

EFIKASI TANAMAN PADI TRANSGENIK MENGANDUNG GEN *entC* DAN *pmsB* TERHADAP PENYAKIT TUNGRO

Efficacy of Transgenic Rice Containing *entC* and *pmsB* Genes Against Tungro Disease

Agus Rachmat^{1*}, Anky Zannati¹, Satya nugroho¹, Ifa Manzila²

¹Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia

²Balai Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi & Sumberdaya Genetik Pertanian

*Penulis untuk korespondensi: guess_btk@yahoo.com

ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) is the major staple crop in Indonesia and in many other developing countries in the world. Increased production of rice often fail due to the constraints of biotic and abiotic. Severe losses of rice yield caused by *Rice tungro disease* (RTD) induced by mixed infection of *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV) and *Rice tungro spherical virus* (RTSV). Tungro virus cannot spread itself either through seed or mechanically, its distribution is highly depend on the insects. The Rod-shaped particles were transmitted by *Nephotettix virescens* (Dist.), the usual vector, but the spherical-shaped particles were transmitted by the leafhopper only when Rod-shaped particles had been acquired previously or at the same time. The aims of this study is determine the resistance properties of rice plants containing the *entC* gene and *pmsB* coding of salicylic acid against tungro disease. The research consist of 3 steps, 1) Acquisition feeding, 2) inoculation feeding, 3) observation of test plant response to tungro disease. Eight homozygous lines were tested bioassay for Tungro disease resistance. Which lines pAR_SA3 and pAR_SA6 showed resistant to Tungro disease, while 2 lines showed moderate resistant.

Keywords: *entC* and *pmsB* gene, rice, salicylic acid, tungro disease

ABSTRAK

Beras (*Oryza sativa* L.) merupakan salah satu bahan pokok untuk kebutuhan pangan bagi masyarakat Indonesia pada umumnya. Produksi beras perlu terus ditingkatkan untuk mengimbangi laju pertumbuhan penduduk. Upaya Peningkatan beras terkendala oleh beberapa faktor biotik dan abiotik, salah satu faktor biotik adalah penyakit tungro yang dapat menyebabkan berkurangnya produktivitas tanaman padi. Penyakit tungro merupakan penyakit yang disebabkan oleh dua bentuk partikel virus, yaitu virus tungro bentuk batang (*Rice Tungro Bacilliform Virus*, RTBV) dan virus tungro bentuk bola *Rice Tungro Spherical Virus*, RTSV). Virus tungro tidak dapat menyebar sendiri baik melalui biji ataupun secara mekanik, penyebarannya sangat tergantung kepada serangga yang dapat menularkannya yaitu wereng hijau *Nephotettix virescens* Distant. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sifat resistensi tanaman padi yang mengandung gen *entC* dan *pmsB* penyandi asam salisilat terhadap penyakit tungro. Penelitian yang dilakukan meliputi 3 tahapan, yaitu 1) *Acquisition feeding*, 2) *inoculation feeding*, 3) pengamatan respon tanaman uji terhadap

penyakit tungro. Dari hasil bioasai terhadap 8 galur padi transgenik yang diuji terdapat 2 galur tahan yaitu galur pAR_SA3 and pAR_SA6 dan 2 galur agak tahan yaitu galur pAR_SA4 dan pAR_SA5.

Kata kunci: asam salisilat, gen *entC* dan *pmsB*, padi, tungro

PENDAHULUAN

Padi merupakan tanaman pangan utama di Indonesia yang memberi sumbangan besar bagi penyediaan pangan nasional. Kebutuhan akan beras semakin lama semakin meningkat seiring dengan terus bertambahnya jumlah penduduk. Oleh karena itu, produksi beras harus terus menerus ditingkatkan, namun peningkatan produksi beras terkendala oleh beberapa faktor biotik, salah satu diantaranya adalah penyakit tungro yang menyerang tanaman padi.

