

**ANALISIS FISIOLOGI DAN MOLEKULAR DARI MEKANISME
TOLERANSI ALUMINIUM PADA PADI GOGO**

**LAPORAN AKHIR PENELITIAN
PROGRAM INSENTIF RISET DASAR
BIDANG FOKUS: KETAHANAN PANGAN**

Oleh:

Dr. Ir. Miftahudin, MSi

Dr. Ir. Tatik Chikmawati, MSi



**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

2008

**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN INSENTIF RISET DASAR**

A. Judul Penelitian

: Analisis Fisiologi dan Molekular dari Mekanisme toleransi Aluminium pada Padi Gogo

B. Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap dan Gelar : Dr. Ir. Miftahudin, MSi
b. Jenis Kelamin : Laki-laki
c. Pangkat/Gol/NIP : Penata/IIIC/131851281
d. Bidang Keahlian : Fisiologi dan Biologi Molekular Tumbuhan
e. Fakultas/Departemen : MIPA/Biologi
f. Perguruan Tinggi : Institut Pertanian Bogor

C. Tim Peneliti

No	Nama	Bidang Keahlian	Fakultas/ Departemen	Perguruan Tinggi
1	Dr. Ir. Tatik Chikmawati, MSi	Biodiversitas dan Sumberdaya Genetik Tumbuhan	MIPA/Biologi	Institut Pertanian Bogor

3. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian

Jangka waktu penelitian yang diusulkan : Tiga Tahun
Biaya total yang diusulkan : Rp. 250.000.000.-
Biaya yang disetujui tahun II : Rp. 250.000.000.-

Bogor, 2 Desember 2008

Mengetahui,
Sekretaris LPPM IPB,

Ketua Pelaksana,

Dr. Ir. Suryahadi, DEA
NIP. 130 933 585


Dr. Ir. Miftahudin, MSi
NIP. 131 851 281

PRAKATA

Puji syukur Alhamdulillah penelitian dan laporan Program Insentif Riset Dasar tahun I yang berjudul Analisis Fisiologi dan Molekular dari Mekanisme Toleransi Aluminium pada Padi Gogo ini dapat terselesaikan dengan baik. Penelitian tahun II dari tiga tahun penelitian yang direncanakan telah dilakukan dengan tujuan utama menganalisis sekresi asam malat dari dua varietas padi sensitive (IR64) dan toleran (Hawarabunar)Al, F1 dan populasi F2 yang mendapat cekaman Al, marka molekular SSR dan keberadaan QTL/lokus pengendali sekresi asam malat. Hasil analisis tersebut merupakan pijakan awal dalam upaya mengungkap mekanisme toleransi aluminium pada padi gogo.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi atas kesempatan dan biaya penelitian yang diberikan kepada penulis dan tim untuk melaksanakan penelitian ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada LPPM IPB atas semua bantuan yang diberikan mulai daripengusulan, pelaksanaan dan pelaporan penelitian ini. Kami merasa penelitian tahun kedua ini masih harus dilanjutkan ke tahun berikutnya karena hasil dari seluruh kegiatan penelitian ini baru akan terlihat benang merahnya apabila tahapan berikutnya dilaksanakan dengan baik, untuk itu dukungan dari pihak terkait sangat diharapkan.

Kami menyadari masih banyak yang belum dapat dikerjakan, tetapi dengan keterbatasan dana yang ada, penulis dan tim berusaha semaksimal mungkin untuk berbuat yang terbaik. Akhirnya semoga laporan ini bermanfaat.

Bogor, 2 Desember 2008

Ketua Peneliti,

Dr. Ir. Miftahudin, MSi
NIP. 131 851 281

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR TABEL	vi
ABSTRAK	vii
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. STUDI PUSTAKA	10
BAB III. PROSEDUR DAN METODOLOGI	16
BAB IV. HASIL DAN PERMASALAHAN.....	20
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	27
LAMPIRAN.....	32

DAFTAR GAMBAR

No	Halaman
1. Sekresi asam malat dari akar padi yang mendapat berbagai tingkat cekaman AI (A) dan periode cekaman (B dan C).....	21
2. Pola distribusi sekresi asam malat pada populasi F2.....	22
3. Contoh elektroforegram hasil analisis PCR marka molekular SSR yang divisualisasi pada gen superfine agarose 3% dalam buffer 1 x TBE.....	24
4. Kurva LOD dalam penentuan lokasi Lokus penyandi sekresi asam malat pada popualsi F2 silangan IR64 x Hawarabunar.....	26
5. Peta genetik kromosom 3 lengan pendek dan posisi lokus sekresi asam malat	26

DAFTAR TABEL

No.	Halaman
1. Chi square test untuk pola pewarisan monogenik dari karakter sekresi asam malat.....	23

ABSTRAK

Kebutuhan Indonesia akan beras sebagai sumber pangan utama kian meningkat seiring dengan meningkatnya jumlah penduduk. Akan tetapi di masa yang akan datang kemampuan pertanian Indonesia dalam menyediakan beras akan semakin menurun dengan semakin berkurangnya lahan sawah untuk pertanaman padi karena konversi lahan untuk pemukiman dan industri. Oleh karena itu perlu dicari areal pertanaman padi baru yang salah satunya dengan menggunakan lahan kering marginal seperti lahan asam. Akan tetapi usaha pertanian pada lahan asam akan menemui kendala terutama karena kelarutan aluminium (Al) yang tinggi yang dapat menyebabkan keracunan bagi tanaman, sehingga pertanian di lahan-lahan seperti ini diperlukan input yang cukup tinggi dan memerlukan varietas padi yang toleran Al. Untuk mengembangkan varietas padi toleran Al, diperlukan perakitan varietas dari tetua-tetua yang toleran dan memiliki karakter fisiologi yang baik. Studi mekanisme dan karakter toleransi terhadap Al dengan mengintegrasikan pengetahuan fisiologi, genetika dan teknik biologi molekular dapat mempercepat pengungkapan mekanisme toleransi tersebut yang selanjutnya dapat digunakan untuk mempercepat dan mengarahkan perakitan varietas ke sasaran yang tepat. Pada penelitian tahun II telah dilakukan analisis sekresi asam malat baik dari tetua, F1 dan populasi F2 hasil persilangan padi peka Al (IR64) dan toleran Al (Hawarabunar), analisis marka molekular pada populasi F2 dan faktor genetik pengendali sekresi asam malat.

Sekresi asam malat meningkat dengan meningkatnya tingkat dan periode cekaman Al. Pada tingkat cekaman 15 ppm Al selama 72 jam telah mampu membedakan tetua peka dan toleran Al. Analisis sekresi asam malat pada populasi F2 menunjukkan bahwa karakter ini dikendalikan secara multigenik dengan satu gen tunggal sebagai faktor pengendali utama. Analisis QTL dari karakter sekresi asam malat mengindikasikan adanya QTL pada lengan pendek dari kromosom 3 padi. Dengan pendekatan analisis karakter secara monogenic, lokus pengendali sekresi asam malat dapat terdeteksi pada daerah koromosom 3 yang diapit oleh marka molekular SSR RM517 dan RM545 dengan nilai LOD 3.02.

Agar hasil penelitian tahun kedua ini bermanfaat, maka penelitian perlu dilanjutkan ke tahap berikutnya, yaitu kloning dan karakterisasi gen-gen yang berada di daerah lokus pengendali sekresi asam malat. Karakterisasi dapat dilakukan dengan pendekatan transformasi gen pada tanaman model atau padi varietas unggul yang peka AI.

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Kerangka Riset

Di masa yang akan datang, kebutuhan Indonesia akan pangan, terutama beras, semakin meningkat, sementara ketersediaan lahan sawah semakin berkurang sejalan dengan meningkatnya konversi lahan sawah untuk pemukiman dan industri. Usaha ekstensifikasi tanaman padi ke lahan-lahan merjinal, seperti tanah-tanah asam, harus diupayakan. Penggunaan varietas padi unggul spesifik lokasi (VUSL) yang dapat beradaptasi dan tumbuh baik pada tanah asam dan lahan-lahan berkelarutan Al tinggi, seperti lahan pasang surut, merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan program ekstensifikasi ini.

Keracunan Al merupakan pembatas utama bagi pertumbuhan dan produksi tanaman pada tanah asam. Di Indonesia, tanah asam didominasi oleh tanah-tanah Podsolik Merah Kuning yang luasnya mencapai 48.3 juta ha dan terutama tersebar di Sumatra, Kalimantan, Sulawesi dan Irian Jaya (Sudjadi, 1984). Perbaikan teknik budidaya yang ditujukan untuk mengatasi keracunan aluminium pada tanah asam telah menunjukkan keberhasilan yang tidak diragukan lagi. Akan tetapi telah disepakati secara luas bahwa perbaikan tanaman, terutama melalui bioteknologi, merupakan cara terbaik untuk pengembangan dan perbaikan tanaman yang toleran terhadap cekaman Al. Karena pentingnya masalah keracunan Al pada tanah asam ini, maka perhatian yang cukup serius dari para ilmuwan telah dicurahkan baik dalam memahami mekanisme toleransi terhadap cekaman Al maupun upaya mengisolasi gen-gen toleransi Al untuk dimanfaatkan dalam memperbaiki karakter agronomis dari tanaman sehingga dapat tumbuh dan berproduksi lebih baik pada tanah asam. Sayangnya, gen-gen toleransi Al belum dapat diisolasi.

Secara genetik, toleransi tanaman padi terhadap Al dikendalikan oleh 4 sampai 10 QTL. Hal ini mengindikasikan bahwa toleransi tanaman padi terhadap cekaman Al mungkin melibatkan berbagai faktor. Enam tahun terakhir penulis terlibat dalam penelitian yang bertujuan untuk memahami mekanisme toleransi tanaman terhadap cekaman Al pada serealia melalui usaha mengisolasi gen toleran Al dengan menggabungkan teknik “map-based cloning” dan hubungan sintetik antar sesama anggota Gramineae. Hasil penelitian menunjukkan bahwa

terdapat daerah gen toleran Al (*A1f3*) pada kromosom 4 dari tanaman rye yang sintetik dengan segmen kromosom 3 dari tanaman padi (Miftahudin et al., 2004). Pada segmen ini terdapat sekitar 37 gen putatif yang berpotensi sebagai calon gen toleransi Al berdasarkan dua pertimbangan. Pertama, enam dari 37 gen putatif padi tersebut merupakan penanda molekular yang terpaut erat dengan lokus gen toleransi Al pada gandum, barley dan rye. Dua diantaranya adalah marka molekular yang mengapit (*flanking marker*) lokus gen toleransi Al pada rye yang masing-masing berjarak 0.05 cM. Dua gen yang lain berkosegregasi dengan lokus tersebut (Miftahudin et al., 2005). Kedua, segmen kromosom padi tersebut merupakan bagian dari lengan pendek kromosom 3 padi yang memiliki salah satu QTL untuk toleransi terhadap cekaman Al (Miftahudin et al., 2004; Nguyen et al., 2003; 2002; 2001; Wu et al., 2000). Diperkirakan pada daerah ini terdapat gen yang terlibat dalam sekresi asam organik pada kondisi cekaman Al (lihat Bab II Studi Pustaka). Mekanisme toleransi tanaman terhadap cekaman Al melalui sekresi asam organik telah diyakini memainkan peran yang sangat penting.

