice plasma-membrane intrinsic protein gene family. *Cell Research* 16: 277-286
- Hadi S, Budiarti T, Haryadi (2005) Studi komersialisasi benih padi sawah varietas unggul. *Buletin Agronomi* 33(1): 12 – 18
- Li R, Wang J, Li S, Zhang L, Qi C, Zhao B, Ren S, Guo Y-D (2016) Plasma membrane intrinsic proteins *SIP2;1*, *SIP2;7* and *SIP2;5* conferring enhanced drought stress tolerance in tomato. *Scientific Reports* 6:31814; DOI: 10.1038/srep31814
- Majeed A, Salim M, Bano A, Asim M, Hadees M (2011) Physiology and productivity of rice crop influenced by drought stress Induced at different developmental stages. *African Journal of Biotechnology* 10(26): 5121-5136
- Nicolas ME, Gleadow RM, Dalling MJ (1985) Effect of post anthesis drought on cell-division and starch accumulation in developing wheat grains. *Annals of Botany* 55: 433–444
- Nio SA, Ludong DPM (2013) Comparing the drought tolerance of local rice cultivar Superwin with other cultivars cultivated in North Sulawesi Province based on dry matter partitioning. *Proceeding ICGRC 2013*: 17-22

- Ramya M, Raveendran M, Sathiyamoorthy S, Ramalingam J (2010) Insilico analysis of drought tolerant genes in rice. *International Journal Biology and Medical Research* 1(3): 36-40
- Romo SE, Labrador B, Dopico (2001) Water stress-regulated gene expression in *Cicer arietinum* seedlings and plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 1017-1026
- Roy R, Mazumer PB, Sharma, GD (2009) Proline, catalase and root traits as Indices of drought resistance in bold grained rice (*Oryza sativa*) genotypes. *African Journal of Biotechnology* 8(23): 6521-6528
- Sarvestani ZT, Pirdashti H, Sanavy SAMM, Balouchi H (2008) Study of water stress effects in different growth stages on yield and yield components of different rice (*Oryza sativa* L.) cultivar. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11: 1303-1309
- Subrahmanyam D, Subash N, Haris A, Sikka A (2006) Influence of water stress on leaf photosynthetic characteristics in wheat cultivars differing in their susceptibility to drought. *Photosynthetica* 44: 125–129.
- Suprihatno B, Daradjat AA, Satoto, Baehaki SE, Widiarta IN, Setyono A, Indrasari SD, Lesmana OS, Sembiring H (2009) Deskripsi varietas padi. Balai Besar Penelitian Tanaman Padi. Sukamandi; Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Departemen Pertanian