Penyakit tungro disebabkan oleh infeksi ganda dari dua virus yang berbeda yaitu *Rice tungro bacilliform badnavirus* (RTBV) dan *Rice tungro spherical waikavirus* (RTSV) yang ditularkan terutama oleh wereng hijau *Nephotettix virescens* secara semipersisten. Gejala utama pada tanaman yang terinfeksi virus tungro adalah perubahan warna daun menjadi kuning-oranye, kerdil, dan penurunan jumlah anakan. Periode akuisisi selama 15-30 menit, dan periode inokulasi selama 30 menit. Masa retensi virus pada serangga vektor berkisar antara 3-6 hari dan oleh karena itu serangga vektor bisa menularkan virus lagi apabila kembali menghisap tanaman sehat lainnya. Serangan penyakit tungro menyebabkan terjadinya kerusakan permanen, sehingga mengakibatkan penurunan kualitas maupun kuantitas produksi (Suzuki *et al.*, 1992).

Pengendalian penyakit tungro selama ini adalah menggunakan insektisida untuk mengendalikan wereng hijau sebagai vektornya. Tetapi penggunaan insektisida yang terus menerus dan kurang bijak akan menimbulkan dampak negatif terhadap lingkungan. Alternatif pengendalian lainnya untuk mengatasi serangan virus tungro adalah dengan menggunakan varietas tahan. Penggunaan varietas tahan ini adalah cara pengendalian penyakit tumbuhan yang sangat murah, mudah, dan aman. Penanaman varietas tahan tidak hanya mengurangi kerugian oleh penyakit tetapi juga mengurangi biaya penggunaan insektisida, menghindari kontaminasi lingkungan oleh bahan kimia beracun. Perakitan peningkatan ketahanan tanaman terhadap penyakit perlu diupayakan, salah satu cara merakit tanaman dengan overekspresi gen penyandi asam salisilat ke dalam tanaman.

Introduksi gen asal bakteri memerlukan ketersediaan sinyal peptida yang mengarahkan ekspresi gen pada kompartemen tertentu pada sel. Sinyal peptida adalah penting untuk mengontrol ekspresi gen *ICS* (*isochorismate synthase*). *ICS1 A. thaliana* memiliki sinyal peptida (Wildermuth *et al.*, 2001). Penggunaan sinyal peptida dengan target ekspresi pada kloroplas di tembakau transgenik mampu meningkatkan kandungan asam salisilat (Verberne *et al.*, 2000).

Kandungan SA padi berperan dalam mekanisme pertahanan terhadap cekaman biotik. Padi memperlihatkan kandungan SA yang lebih tinggi dibandingkan *Arabidopsis thaliana* dan tembakau. Padi mampu mempertahankan kandungan SA bebas yang cukup tinggi. Walaupun demikian, glukosil transferase padi terinduksi oleh pemberian SA dari luar. Aplikasi SA dan bakteri penghasil SA dari luar mampu meningkatkan sistem pertahanan terhadap serangan *Magnaporthe grisea* (Manandhar *et al.*, 1998) dan *Rhizoctonia solani* (Saikia *et*

al., 2006). Kandungan SA dan enzim yang mengkonversi SA memiliki lokasi yang berbeda (Silverman *et al.*, 1995). Ini menimbulkan spekulasi bahwa gen pertahanan yang dependen SA akan terinduksi apabila SA dihasilkan menyerupai pemberian SA dari luar.

BAHAN DAN METODE

Percobaan dilakukan di Laboratorium Genomik dan Perbaikan Mutu Tanaman Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI dan laboratorium virologi dan rumah kaca Balai Besar Penelitian dan pengembangan Bioteknologi dan sumberdaya Genetik Pertanian. Bahan tanaman yang digunakan adalah 8 galur padi transgenik dari Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI.