Hasil penelitian over ekspresi gen penyandi protein transpoter untuk malat yang diisolasi dari tanaman gandum dapat meningkatkan toleransi tanaman tembakau transgenik terhadap cekaman Al, tetapi gen ini tidak dapat meningkatkan toleransi dari padi transgenik terhadap cekaman Al (Sasaki et al., 2004). Ada dua kemungkinan penyebabnya. Pertama, padi mungkin memiliki mekanisme sekresi asam organik yang berbeda dengan tanaman gandum maupun tembakau. Kedua, jenis asam organik yang disekresikan oleh akar tanaman padi mungkin berbeda dengan jenis asam organik yang dilepas oleh gandum. Hasil penelitian ini menunjukkan masih perlunya penelitian mekanisme toleransi tanaman padi ditinjau dari sisi sekresi asam organik.

Penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh peneliti utama pada proposal ini menunjukkan bahwa asam organik pada padi lokal Indonesia varietas Krowal yang toleran terhadap cekaman Al meningkat sangat nyata pada kondisi cekaman Al. Sedangkan sekresi asam organik pada varietas IR64 yang peka Al tidak menunjukkan peningkatan, bahkan cenderung mengalami penurunan (lihat Bab Telaah Pustaka). Adanya korelasi negatif antara jumlah asam organik yang disekresikan dengan kandungan Al dalam akar padi varietas Krowal saat

mendapat cekaman Al dan pada kondisi normal, mengindikasikan bahwa biosintesis asam organik bukan merupakan faktor penentu bagi sekresi asam organik, tetapi ada faktor lain yang berperan dalam mendorong sekresi asam organik.

1.2 Permasalahan

Kemampuan pertanian kita untuk menyediakan beras cenderung menurun dengan berkurangnya luas lahan yang dapat digunakan untuk budidaya padi. Hal ini mengharuskan program peningkatan produksi padi diarahkan ke penggunaan lahan-lahan kering, seperti tanah asam, dimana keracunan aluminium (Al) menjadi faktor pembatas dalam produksi tanaman.

Pada pH tanah 5 atau lebih rendah, spesies Al berupa Al^{3+} menjadi larut dan bersifat racun bagi perakaran. Kelarutan Al yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan dan fungsi akar yang selanjutnya dapat menurunkan produksi (Kochian, 1995). Pemuliaan tanaman yang diarahkan untuk mendapatkan varietas toleran Al merupakan suatu topik penelitian yang perlu dilakukan. Pengetahuan tentang mekanisme toleransi Al pada serealia, termasuk padi, merupakan dasar penting untuk pengembangan varietas toleran Al, akan tetapi pengetahuan fisiologi, genetika dan biologi molekular yang mendasari mekanisme toleransi tanaman terhadap Al masih belum sepenuhnya dimengerti karena ketiadaan alat analisis untuk mengungkap fenomena dibalik keragaman toleransi Al di antara spesies serealia. Pengetahuan gen-gen yang responsif Al dan diregulasi oleh Al telah diperoleh dari berbagai spesies dengan perspektif yang berbeda-beda (Richards et al., 1998; dan Ezaki et al., 2000), tetapi sejauh ini gen-gen yang bertanggung jawab langsung terhadap toleransi Al (selanjutnya disebut gen toleransi Al) pada tanaman belum diidentifikasi dan dikarakterisasi. Kloning gen toleransi Al serta analisis mekanisme toleransi yang berasosiasi dengan gen tersebut akan memberikan kontribusi yang signifikan terhadap pengertian kita tentang bagaimana memanipulasi karakter toleransi tanaman terhadap keracunan Al.

1.3 Pendekatan Masalah

Ada dua mekanisme toleransi tanaman terhadap Al yang sejauh ini diusulkan yaitu: pertama, mekanisme toleransi internal dengan cara menenggang akumulasi Al di dalam sitoplasma sel, dan kedua, mekanisme toleransi dengan cara mengeluarkan Aldadri akar (Kochian, 1995; Mastumoto, 2000). Pada beberapa tanaman pangan, seperti gandum (*Triticum aestivum* L.), barley (*Hordeum vulgare* L.), rye (*Secale seeale* L.), sorgum (*Sorghum bicolor* L.), dan jagung (*Zea mays* L.) (Ryan et al., 1995; Li et al., 2002; Pellet et al., 1995), cekaman Al dapat mengaktifkan sekresi asam organik berupa anion malat, sitrat atau oksalat. Pada padi mekanisme toleransi terhadap cekaman Al belum sepenuhnya diketahui dengan jelas, meskipun demikian telah diketahui bahwa toleransi padi terhadap Al, terutama padi lokal Indonesia, menunjukkan adanya karagaman antar varietas/genotipa dari peka sampai toleran (Jagau, 2000). Dari beberapa penelitian menunjukkan peranan penting dari sekresi asam organik terhadap mekanisme toleransi tanaman terhadap aluminium (Kochian, 1995). Oleh karena itu penelitian ini akan dibatasi pada usaha mengidentifikasi dan mengisolasi gen yang bertanggung jawab terhadap sekresi asam organik pada kondisi cekaman Al serta menganalisis mekanisme fisiologis yang berkaitan dengan sekresi asam organik sebagai cara tanaman padi menenggang cekaman Al.

Tujuan jangka panjang dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan gen-gen yang bertanggung jawab terhadap karakter toleransi Al pada padi, sehingga dapat digunakan dalam usaha pembentukan varietas padi toleran Al. Sedangkan tujuan dari penelitian yang akan berlangsung selama tiga tahun ini adalah:

1. Mempelajari jenis dan pola sekresi asam organik pada padi gogo toleran dan sensitif Al.
2. Menganalisis marka molekular dan mengidentifikasi faktor genetik (lokus/QTL) yang terlibat dalam sekresi asam organik pada padi gogo.
3. Mengidentifikasi dan mengisolasi kandidat gen yang berperan dalam mengendalikan sekresi asam organik pada padi gogo dalam kondisi cekaman Al.

4. Melakukan karakterisasi kandidat yang berperan dalam sekresi asam organik.

Pada tahun pertama, telah dilakukan analisis jenis dan pola sekresi asam organik dari tanaman padi toleran dan sensitif AI, pembentukan populasi F2 dan penapisan marka molekular yang akan digunakan untuk pemetaan genetik pada tahun kedua. Pada tahun kedua, penelitian ini diarahkan untuk mengidentifikasi faktor genetik yang terlibat dalam sekresi asam organik melalui analisis keterpautan atau analisis Quantitative Trait Loci (QTL). Analisis bioinformatika dari sekuen Bacterial Artificial Chromosome (BAC) padi yang ada pada database juga dilakukan sebagai upaya awal untuk mengidentifikasi kandidat gen-gen yang terlibat dalam sekresi asam organik dan karakter toleransi AI. Kegiatan-kegiatan penelitian pada tahun kedua adalah sebagai berikut:

1. Analisis fenotipe, berupa analisis sekresi asam organik dari populasi F2 hasil persilangan antara varietas padi IR64 (peka AI) dan Hawarabunar (toleran AI)
2. Isolasi DNA dari minimal 300 tanaman populasi F2
3. Analisis PCR dari marka molekular yang telah ditapis pada tahun pertama (marka molekular yang menunjukkan polimorfisme antar kedua tetua)
4. Konstruksi peta genetik dari kromosom padi
5. Analisis keterpautan dan identifikasi QTL dari karakter sekresi asam organik dan toleransi AI

1.4 Hipotesis

Berdasarkan fenomena di atas dapat dibuat suatu hipotesis tentang mekanisme sekresi asam organik pada padi sebagai berikut:

1. Jenis asam organik yang disekresikan dari akar padi mungkin berbeda dengan jenis asam organik yang disekresikan dari gandum, sehingga diperlukan protein transpor yang berbeda.
2. AI dapat memicu atau menekan aktifitas suatu faktor di dalam sel yang memungkinkan aktifitas dari protein transpor yang khas untuk asam organik pada padi. Faktor tersebut berupa faktor transkripsi, protein represor atau komponen dari sistem transduksi sinyal yang mungkin ditemukan pada daerah QTL pada kromosom 3 dari padi. Mekanisme

aktivasi dari protein transpor pada padi berbeda dengan mekanisme yang terjadi pada tanaman lain.

3. Aktivasi atau represi dari faktor tersebut merupakan bagian tidak terpisahkan dari aktifitas protein transpor dalam mensekresikan asam organik.

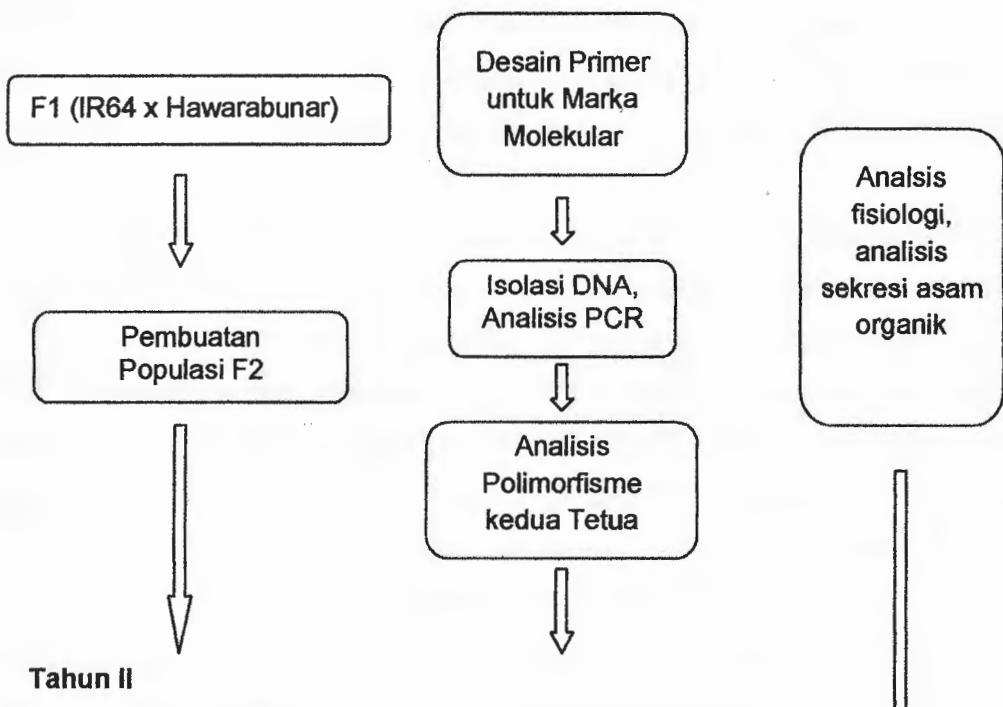
1.5 Metode Riset

Berdasarkan landasan teori tentang mekanisme toleransi ekstremal dengan cara sekresi asam organik dan hipotesis di atas, maka penelitian ini dirancang untuk menjawab pertanyaan-pertanyaan berikut:

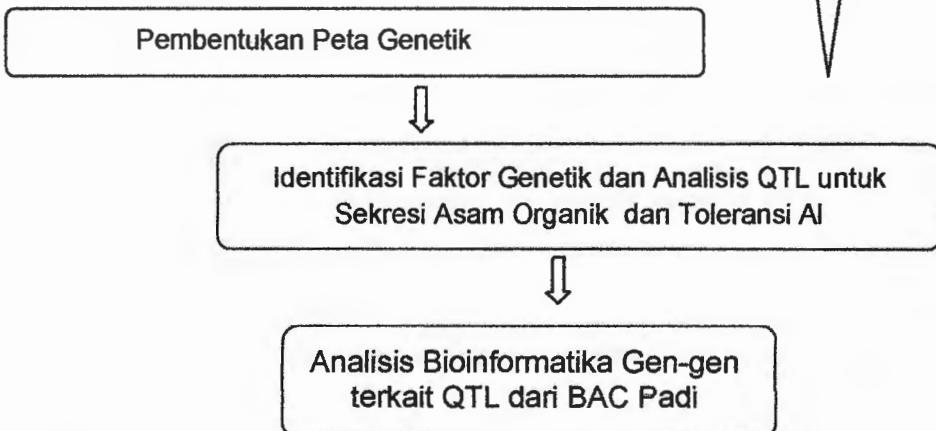
1. Apakah jenis asam organik yang disekresikan oleh padi gogo ketika dalam kondisi cekaman?
2. Bagaimana pola sekresinya dikaitkan dengan tingkat dan periode cekaman AI?
3. Apakah sekresi asam organik dikendalikan oleh faktor genetik? Ada berapa gen yang terlibat? Gen tunggal atau multigen?
4. Apakah gen-gen yang terlibat dalam pengendalian sekresi asam organik terdapat pada kromosom 3 dari padi? Apakah dari 37 gen putatif yang terdapat pada klon BAC dari studi terdahulu (Miftahudin et al., 2005) minimal ada satu gen yang berperan dalam sekresi asam organik?
5. Bagaimana karakter dari gen-gen pengendali sekresi asam organik pada padi? Apakah berupa faktor transkripsi, protein represor atau aktivator, protein transpor pada membran atau komponen dari sistem transduksi sinyal?
6. Bagaimana pola ekspresi dari gen-gen pengendali sekresi asam organik tersebut? Apakah gen-gen tersebut spesifik untuk cekaman AI, atau gen-gen yang bersifat responsif terhadap cekaman abiotik lainnya?
7. Dapatkah gen-gen tersebut meningkatkan toleransi tanaman transgenik?

Untuk menjawab pertanyaan-pertanyaan tersebut maka disusun suatu metode riset berikut yang akan dilakukan dalam waktu tiga tahun.

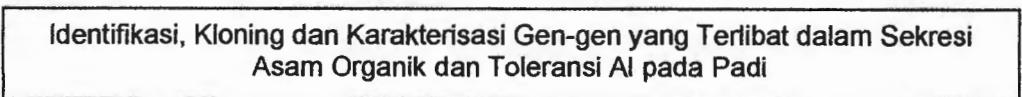
Tahun I



Tahun II



Tahun III



1.6 Arti Penting Riset

Penelitian-penelitian fisiologi dan genetika dari toleransi tanaman terhadap cekaman AI, terutama pada serealia seperti padi, gandum, barley, sorghum dan jagung, sampai saat ini belum dapat mengungkap substansi utama yang mendasari mekanisme toleransi tanaman terhadap AI belum dimengerti dengan baik.

Tujuan pertama dari penelitian ini adalah untuk mempelajari jenis dan pola sekresi asam organik pada padi gogo toleran dan peka AI. Pengetahuan tentang AI akan memberikan pijakan awal dalam mengungkap mekanisme fisiologis dari dasar molekular dibalik mekanisme toleransi tanaman terhadap cekaman AI. Tujuan kedua adalah mengidentifikasi faktor genetik yang terlibat dalam sekresi asam organik pada padi gogo. Analisis QTL untuk karakter toleransi AI yang selama ini banyak dilaporkan adalah didasarkan pada korelasi marka molekular dengan data fenotipe yang berupa nilai panjang akar relatif. Hal ini memungkinkan ditemukan banyak QTL dan sulitnya menentukan fokus penelitian dalam upaya mengklon gen toleransi AI. Oleh karena itu penelitian ini merupakan *shortcut* dalam megisolasi gen toleransi AI melalui pencarian faktor genetik dan molekular yang paling berperan dalam mengendalikan sekresi asam organik. Disamping itu, populasi F₂ hasil persilangan antara varietas padi IR64 dengan varietas lokal Indonesia dan data marka molekular beserta peta genetiknya merupakan bahan penelitian dan informasi yang berharga untuk dapat digunakan dalam penelitian-penelitian lanjutan.

Tujuan lain dari penelitian ini adalah mengidentifikasi, mengisolasi dan mengkarakterisasi kandidat gen yang berperan dalam mengendalikan sekresi asam organik pada padi gogo dalam kondisi cekaman AI. Kloning dan karakterisasi dari kandidat gen yang berperan dalam sekresi asam organik menjadi suatu keharusan, sehingga dari kandidat gen tersebut dapat ditemukan gen toleransi AI.

Secara umum peneliti ini perlu dilakukan karena selain akan dapat memberikan kontribusi terhadap pengetahuan tentang mekanisme toleransi tanaman terhadap cekaman AI, juga dapat membuka kesempatan tergalinya sumber-sumber toleransi yang terdapat pada kultivar padi lokal Indonesia, seperti klon gen toleransi AI. Selain itu hasil penelitian ini akan dapat digunakan dalam

usaha perbaikan genetik padi untuk mendapatkan varietas padi unggul spesifik lokasi yang toleran terhadap AI.

BAB II. STUDI PUSTAKA

Keracunan Al merupakan faktor pembatas utama pertumbuhan dan produksi tanaman pada tanah-tanah asam. Pada pH tanah di bawah 5, bentuk Al yang toksik bagi tumbuhan, Al^{3+} , larut di dalam larutan tanah, sehingga dapat menghambat pertumbuhan akar, yang akhirnya menurunkan produksi tanaman. Telah banyak disepakati bahwa daerah sekitar 1-3 mm dari ujung akar, yang meliputi jaringan meristematik dan daerah pemanjangan, merupakan target utama dari keracunan Al (Ryan et al., 1993; Delhaize et al., 1993a, b; Pellet et al., 1995; Delhaize dan Ryan, 1995). Daerah ujung akar juga merupakan daerah respon tanaman terhadap keracunan Al, sehingga ujung akar merupakan tempat yang sering digunakan untuk mempelajari mekanisme keracunan dan toleransi tanaman terhadap Al.

Mekanisme keracunan Al pada tanaman yang mengarah pada penghambatan pertumbuhan akar sampai saat ini masih belum jelas. Ada beberapa hipotesa tentang mekanisme tersebut. Pertama, Al dapat berinteraksi dengan komponen sel seperti dinding sel (Horst, 1995; Blamey et al, 1993), membran plasma dan sistem transpor (Kinraide, 1988; Miyasaka et al., 1989; Kochian, 1995), kanal kation (*cation channel*) (Huang et al., 1992a, b), komponen sitoplasma (Lazof et al., 1994), dan sitoskeleton (Blancafor et al., 1998). Kedua, Al dapat berinteraksi dengan komponen dari proses transduksi sinyal di dalam sel, seperti protein G dan kalmodulin (Haug et al., 1994). Kemungkinan yang terakhir adalah Al dapat berinteraksi dengan DNA pada sel meristematik ujung akar yang aktif membelah (Matsumoto, 1991). Berdasarkan hipotesa tersebut banyak penelitian-penelitian diarahkan pada peran dari komponen sel, seperti protein membran dan enzim-enzim sitoplasma, dan komponen transduksi sinyal dalam mekanisme toleransi tanaman terhadap Al.

2.1 Fisiologi dari Toleransi Tanaman terhadap Al

Mekanisme utama yang mendasari toleransi tanaman terhadap cekaman Al masih belum jelas, tetapi secara umum toleransi tanaman dikontrol oleh faktor genetik, dan keragaman dari karakter ini dapat ditemukan antara dan di dalam spesies tanaman, termasuk di dalam anggota famili Gramineae (Aniol and Gustafson, 1990). Secara umum mekanisme toleransi tanaman terhadap

cekaman Al dikelompokkan ke dalam dua model utama yaitu mekanisme detoksifikasi (*internal detoxification mechanism*) dan pengeluaran Al (*exclusion mechanism*). Model pertama dari mekanisme toleransi terhadap Al adalah penginaktifan Al di dalam sitoplasma (*internal detoxification*). Sel tanaman toleran Al dapat menginaktifkan Al yang masuk ke dalam sitoplasma dengan cara mengelatnya dengan asam organik seperti pada *Cassia tora* (Ma et al., 1998), mentranspormya ke dalam vakuola, menghasilkan protein khusus yang dapat mengikat Al dan mengubahnya ke bentuk tidak toksik, atau meningkatkan kapasitas pengurangan spesies oksigen reaktif di dalam akar yang dihasilkan oleh cekaman Al (Ezaki et al., 2000). Cara lain dari model ini adalah dengan memproduksi enzim yang tidak sensitif Al, seperti *calmodulin-independent NAD⁺ kinase* (Aniol, 1991).