Isolasi DNA Genom Tanaman

Isolasi DNA genom tanaman dilakukan mengikuti metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) yang dimodifikasi. Daun padi sebanyak lebih kurang 0.5 g digerus dengan bantuan nitrogen cair. Setelah itu serbuk dimasukkan ke dalam tabung mikro (Axygen) 2 mL kemudian ditambah 1000 µL bufer ekstraksi CTAB. Campuran diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 65 °C selama 15 menit. Selama inkubasi campuran dibolak-balik setiap 5 menit sekali agar homogen. Campuran ditambah dengan 100 µL Na-asetat dan 900 µL kloroform isoamilalkohol (24:1) (Merck) ke dalam tabung mikro (Axygen), kemudian dikocok hingga merata. Suspensi selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4 °C selama 5 menit. Lapisan paling atas dipindah ke tabung mikro (Axygen) baru sebanyak 350 µL kemudian ditambahkan 35 µL Na-Asetat dan 256.6 µL isopropanol (Merck) (2/3 volume supernatan) dicampur perlahan. Campuran disentrifugasi pada kecepatan 12,000 rpm suhu 4 °C selama 5 menit, kemudian supernatan dibuang. Endapan yang diperoleh ditambah dengan 200 µL etanol (Merck) 70%. Campuran disentrifugasi kembali selama 5 menit pada kecepatan 12 000 rpm suhu 4 °C. Endapan selanjutnya dikeringkan di dalam oven (Heraeus) selama 10 menit. Endapan yang telah kering dilarutkan dalam larutan TE (*Tris base-Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*) yang mengandung RNase (Invitrogen) sebanyak 50 µL dan diinkubasi (VWR Scientific) pada suhu 37 °C selama 30 menit.

Analisis Integrasi Gen

Analisis PCR dilakukan untuk konfirmasi keberadaan gen sisipan pada tanaman generasi keempat (T3). Konfirmasi berdasarkan keberadaan gen *entC* dan *pmsB* DNA tanaman diisolasi dari tanaman kontrol dan kandidat tanaman transgenik. Metode isolasi DNA menggunakan CTAB (*hexaacyl trimethyl ammonium bromide*). Primer yang digunakan ialah *pmsB_Forward* 5'ATGCTGCCGCTAAAACCGCCACAA 3' *pmsB_Reverse* 5'TGACTTG GCCTGCGCCGAG TACGT-3'. Amplifikasi DNA dengan ukuran 492 pb dilakukan menggunakan alat PCR *Thermal Gradient* (Biometra) pada kondisi PCR sebagai berikut: satu siklus denaturasi (95 °C, 3 menit); 35 siklus amplifikasi (denaturasi 95 °C 1 menit, *annealing* 65 °C 1 menit, sintesis 72 °C 1 menit); 72 °C 10 menit (pemanjangan final); 4 °C (penyimpanan).

Elektroforesis

Elektroforesis hasil PCR dilakukan pada 1% gel agarose (Sigma). Volume DNA hasil PCR yang dimasukkan ke dalam sumur gel agarose sebanyak 10 μ L ditambah dengan 2 μ L *loading dye*. Gel elektroforesis dijalankan pada 100 V selama 35 menit (Biorad). Gel direndam dengan Ethidium Bromida (Merck) (0.5 mg^{-1}) selama 5 menit kemudian direndam di air selama 5 menit. Pita-pita DNA hasil elektroforesis divisualisasi dengan perangkat Gel Doc System.

Bioasai terhadap Tungro

Wereng hijau diperbanyak pada tanaman padi (TN1) sehingga popuasi wereng cukup untuk digunakan pada saat infeksi ke tanaman uji.

Evaluasi Ketahanan 8 Galur Padi

Evaluasi ketahanan sejumlah galur padi terhadap penyakit tungro dilakukan di rumah kaca. Kegiatan yang dilakukan meliputi 3 tahapan, yaitu 1) *Acquisition feeding*, 2) *inoculation feeding*, 3) pengamatan respon tanaman uji terhadap penyakit tungro.

1. *Acquisition feeding*

Acquisition feeding atau makan akuisisi dilakukan dengan menginfestasikan beberapa serangga vektor wereng hijau pada tanaman yang positif terinfeksi tungro. Tanaman tersebut adalah tanaman sumber inokulum. Infestasi wereng hijau pada tanaman sumber inokulum berlangsung selama 24 jam.

2. *Inoculation feeding*

Inoculation feeding atau makan inokulasi dilakukan dengan memindahkan wereng hijau yang telah diinfestasikan pada tanaman sumber inokulum selama 24 jam ke tanaman uji (8 galur padi hibrida) dengan waktu yang sama yaitu 24 jam. Masing-masing tanaman uji diinfestasikan wereng hijau sebanyak 2 ekor selama 1 hari. Kemudian wereng hijau dipindahkan dari tanaman uji ke tanaman sumber inokulum untuk digunakan selanjutnya (Gambar 2) atau disemprot dengan insektisida. Galur galur ditanam mengikuti desain pengujian *International Rice Testing Nursery* (IRTN). Setiap galur yang diuji ditanam dalam dua baris. Setiap baris terdiri dari 10 bibit, kemudian diantaranya ditanam tanaman yang sama sebagai kontrol tahan dan kontrol rentan.