Pada model yang kedua, Al dapat dikeluarkan dari sel ujung akar dengan cara meningkatkan pada dinding sel, mengeluarkan Al melintasi plasma membran, mengeluarkan fosfat, meningkatkan pH rizosfer, dan memproduksi eksudat dan asam organik (Taylor, 1991; Kochian, 1991). Di antara mekanisme pengeluaran tersebut, pelepasan asam organik, seperti malat, sitrat dan oksalat, adalah mekanisme yang paling banyak diterima. Asam organik, seperti malat dan sitrat, memiliki peran yang cukup penting pada mekanisme toleransi dari gandum, rye dan jagung (Ryan et al., 1995; Li et al., 2002; Pellet et al., 1995), tetapi masih belum diketahui apakah hal yang sama juga terjadi pada padi.

Mekanisme beberapa penelitian menunjukkan bahwa pelepasan asam organik sangat berkaitan erat dengan mekanisme toleransi terhadap Al, tetapi faktor utama yang mempengaruhi sekresi asam organik dari akar selama cekaman Al masih belum jelas. Pineros dan Kochian (2001) menunjukkan bahwa suatu protein kanal anion (*aniol channel*) pada ujung akar jagung diaktifkan selama kondisi cekaman Al, dan memberi fasilitas pelepasan sitrat dan malat. Hasil penelitian terbaru menunjukkan bahwa over ekspresi gen penyandi protein transporter dari malat yang diisolasi dari gandum dapat meningkatkan toleransi tanaman tembakau transgenik terhadap cekaman Al, tetapi gen ini tidak dapat meningkatkan toleransi dari padi transgenik (Sasaki et al., 2004). Hasil penelitian ini menunjukkan masih perlunya penelitian mekanisme toleransi tanaman padi ditinjau dari sisi sekresi asam organik.

2.2 Genetik dan Biologi Molekular dari Toleransi Tanaman terhadap AI

Kultivar atau genotipa toleran AI dari berbagai spesies tanaman telah diteliti dan dikembangkan di berbagai wilayah di dunia dimana tanah asam menjadi suatu masalah pertanian. Spesies atau genotipa di dalam satu spesies berbeda dalam toleransinya terhadap keracunan AI (Foy et al., 1974; Aniol and Gustafson, 1990). Padi dan rye tergolong paling toleran di antara anggota famili Gramineae, berturut-turut diikuti oleh gandum, jagung, sorgum, dan barley (Kim et al., 2001).

Telah diketahui bahwa toleransi AI pada spesies dari famili Gramineae dikendalikan oleh faktor genetik dengan satu atau lebih gen yang terlibat. Hal ini bergantung pada spesies dan tingkat keracunan AI. Aniol (1991) dan Berzonsky (1992) sepakat bahwa tidak ada faktor sitoplasma yang terlibat dalam toleransi AI. Pada gandum, Delhaize et al. (1993a) dengan menggunakan galur NIL menunjukkan bahwa toleransi AI dikendalikan oleh satu gen dominan (*Alt1*). Pada gandum, cv Chinese Spring, gen dominan ini terletak pada kromosom 4D (Lou and Dvorak, 1996). Riede and Anderson (1996) juga mengidentifikasi adanya gen tunggal (*Alt_{BH}*) pada lengan panjang kromosom 4D dari gandum yang mengendalikan karakter toleransi AI ini.

Karakter toleransi AI pada rye dikendalikan oleh sedikitnya tiga gen dominan, yaitu *Alt1*, *Alt2*, dan *Alt3* yang berturut-turut berada pada kromosom 6RS, 3RL dan 4RL (Aniol and Gustafson, 1984; Miftahudin et al., 2002). Gallego and Benito (1997) mengidentifikasi sedikitnya dua gen berada pada kromosom yang berbeda dalam mengendalikan karakter ini. Pada barley, gen yang mengendalikan toleransi AI merupakan gen tunggal (*A/p*) yang berada pada kromosom 4 (Minella and Sorrells, 1997; Tang et al, 2000). Pada jagung, dua gen yang berlokasi pada kromosom 6 dan 10 mengendalikan toleransi tanaman terhadap AI dengan gen utama terletak pada kromosom 10 (Sibov et al, 1999).

Berbeda dengan anggota famili Gramineae lainnya, toleransi AI pada padi merupakan suatu karakter poligenik. Empat sampai 10 QTL telah dipetakan pada kromosom padi dengan menggunakan populasi padi yang berbeda-beda (Wu et al., 2000; Nguyen et al., 2003, 2002, 2001). Dengan menggunakan persilangan interspesies antara *O. Sativa* dan *O. Rufipogon*, diperoleh hasil bahwa QTL terbesar ($R^2=24.9\%$) yang paling berperan dalam karakter toleran AI pada padi

terletak pada kromosom 3 dan diapit oleh marka molekular CDO1395 dan RG391 (Nguyen, 2001).

2.3 Studi Pendahuluan yang Telah Dilaksanakan

Pembandingan antara QTL untuk toleransi AI pada kromosom 3 dari padi dan gen-gen yang mengendalikan toleransi AI pada gandum, barley dan rye telah dilakukan untuk melihat apakah gen-gen tersebut terletak pada daerah yang sidentik (Miftahudin, 2004). Hasil pembandingan menunjukkan bahwa terdapat daerah kromosom yang terkonversi antara lengan panjang dari kromosom 4D (4DL) dari gandum (Riede and Anderson, 1996), lengan panjang dari kromosom 4R (4RL) dari rye (Miftahudin et al., 2002), dan lengan panjang dari kromosom 4H (4HL) dari barley (Tang et al., 2000). Gen yang mengendalikan toleransi terhadap AI pada gandum (*Alt_{BH}*) dan rye (*Alt₃*) berkosegregasi dengan marka molekular BCD1230 (Rodriguez-Milla and Gustafson, 2001; Miftahudin et al., 2002), tetapi terpaut agak jauh dengan marka molekular CDO1395. Meskipun demikian, marka CDO1395 terpaut erat dengan gen toleransi AI pada barley (*A/p*). Karena hubungan sinteni yang erat antara segmen kromosom 4DL, 4RL, dan 4HL, maka diperkirakan bahwa gen *Alt_{BH}*, *Alt₃* dan *A/p* adalah gen-gen ortholog yang mungkin memiliki fungsi yang sama (Miftahudin et al., 2004). Hasil pembandingan juga menindikasikan bahwa daerah kromosom 3 dari padi yang mengandung QTL untuk toleransi AI memiliki hubungan colinear dengan daerah lengan panjang dari kromosom homoeolog grup 4 dari Triticeae. Jika pemetaan kromosom pada genom yang kolinear mengacu pada karakter yang sama pada daerah kromosom yang sama, maka kemungkinan besar karakter tersebut dikendalikan oleh alel yang berbeda dari suatu gen yang sama. Hal ini mungkin terjadi pada padi dan anggota dari Triticeae, seperti gandum, barley dan rye.

Dalam upaya mengisolasi gen *Alt₃* pada rye, Miftahudin et al. (2005) telah menggunakan pendekatan hubungan mikrosinteni antara rye dan padi pada daerah lokus *Alt₃* yang diapit oleh dua marka molekular yang masing-masing terpaut 0.4 cM dari lokus *Alt₃*. Kedua marka ini selain digunakan untuk mengembangkan pemetaan beresolusi tinggi pada daerah lokus *Alt₃*, juga digunakan untuk menapis pustaka BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) dari padi. Hasil penelitian menunjukkan bahwasanya klon BAC padi yang berasal dari

kromosom 3 berukuran 160 kb memiliki kedua marka tersebut pada masing-masing ujungnya. Hal yang menarik adalah, marka BCD1230 yang berkosegregasi dengan locus *A/t3* juga terdapat di bagian tengah (pada posisi sekitar 85 kb) dari klon BAC tersebut. Hasil pemetaan beresolusi tinggi pada daerah lokus *A/t3* menunjukkan bahwa marka BCD1230 bersama-sama dengan marak P450 yang berasal dari klon BAC padi tersebut, merupakan marka molekular yang mengapit lokus *A/t3* dengan jarak masing-masing sejauh 0.05 cM dari locus *A/t3*. Diantara kedua marka tersebut terdapat dua marka molekular yang dikembangkan dari klon BAC padi tersebut dan berkosegregasi dengan lokus *A/t3* pada rye. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa terdapat hubungan kolinear yang cukup mantap antara rye dan padi pada daerah lokus *A/t3*. Berdasarkan hal ini maka diduga bahwa pada klon BAC padi yang dipelajari terdapat gen ortholog dari gen *A/t3* yang mungkin memiliki peran yang sama dalam mekanisme toleransi tanaman rye dan padi terhadap cekaman AI, terutama dalam mekanisme sekresi asam organik. Rencana penelitian yang diajukan ini bertujuan untuk mengidentifikasi gen-gen yang terdapat pada daerah tersebut yang berperan dalam mekanisme sekresi asam organik selama tanaman padi mendapat cekama AI disamping juga mengidentifikasi gen-gen yang terdapat pada kromosom lain.

Hasil analisis sekuen menunjukkan bahwa pada klon BAC ini terdapat 37 gen putatif, yang terdiri dari: 7 gen berperan dalam metabolisme secara umum, 15 gen hipotetik, 4 gen penyandi protein yang tidak diketahui, 4 gen penyandi protein membran dan protein transpor, 2 gen terlibat dalam scavenging intermediate oksigen reaktif hasil cekaman oksidatif, 1 gen terlibat dalam pertumbuhan tanpa auksin, 2 gen kinase/phosphatase yang dapat terlibat dalam proses transduksi signal, dan 2 gen menghasilkan protin pengikat DNA. Gen-gen tersebut berpotensi sebagai sumber gen toleransi AI karena beberapa hal.

Pertama, diantara 15 gen hipotetik, terdapat 3 gen yang menyandikan protein berdomain penta dan tetraticopeptid repeat (TPR). Pada umumnya, protein yang berdomain TPR berperan dalam interaksi protein-protein seperti faktor transkripsi, respon terhadap cekaman, protein transpor, dan penghambatan protein kinase (Lamb, 1995). Yang menarik adalah satu protein hipotetik yang gen penyandinya berkosegregasi dengan *A/t3* pada rye, selain memiliki domain

TPR, juga berdomain SET. Menurut Hunter (1998), protein berdomain SET memiliki fungsi sebagai aktivator atau represor proses transkripsi. Berdasarkan hal tersebut adalah hal yang mungkin gen-gen terinduksi ekspresinya oleh AI, menjadi aktivator dan represor dari gen lain dan berperan dalam mekanisme toleransi tanaman terhadap AI.

Kedua, empat gen di antara gen-gen tersebut adalah gen penyandi protein membran dan protein transpor. Gen-gen ini perlu untuk dianalisis dalam kaitannya dengan toleransi tanaman terhadap AI untuk mengetahui apakah gen tersebut berperan dalam sekresi asam organik selama cekaman AI.

Terakhir beberapa gen dari ke 37 gen dalam klon BAC menyandikan "unknown protein". Protein-protein tersebut dijumpai homolognya dalam database protein tetapi masih belum diketahui jenis proteinnya, sehingga memungkinkan bahwa protein-protein tersebut memiliki fungsi yang baru dalam sel. Oleh karena itu protein-protein tersebut perlu dianalisis dalam kaitannya dengan mekanisme sekresi asam organik sebagai salah satu mekanisme toleransi tanaman terhadap AI. Dengan mengintegrasikan posisi gen-gen tersebut pada peta genetik yang akan dikonstruksi dan data ekspresi dari gen-gen tersebut maka akan teridentifikasi kandidat gen toleransi AI, termasuk kemungkinan diperolehnya gen yang mengendalikan sekresi asam organik selama cekaman AI.

Studi pendahuluan yang dilakukan untuk mengetahui respon sekresi asam organik pada padi lokal Indonesia terhadap cekaman AI menunjukkan bahwa sekresi asam organik dari akar padi lokal varietas Krowal yang toleran AI meningkat sangat nyata pada kondisi tercekam AI, sedangkan pada varietas IR64 yang peka AI sekresi asam organik cenderung menurun. Hal ini menunjukkan bahwa mekanisme sekresi asam organik berperan dalam toleransi pada kultivar Krowal terhadap cekaman AI. Berdasarkan penelitian-penelitian sebelumnya maka penelitian yang diusulkan ini akan berusaha mengungkap mekanisme yang mengendalikan sekresi asam organik pada padi selama mendapat cekaman AI.

BAB III. PROSEDUR DAN METODOLOGI

3.1 Bahan Tanaman

Padi kultivar Hawarabunar (toleran Al) dan varietas IR64 (peka Al), tanaman F1 dan 400 tanaman populasi F2 hasil persilangan varietas IR64 dan Hawarabunar digunakan dalam studi ini.

3.2 Kultur Hara dan Analisis Root Re-growth

Teknik hidroponik sederhana digunakan untuk menumbuhkan kecambah kultivar padi gogo. Benih disterilisasi dan direndam dalam air destilata selama 24 jam, kemudian dikecambahkan selama 48 jam. Kecambah yang seragam panjang akarnya ditempatkan dalam skrin plastik yang diapungkan di atas larutan hara (Miftahudin et al., 2002) pada pH 4.0. Aluminium pada konsentrasi 15 ppm diberikan dalam bentuk $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Larutan hara diberi aerasi dan pH larutan hara dijaga pada pH 4.0. Percobaan dilakukan di dalam *growth chamber*. Parameter toleransi Al ditentukan berdasarkan nilai *root re-growth* seperti yang telah dilakukan oleh Miftahudin et al. (2005). Kecambah yang telah mendapat perlakuan Al selama 72 jam, ditumbuhkan kembali pada larutan hara yang tidak mengandung Al selama 48 jam. Pertambahan panjang akar diukur dan digunakan sebagai parameter toleransi Al.

3.3 Analisis Sekresi Asam Organik

Pengukuran sekresi asam organik dengan spektofotometer dilakukan terhadap larutan hara yang digunakan untuk menumbuhkan kecambah padi yang telah mendapat cekaman 15 ppm Al selama 72 jam. Pada pengukuran ini diukur jumlah malat yang disekresikan oleh kecambah yang dicekam Al. Hasil dari pengukuran ini akan merupakan data fenotipa untuk selanjutnya digunakan dalam analisis genetik untuk menentukan gen yang terlibat dalam pengendalian sekresi asam organik selama mendapat cekaman Al. Metode pengukuran asam organik mengikuti prosedur yang digunakan oleh Delhaize et al. (1993).

Sebanyak 1.35 ml media tumbuh tanaman yang telah diberi cekaman 15 ppm Al selama 24 jam diinkubasi dengan menggunakan larutan penyangga sebanyak 1.5 ml (hydrazine 0.4 M dan glycine 0.5 M, pH 9) dan 0.1 ml NAD 40 mM selama 30-60 menit kemudian campuran diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 340 nm untuk memperoleh nilai

absorban 1. Setelah itu semua campuran ditambah 5 μL Malate Dehidrogenase (5 mg/mL, Sigma, USA) dan diukur kembali untuk memperoleh nilai absorban 2. Selisih antara nilai absorban 2 dengan nilai absorban 1 menunjukkan banyaknya NADH yang dihasilkan dari reaksi tersebut dan nilai NADH ini setara dengan nilai asam malat yang terdapat dalam sampel. Pengukuran asam organik dilakukan pada media tumbuh dari tiap individu 300 tanaman F2, kedua tetua dan F1. Konversi banyaknya asam malat yang disekresikan oleh akar padi gogo dalam media tumbuh adalah sebagai berikut :

$$C = \frac{V \times M}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A$$

Ket : C = Konsentrasi asam malat (mg/l)

V = Volume Total (ml)

v = Volume sampel (ml)

M = BM asam malat (g/mol)

d = ketebalan kuvet (cm)

ϵ = koefisien absorpsi NADH pada λ 340 nm = 6.3 (l/mmol.cm)

ΔA = selisih absorban 1 dan 2

3.4 Isolasi DNA

Total DNA inti akan diisolasi dari jaringan daun dari tiap individu tanaman kedua tetua, F1 dan F2 berdasarkan metode CTAB (Saghai-Marof., 1984). Ke dalam tabung sentrifuge 15 ml yang berisi 300-400 mg tepung daun ditambahkan 9 ml penyangga ekstraksi CTAB (0.1 M Tris-7.5, 0.7 M NaCl, 0.01 M EDTA pH 8.0, 0.14 $\mu\text{-mercaptoethanol}$, dan 1% (w/v) CTAB). Campuran diinkubasi selama 90 menit pada suhu 65°C dalam oven sambil digoyang perlahan. Setelah inkubasi, campuran didinginkan selama 4 – 5 menit pada suhu ruang, kemudian ditambahkan 4.5 ml chloroform/octanol (24:1). Campuran digoyang perlahan selama 10 menit, kemudian disentrifuge pada kecepatan 2000 x g selama 10 menit pada suhu ruang. Supernatan dipindahkan ke tabung sentrifuge 15 ml yang baru, dan ke dalamnya ditambahkan 4.5 ml chloroform/octanol (24:1), kemudian digoyang perlahan, dan disentrifuge pada kecepatan 2000 x g selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung sentrifuge 15 ml yang baru dan ditambahkan

50 ul RNase A 10 mg/ml, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. DNA kemudian diendapkan dengan 6 ml isopropanol. Endapan DNA diambil dengan hook gelas terbuat dari pipet pastuer yang dipanaskan ujungnya, kemudian dimasukkan ke dalam tabung 5 ml yang berisi 1 ml penyanga TE (Tris-EDTA), dan biarkan sampai DNA terlarut. Untuk membersihkan DNA dari protein, larutan kemudian berturut-turut diekstrak dengan 1 ml phenol dan 1 ml chloroform/octanol (24:1). Selanjutnya DNA diendapkan lagi dengan menambahkan 50 ul NaCl 5 M dan 2.5 volume etanol absolut. Endapan DNA kemudian diambil dengan hook gelas dan dicuci berturut-turut dengan 5 ml WASH1 (etanol absolut, 0.2 M NaOAc) dan 1 ml WASH2 (etanol absolute, 0.01 M NH4OAc). DNA kemudian dilarutkan dalam 0.5 ml air atau penyanga TE.

3.5 Analisis PCR dari Marka Molekular

Primer-primer marka SSR yang telah ditapis pada tahun pertama penelitian ini akan digunakan dalam analisis marka molekular dari populasi F2. Primer-primer tersebut akan digunakan untuk mengamplifikasi DNA dari tiap tanaman padi dari 300 tanaman populasi F2. DNA padi (100 ng) akan digunakan sebagai template di dalam 50 ul reaksi PCR yang mengandung 100 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.3-0.5 uM tiap primer, dan 1 U Taq DNA polimerase (NEB, USA). Proses PCR dilakukan dengan menggunakan thermocycler dengan kondisi sebagai berikut: 5 menit suhu 94°C untuk 1 siklus diikuti dengan 94°C (35 detik), suhu annealing (35 detik), dan suhu 72°C (1 menit, 45 detik) sebanyak 35 siklus. Produk PCR dianalisis dengan elektroforesis superfine agarosa konsentrasi 2.5% sampai 3.0% pada penyanga 0.5 x TBE (Tris-Borate-EDTA).

3.6 Konstruksi Peta Genetik dan Analisis QTL

Hasil analisis marka molekular pada seluruh populasi F2 kemudian digunakan untuk mengkonstruksi peta genetik setiap kromosom. Analisis segregasi dari marka molekular akan dilakukan dengan menggunakan uji *Chi Square* pada $\alpha = 0.05$. Keterpautan antar marka molekular akan dianalisis menggunakan MAPMAKERS/EXP ver 3.0. Sedangkan asosiasi antara marka

molekular dan data fenotipa akan dievaluasi dengan menggunakan MAPMAKERS/QTL ver 1.1.