3. Pengamatan

Pengamatan ketahanan tungro dilakukan dua kali, yaitu pada umur dua dan tiga minggu setelah inokulasi. Pengamatan insiden penyakit tungro dilakukan pada semua rumpun tanaman, sedangkan tingkat keparahan penyakit dievaluasi menggunakan *Standard Evaluation System for Rice* (SES) (IRRI, 1996) dengan skor sebagai berikut (Tabel 1).

Tabel 1. Skala keparahan penyakit tungro (IRRI, 1996)

Skala	Gejala
1	0% tidak ada kerusakan
3	1-10% Pemendekan dengan daun tidak kuning
5	11-30% pemendekan dengan daun tidak kuning
7	31-50% pemendekan dengan daun kuning
9	>50% pemendekan dengan daun kuning

Berdasarkan skala keparahan penyakit tersebut kemudian dihitung indeks penyakit tungro dengan rumus sebagai berikut :

$$SI = \frac{\sum (ni \times zi)}{N}$$

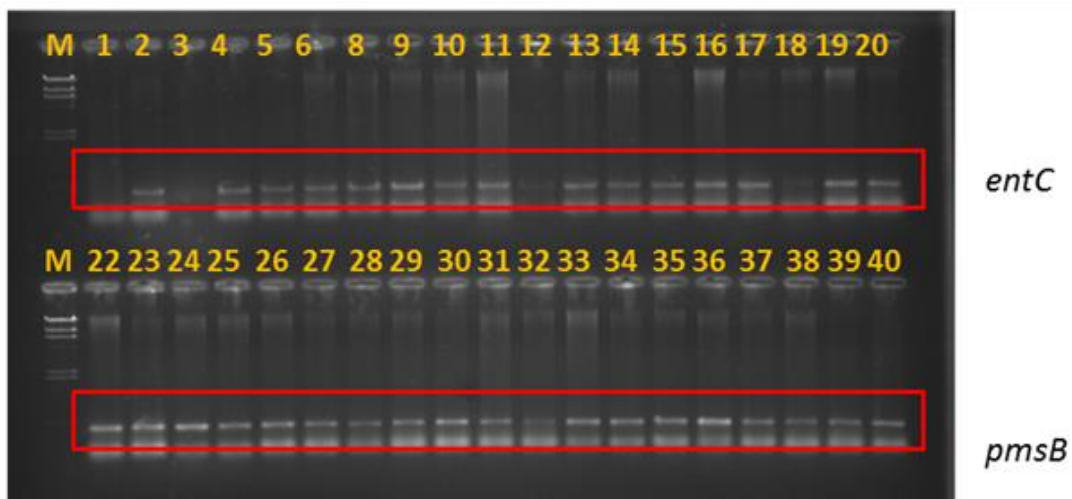
$$IP = \frac{\sum (ni \times zi)}{N \times Z} \times 100$$

Keterangan:

- SI = indeks keparahan
- IP = intensitas serangan penyakit
- n = jumlah tanaman
- z = indeks penyakit tungro
- N = total tanaman yang diamati
- Z = skala tertinggi indeks penyakit tungro

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis PCR dilakukan untuk mengetahui integrasi gen *entC* dan *pmsB* ke dalam genom tanaman pada generasi keempat (T3). Hasil PCR menunjukkan bahwa galur tanaman tersebut sudah homozigot, hal ini ditunjukkan dengan 8 galur yang diuji menghasilkan produk amplifikasi gen-gen *entC* dan *pmsB* sebesar 390 bp. Analisis molekuler berdasarkan PCR pada populasi tanaman T3 Rojolele hasil transformasi dengan gen *entC* dan *pmsB* menunjukkan bahwa transgen diwariskan stabil sampai ke generasi T3. Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan primer spesifik untuk gen *entC* dan *pmsB*. Keberadaan gen *entC* dan *pmsB* dalam genom dapat merupakan indikasi keberadaan gen target dalam satu T-DNA (Zaidi *et al.*, 2006).

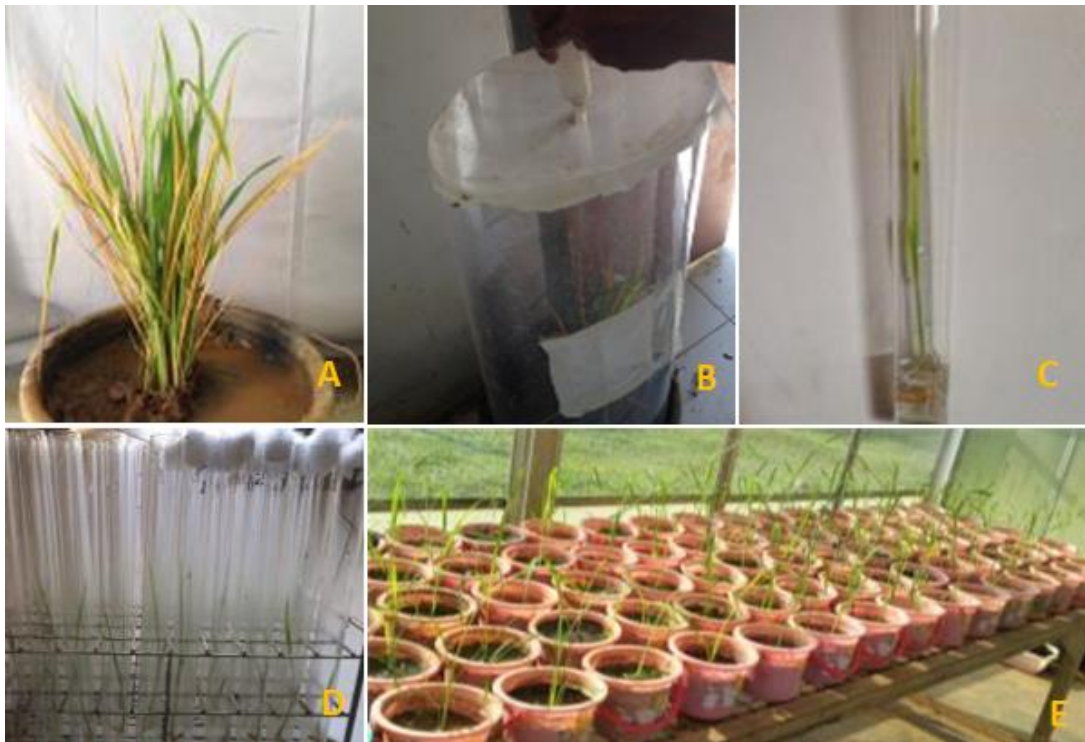


Gambar 1. Amplifikasi fragmen gen *entC* dan *pmsB* tanaman transgenik (T3) terpilih hasil transformasi dengan *A. tumefaciens* 1) Kontrol negatif tanaman yang tidak ditransformasi 2) Kontrol positif tanaman yang sebelumnya sudah diketahui positif *pmsB* 3) Kontrol air digunakan untuk memastikan bahwa reaksi tidak terkontaminasi, 4-20) sampel DNA tanaman dengan primer spesifik *entC*, 22-40) sampel DNA tanaman dengan primer spesifik *pmsB*

Untuk mengetahui tingkat resistensi tanaman transgenik terhadap penyakit tungro maka dilakukan bioasai terhadap 8 galur padi transgenik. Virus tungro yang digunakan dalam pengujian adalah strain virus yang menginfeksi varietas Ciharang yang dikoleksi dari Majalengka, Daun muda dari tanaman yang terinfeksi sering menunjukkan garis-garis hijau muda sampai putih dengan panjang yang bervariasi dan sejajar dengan tulang daun. Pada daun-daun yang

lebih tua sering terdapat bercak-bercak dengan berbagai ukuran yang berwarna merah karat, meski menunjukkan reaksi ketahanan yang berbeda-beda.