BAB IV. HASIL DAN PERMASALAHAN

4.1 Populasi F2 Hasil Silangan Padi var. IR64 x Hawarabunar

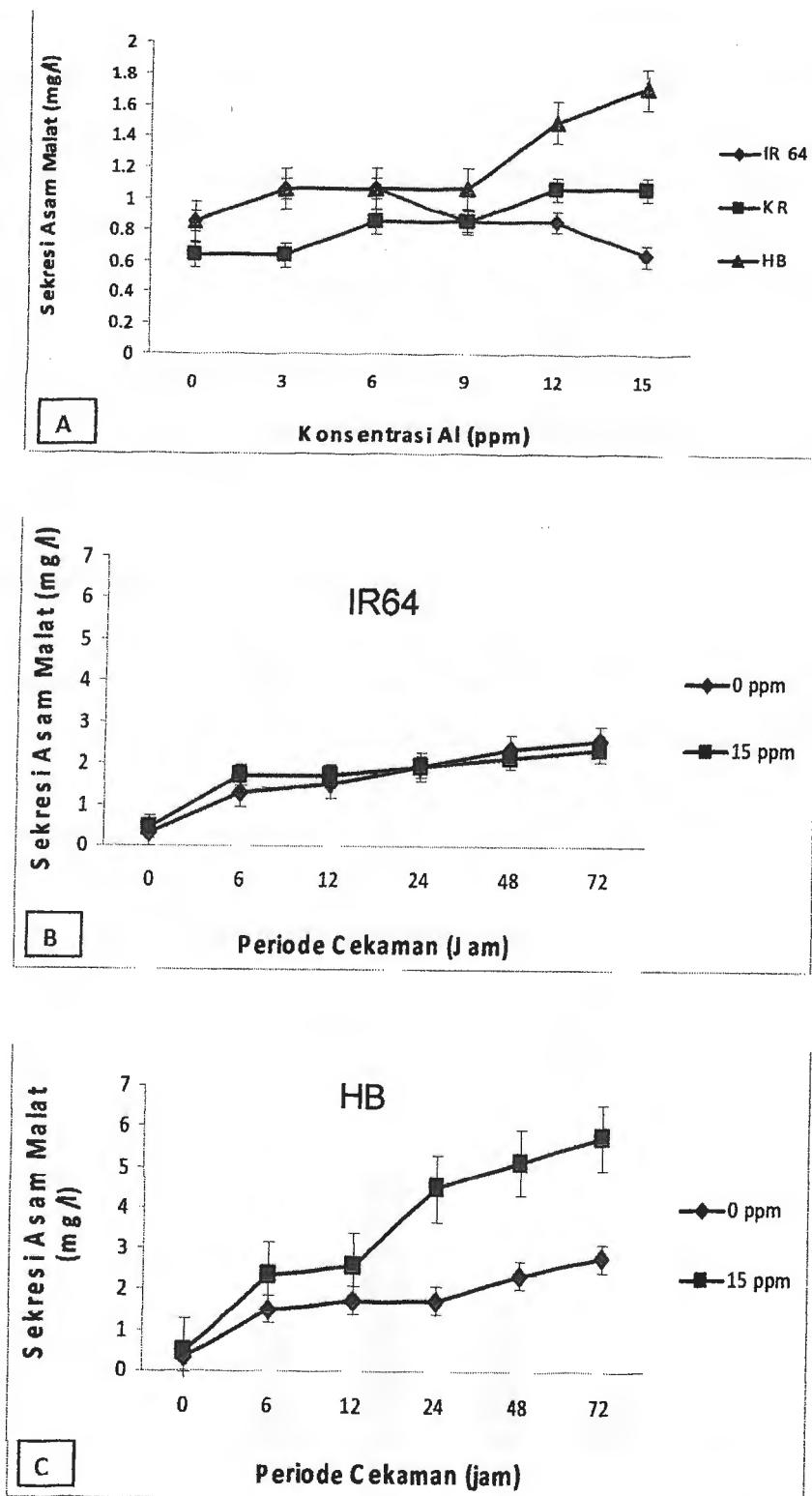
Populasi F2 yang digunakan dalam percobaan ini adalah hasil persilangan antara pada varietas IR64 yang peka AI dengan varietas Hawarabunar yang toleran AI. Padi varietas Hawarabunar adalah pada lokal Indonesia yang diharapkan dapat memberikan kontribusi sifat toleransi AI yang diinginkan. Karakter padi varietas Hawarabunar berbeda dengan IR64 dalam hal habitus, jumlah anakan, umur tanaman dan ketahanan terhadap cekaman abiotik. Hawarabunar memiliki habitus lebih tinggi, jumlah anakan sedikit (1-5 per rumpun), umur tanaman yang lebih panjang dan tahan terhadap cekaman AI, Fe dan kekeringan. Sifat ketahanan terhadap cekaman abiotik inilah yang diharapkan dapat diwariskan ke keturunannya sehingga dapat digunakan untuk perbaikan genetik padi dan perakitan varietas baru.

4.2 Kultur Hara dan Cekaman AI

Percobaan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah percobaan laboratorium dengan memanfaatkan teknik hidroponik sederhana. Dengan teknik ini perlakukan cekaman AI terhadap padi dilakukan dengan memberikan cekaman pada daerah perakaran. Kecambah umur lima hari dicekam dengan 15 ppm AI selama 72 jam dalam larutan hara pH 4 beraerasi, kemudian dipindahkan ke larutan hara yang tidak mengandung AI. Kemampuan tumbuh dari akar setelah mendapat cekaman dinamakan *root re-growth*, yang kemudian digunakan sebagai parameter toleransi AI. Hawarabunar memiliki nilai *root re-growth* lebih tinggi (2.8 cm) dibanding IR64 (1.3 cm). Berdasarkan kisaran nilai *root re-growth* dari masing-masing tetua, maka populasi F2 dapat dikelompokkan ke dalam individu peka dan toleran AI.

4.3 Analisis Sekresi Asam Malat

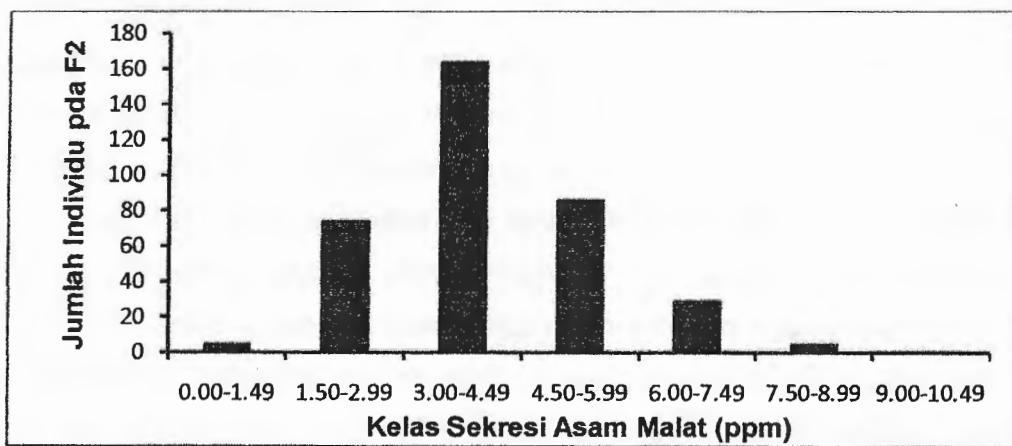
Analisis sekresi asam malat dilakukan terhadap larutan hara yang telah digunakan untuk menumbuhkan tanaman padi yang telah diberi cekaman AI selama 72 jam. Analisis ini dilakukan terhadap kedua tetua, F1 dan populasi F2. Hasil percobaan menunjukkan bahwa sekresi asam malat meningkat dengan meningkatnya tingkat cekaman AI dan periode cekaman (Gambar 1). Tingkat



Gambar 1. Sekresi asam malat dari akar padi yang mendapat berbagai tingkat cekaman Al (A) dan periode cekaman (B dan C).

cekaman 15 ppm AI telah dapat membedakan tingkat sekresi malat dari IR64 dan Hawarabunar. Pada tingkat cekaman ini percobaan dilanjutkan untuk mengetahui periode cekaman yang sesuai. Pada IR64, meskipun sekresi asam malat meningkat dengan meningkatnya periode cekaman, tetapi sekresi asam malat pada perlakuan 0 dan 15 ppm AI tidak berbeda sepanjang periode cekaman sampai 72 jam. Pada Hawarabunar, fenomena sekresi malat yang meningkat dengan lamanya periode cekaman diikuti oleh peningkatan yang signifikan pada tanaman yang mendapat cekaman 15 ppm. Perbedaan sekresi asam malat antara 0 dan 15 ppm AI sangat nyata terlihat ketika tanaman mendapat cekaman 72 jam. Perlakuan cekaman 15 ppm AI selama 72 jam kemudian digunakan untuk memberikan perlakuan cekaman AI pada tetua, F1 dan F2. Hasil percobaan menunjukkan bahwa rata-rata sekresi asam malat dari IR64, Hawarabunar, F1 dan populasi F2 berturut-turut sebesar 2.2, 3.8, 3.1, dan 4.1 ppm.

Analisis distribusi sekresi asam malat dari 400 individu tanaman F2 menunjukkan pola distribusi normal (Gambar 2). Hal ini mengindikasikan bahwa karakter sekresi asam malat merupakan karakter kuantitatif yang dikendalikan secara multigenik. Dari Gambar 2 terlihat bahwa kurva distribusi agak miring ke kanan dimana selang kelas sekresi melebihi dari nilai rata-rata tetua toleran AI. Hal ini menunjukkan adanya *transgresive segregation* di dalam populasi tersebut. Dari nilai rataan sekresi malat pada populasi F2 juga terlihat bahwa nilai rataan tersebut lebih tinggi dari nilai rataan tingkat sekresi malat pada Hawarbunar.



Gambar 2. Pola distribusi sekresi asam malat pada populasi F2

Apabila pengelasan sekresi asam malat didasarkan atas dua kelas sekresi yang berdasarkan nilai kisaran sekresi pada masing-masing tetua, maka sekresi asam malat pada populasi F2 mengikuti pola pewarisan monogenik. Untuk individu tanaman dengan tingkat sekresi < 3.0 ppm digolongkan ke dalam kelas IR64 atau peka AI, sedangkan individu dengan tingkat sekresi ≥ 3.0 ppm digolongkan ke dalam kelas heterozigot atau Hawarbunar atau toleran AI. Hasil pengelasan dan uji Chi square disajikan pada Tabel 1. Hasil analisis Chi test menunjukkan bahwa karakter ini dikendalikan secara monogenik.

Tabel 1. Chi square test untuk pola pewarisan monogenik dari karakter sekresi asam malat.

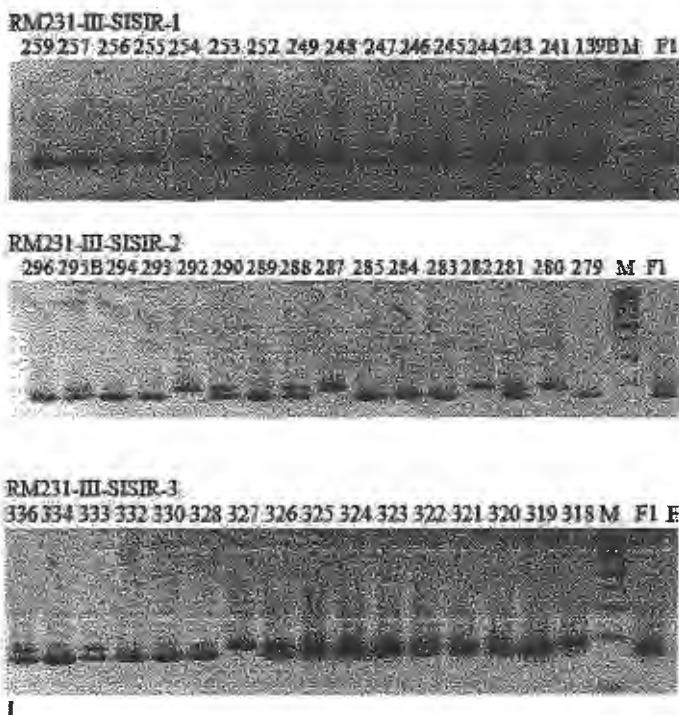
Kelas Sekresi Malat (ppm)	Nilai Pengamatan	Nilai Harapan (3:1)	Nilai Chi test
< 3.0	79	91	0.15
≥ 3.0	285	273	

4.4 Isolasi DNA dan Analisis PCR Marka Molekular

Sebanyak 400 individu tanaman F2 yang telah mendapat cekaman AI kemudian ditanam di rumah kaca (Lampiran 1). Ada dua tujuan penanaman ini. Pertama, pada umur satu bulan, tanaman akan diambil daunnya kemudian digunakan untuk isolasi DNA, dan kedua, generasi F2 akan diperpanjang untuk mendapatkan generasi F3 pada akhir percobaan. Selanjutnya generasi F3 ini akan terus diperpanjang dengan metode *single seed descent* sampai F7 untuk mendapatkan populasi *recombinant inbred lines* (RIL).

Isolasi DNA telah dilakukan dari tiap individu populasi F2. DNA tersebut telah digunakan dalam analisis marka molekular. Sebanyak 44 marka molekular yang polimorf antar kedua tetua telah digunakan untuk mengamplifikasi DNA dari 379 individu F2. Sebanyak kurang lebih 20.000 reaksi PCR telah dilakukan dan 41 primer memberikan hasil positif. Hasil analisis PCR divisualisasi dengan elektroforesis pada gel agarose 3%. Visualisasi berupa pita-pita DNA (contoh pada Gambar 3), yang kemudian dilakukan skoring untuk kemudian digunakan

dalam analisis data. Skoring pita SSR mengikuti aturan berikut: pita yang sesuai dengan IR64 mendapat skor A, pita yang sama dengan Hawarabun mendapat skor B, sedangkan yang memiliki keduanya, atau hetrozigt mendapat skor H. Hasil skoring pita-pita DNA untuk setiap marker SSR disajikan pada Lampiran 2.



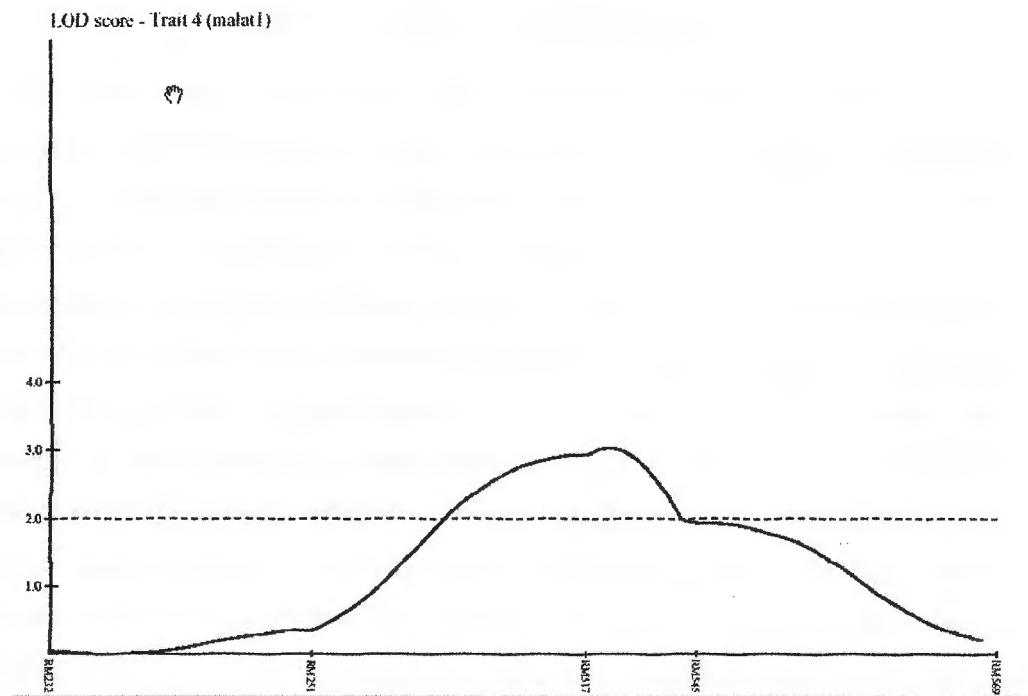
Gambar 3 Contoh elektroforegram hasil analisis PCR marka molekular SSR yang divisualisasi pada gen superfine agarose 3% dalam buffer 1 x TBE.

4.5 Analisis Faktor Genetik dari Karakter Sekresi Asam Malat

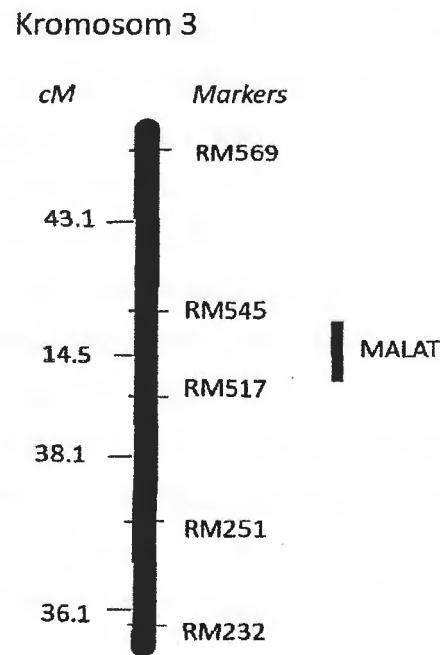
Berdasarkan data skoring pita-pita SSR dari semua marka kemudian dilakukan pengujian keterpautan antar marka dan keberadaan QTL atau lokus penyandi karakter sekresi asam malat dengan menggunakan software MAPMAKER/EXP ver. 3 dan MAPMAKER/QTL ver.1.1. Hasil analisis menunjukkan bahwa marka-marka SSR dari tiap kromosom tidak mengelompok dalam tiap kromosom, tetapi terfragmentasi menjadi dua grup dalam tiap kromosomnya. Hal ini mungkin disebabkan oleh (1) skoring pita-pita yang belum sempurna karena jarang yang sangat dekat antar dua pita polimorf. Hal ini karena pemisahan pita dengan superfine gel agarose mungkin belum sempurna

atau selisih ukuran dari dua pita polimorf memang sangat kecil, sehingga menyulitkan untuk dilakukan scoring. Dengan bantuan komputer, hal ini akan dapat diatasi meskipun harus memerlukan waktu yang relatif lama. (2) Jumlah marka molekular yang digunakan masih terlalu sedikit. Rata-rata per kromosom hanya 11 sampai 12 marka yang mencakup seluruh panjang kromosom. Dengan maksimum jarak linkage 50 cM, maka hasil analisis marka-marka di dua lengan berbeda berada pada kelompok pautan yang berbeda. Hal ini bisa diatasi apabila ditambah marka-marka molekular untuk meningkatkan kerapatan marka dalam satu kromosom.

Analisis keberadaan faktor genetik yang mengendalikan karakter sekresi asam malat dilakukan dengan dua cara. Pertama, karakter sekresi asam malat diperlakukan sebagai karakter poligenik berdasarkan pola distribusi normal pada populasi F₂, dan kedua, karakter sekresi asam malat diperlakukan sebagai karakter yang diwariskan secara monogenik. Hasil analisis menunjukkan bahwa dari ketiga kromosom yang dianalisis, hanya kromosom 3 yang memiliki peluang untuk ditemukannya lokus penyandi karakter sekresi asam malat. Analisis QTL berdasarkan karakter poligenik menunjukkan indikasi keberadaan QTL pada daerah lengan pendek kromosom 3 di daerah marka molekular RM545 dan RM517. Akan tetapi nilai LOD pada daerah ini maksimum hanya 0.98 (Lampiran 3). Dengan nilai LOD ambang batas 3.0, maka belum dapat dikatakan bahwa ada QTL di daerah yang marka tersebut. Apabila analisis dilakukan berdasarkan karakter monogenik, maka Lokus pengendali sekresi malat pada daerah ini nampak dengan nilai LOD 3.02 (Gambar 4 dan Lampiran 4). Peta genetik dari kromosom 3 lengan pendek yang memiliki lokus sekresi asam malat pada penelitian ini mengandung marka molekular RM569, RM545, RM517, RM251 dan RM232 dengan total jarak peta 131.8 cM. Lokus sekresi asam malat terletak antara marka RM545 dan RM517, yaitu pada posisi 4 cM dari marka RM517 ke arah marka RM545. Gambar peta genetik kromosom 3 lengan pendek dengan posisi lokus sekresi asam malat disajikan pada Gambar 5. Hasil analisis ini memiliki kemiripan dengan hasil penelitian Nguyen et al (2001) yang menemukan posisi QTL pada lengan pendek kromosom 3 padi, akan tetapi dengan lokasi yang sedikit berbeda. Hal ini dimungkinkan karena background populasi yang digunakan berbeda.



Gambar 4. Kurva LOD dalam penentuan lokasi Lokus penyandi sekresi asam malat pada popualsi F2 silangan IR64 x Hawarabunar.



Gambar 5. Peta genetik kromosom 3 lengan pendek dan posisi lokus sekresi asam malat

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

Penelitian pada tahun kedua dari Program Insentif Riset Dasar ini telah menghasilkan informasi yang sangat berguna dalam memahami mekanisme toleransi tanaman padi terhadap cekaman AI. Padi mensekresikan asam malat sebagai salah satu mekanisme toleransi terhadap cekaman AI. Padi toleran AI mengsekresikan malat lebih banyak dari padi peka AI. Karakter sekresi asam malat pada padi merupakan karakter poligenik, tetapi ada gen tunggal yang berperan utama dalam pengendaliannya. Lokus dari gen tersebut berada pada kromosom 3 pada lengan pendek dengan posisi sekitar 4 cM dari marka molekular RM517 ke arah RM545. Kedua marka tersebut selanjutnya dapat digunakan dalam beberapa kegiatan yang mengarah kepada perbaikan genetik dari varietas padi menuju perakitan varietas toleran AI. Pertama, marka tersebut dapat digunakan untuk mencari informasi gen-gen pada database padi, sehingga dapat diketahui gen-gen apa saja yang berada diantara kedua marka tersebut, yang selanjutnya dapat digunakan dalam analisis ekspresi dan keterlibata gen-gen tersebut dalam toleransi AI pada padi. Gen-gen tersebut selanjutnya diklon dan digunakan dalam pembentukan tanaman transgenik toleran AI. Kedua, kedua marka tersebut dapat digunakan dalam program pemuliaan melalui pendekatan *marker assisted selection* seperti *marker assisted backcrossing* (MAB). Apabila kita telah memiliki populasi BC2F1 dari hasil silang balik IR64 dengan F1 persilangan IR64 dan Hawarabunar, maka kegiatan MAB dapat dilakukan untuk mendapatkan galur padi toleran AI secara cepat. Dengan dua generasi silang balik, pendekatan MAB dapat menghasilkan galur murni toleran AI.

Penelitian ini akan dilanjutkan pada tahun ketiga dengan tujuan untuk melakukan transformasi gen-gen yang ada di daerah Lokus sekresi asam malat dan kromosom 3 lengan pendek. Hasil penelitian diharapkan akan memberikan informasi berharga tentang kemampuan gen-gen tersebut dalam meningkatkan sifat toleransi padi terhadap cekaman AI, sehingga tanaman transgenik yang dihasilkan dapat digunakan dalam upaya perbaikan varietas padi menuju perakitan varietas toleran AI.

DAFTAR PUSTAKA

- Aniol A (1991) Genetics of acid tolerant plant. In Wright RJ, Baligar VC, Murmann RP (eds) Plant-Soil Interactions at Low pH. Kluwer Acad Publ, Dordrecht, pp.1007-10017
- Aniol A, Gustafson JP (1984) Chromosome location of genes controlling aluminum tolerance in wheat, rye, and triticale. Can J Genet Cytol 26:701-705
- Aniol A, Gustafson JP (1990) Genetics of aluminum tolerance in agronomic plants. In Shaw AJ (ed) Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp.255-267
- Berzonsky WA (1992) The genomic inheritance of aluminum tolerance in 'Atlas 66' wheat. Genome 35:689-693
- Blamey FPC, Asher CJ, Kerven GL, Edwards DG (1993) Factors affecting aluminum sorption by calcium pectate. Plant and Soil 149:87-94
- Blancaflor EB, Jones DL, Gilroy S (1998) Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. Plant Physiol 118:159-172
- Delhaize E, Ryan PR (1995) Aluminum toxicity and tolerance in plants. Plant Physiol 107:315-321
- Delhaize E, Craig S, Beaton CD, Bennet RJ, Jagadish VC, Randall P (1993a) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. Plant Physiol 103:685-693
- Delhaize E, Ryan PR, Randall PJ (1993b) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. Plant Physiol 103:695-702
- Ezaki B, Gardner RC, Ezaki Y, Matsumoto H (2000) Expression of aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. Plant Physiol 122:657-665
- Foy CD, Lafever HN, Schwartz JW, Fleming AL (1974) Aluminum tolerance of wheat cultivars related to region of origin. Agron J 66:751-758
- Gallego FJ, Benito C (1997) Genetic control of aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L.) Theor Appl genet 95:393-399
- Haug A, Shi B, Vitorello V (1994) Aluminum interaction with phosphoinositide-associated signal transduction. Arch Toxicol 68:1-7
- Horst WJ (1995) The role of the apoplast in aluminium toxicity and resistance of higher plants: A review. Z. Pflanzenernähr Bodenkd 158:419-428

- Huang JW, Grunes DL, Kochian LV (1992a) Aluminum effects on the kinetics of calcium uptake into cells of the wheat root apex. Quantification of calcium fluxes using a calcium-selective vibrating microelectrode. *Planta* 188:414-421
- Huang JW, Shaff JE, Grunes DL, Kochian LV (1992b) Aluminum effects on calcium fluxes at the root apex of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat cultivars. *Plant Physiol* 98:230-237
- Hunter T (1998) Anti-phosphatases take the stage. *Nature Genet* 18:303-305
- JagauY (2000) Fisiologi dan pewarisan efisiensi nitrogen dalam keadaan cekaman aluminium pada padi gogo (*Oryza sativa L.*) Disertasi. Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor
- Kim BY, Baier AC, Somers DJ, Gustafson JP (2001) Aluminum tolerance in triticale, wheat, and rice. *Euphytica* 120:329-337
- Kinraide TB (1988) Proton extrusion by wheat roots exhibiting severe aluminum toxicity symptoms. *Plant Physiol* 88:418-423
- Kochian LV (1995) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46: 237-260
- Lamb JR (1995) Tetrasrico peptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *TIBS* 20:257-259
- Lazof DB, Goldsmith JG, Rufty TW, Linton RW (1994) Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips. A microanalytical study using secondary ion mass spectrometry. *Plant Physiol* 106:1107-1114
- Li XF, Ma JF, Matsumoto H (2002) Aluminum-induced secretion of both citrate and malate in rye. *Plant and Soil* 242:235-243
- Luo MC, Dvorak J (1996) Molecular mapping of an aluminum tolerance locus on chromosome 4D of Chinese Spring wheat. *Euphytica* 91:31-35
- Ma JF, Hiradate S, Matsumoto H (1998) High aluminum resistance in buckwheat. II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. *Plant Physiol* 117:753-759
- Matsumoto H (1991) Biochemical mechanism of the toxicity of aluminium and the sequestration of aluminum in plant cells. In: Wright RJ, Baligar VC, Murmann RP (eds) *Plant-Soil Interactions at Low pH*. Kluwer Acad Publ, The Netherlands, pp.825-838
- Matsumoto, H (2000) Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *Intl Rev Cytol* 200:1-46

- Miftahudin, Scoles GJ, Gustafson JP (2002) AFLP markers tightly linked to the aluminum-tolerance gene *Alt3* in rye (*Secale cereale* L.). *Theor Appl Genet* 104:626-631
- Miftahudin, Scoles GJ, Gustafson JP (2004) Development of PCR-based codominant markers flanking the *Alt3* gene in rye. *Genome* 47:231-238
- Miftahudin, Chikmawati T, Scoles GJ, Gustafson JP (2005) Targeting aluminum tolerance gene *Alt3* using rye/rice microcolinearity. *Theor. Appl. Genet.* 110:906-913
- Minella E, Sorrells ME (1997) Inheritance and chromosome location of *A/p*, a gene controlling aluminum tolerance in 'Dayton' barley. *Plant Breeding* 116:465-469
- Miyasaka SC, Kochian LV, Shaff JE, Foy CD (1989) Mechanisms of aluminum tolerance in wheat. An investigation of genotypic differences in rhizosphere pH, K⁺ and H⁺ transport, and root-cell membrane potentials. *Plant Physiol.* 91:1188-1196
- Nguyen VT, Burow MD, Nguyen HT, Le BT, Le TD, Peterson AH (2001) Molecular mapping of genes conferring aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 102:1002-1010
- Nguyen VT, Nguyen BD, Sarkarung S, Martinez C, Peterson AH, Nguyen HT (2002) Mapping of genes controlling aluminum tolerance in rice: comparison of different genetic background. *Mol Genet Genomics* 267:772-780
- Nguyen BD, Brar DS, Bui BC, Nguyen VT, Pham LN, Nguyen HT (2003) Identification and mapping of the QTL for aluminum tolerance introgressed from the new source, *Oryza rufipogon* Griff, into indica rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 106:583-593
- Pellet DM, Grunes DL, Kochian LV (1995) Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L). *Plant* 196:788-795
- Piñeros MA, Kochian LV (2001) A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of Al³⁺-induced anion channels. *Plant Physiol* 125:292-305
- Richards KD, Schott EJ, Sharma YK, Davis KR, Gardner RC (1998) Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 116:409-418
- Riede CR, Anderson JA (1996) Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. *Crop Sci* 36:905-909

- Rodriguez Milla MA, Gustafson JP (2001) Genetic and physical characterization of chromosome 4DL in wheat. *Genome* 44:883-892
- Ryan PR, Delhaize E, Randall PJ (1995) Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta* 196:103-110
- Ryan PR, Ditomaso JM, Kochian LV (1993) Aluminum toxicity in roots: An investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *J. Exp Bot* 44:437-446
- Saghai-Marof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:8014-8018
- Sibov ST, Gaspar M, Silva MJ, Ottoboni LMM, Arruda P, Souza AP (1999) Two genes control aluminum tolerance in maize: genetic and molecular mapping analyses. *Genome* 42:475-482
- Sudjadi M (1984) Problem Soil in Indonesia and Their Management. pp 58-73. In L. Pricharda et al. (ed) *Ecology and Management of Problem Soils in Asia*. Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region. Taipeh.
- Tang Y, Sorrells ME, Kochian LV, Garvin DF (2000) Identification of RFLP markers linked to the barley aluminum tolerance gene *Alp*. *Crop Sci* 40:778-782
- Taylor GJ (1991) Current views of the aluminum stress response: The physiological basis of tolerance. *Curr Topics Plant Biochem Physiol* 10:57-93
- Wu P, Liao CY, Hu B, Yi KK, Jin WZ, Ni JJ, He C (2000) QTLs and epistasis for aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) at different seedling stages. *Theor Appl Genet* 100:1295-1303