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa galur pAR_SA3 dan pAR_SA6 menunjukkan reaksi tahan dibanding galur lain dengan intensitas serangan yaitu 10-20% dengan skala keparahan 1, sedangkan galur pAR_SA1, pAR_SA4, pAR_SA7 dan pAR_SA8 menunjukkan intensitas serangan 30-60% dengan skala keparahan 1-5. Kontrol tahan yang digunakan pada percobaan adalah Utri merah dan kontrol rentan Pelita. Kontrol tahan menunjukkan intensitas serangan 10% dengan skala keparahan 1 dan kontrol rentan intensitas serangan 95% dengan skala keparahan mencapai 9 (Gambar 2 dan Tabel 2). Adanya peningkatan resistensi tanaman transgenik terhadap penyakit tungro mungkin disebabkan oleh adanya overekspresi *gen entC* dan *pmsB* penyandi jalur biosintesis asam salisilat (SA). Kandungan SA padi berperan dalam mekanisme pertahanan terhadap cekaman biotik. Padi mampu mempertahankan kandungan SA bebas yang cukup tinggi. Walaupun demikian, glukosil transferase padi terinduksi oleh pemberian SA dari luar. Aplikasi SA dan bakteri penghasil SA dari luar mampu meningkatkan sistem pertahanan terhadap serangan *Magnaporthe grisea* (Manandhar *et al.*, 1998) dan *Rhizoctonia solani* (Saikia *et al.*, 2006).



Gambar 2. A. Tanaman terinfeksi tungro, B. Inokulasi feeding, C. Akuisisi feeding, D. serangga vektor diinkubasi 24 jam pada tanaman uji, E. Tanaman positif terinfeksi tungro

Tabel 2. Hasil evaluasi ketahanan galur padi transgenik terhadap Tungro

No	kode Galur	Kejadian penyakit (DI. %)		Skala keparahan penyakit (SK)		Tingkat kekerdilan (%) **		Reaksi ***
		15 HST*	30 HST	15 HST	30 HST	15 HST	30 HST	
1	pAR_SA 1	20	30	1	5	10.7	28.6	R
2	pAR_SA 2	40	20	3	3	8.3	10.1	AR
3	pAR_SA 3	10	20	1	1	14.4	17.3	T
4	pAR_SA 4	40	40	3	1	4.8	12.5	AT
5	pAR_SA 5	10	10	3	1	13.8	7.6	AT
6	pAR_SA 6	10	10	1	1	10.1	15.9	T
7	pAR_SA 7	100	50	1	5	25.3	27.3	R
8	pAR_SA 8	60	60	5	1	15.0	10.2	AR
9	Kontrol tahan	10	10	1	1	12.8	10.2	T
10	Kontrol rentan	85	95	7	9	26.7	38.5	R

Keterangan: *HST: hari setelah tanaman, **Tingkat kekerdilan dihitung dari persentase tinggi tanaman terinfeksi dibanding tanaman kontrol setiap galur, ***R = rentan, AR = agak rentan, AT =Agak Tahan dan T= tahan

Mekanisme ketahanan tanaman terhadap penyakit dapat berupa ketahanan secara fisik maupun kimia. Salah satu bentuk ketahanan secara kimia adalah asam salisilat. Asam salisilat lebih dominan untuk mengatasi serangan patogen biotrof (patogen yang aktif pada jaringan hidup) dan virus. Pembentukan senyawa asam salisilat ini merupakan bentuk pengaktifan gen ketahanan pada tanaman akibat adanya gen pada patogen. Mekanisme ketahanan melalui jalur asam salisilat berhubungan dengan protein-protein yang terkait dengan patogenesis (*pathogenesis-related proteins* atau *PR proteins*) seperti kitinase, peroksidase, β -glukanase dan PR-1 (Sujatmiko *et al.*, 2012). Pada varietas yang resisten perubahan warna daun biasanya hanya pada sebagian helai daun dan tidak terdapat bercak klorotik pada permukaan daun. Pada perkembangan yang lebih lanjut gejala dapat hilang, sedangkan gejala terhambatnya pertumbuhan hampir tidak didapatkan (Ou, 1972).



Gambar 2. Hasil bioasai terhadap tungro, lingkaran merah merupakan daun yang terserang tungro, kotak merah menunjukkan serangan tanaman yang terserang tungro, kotak kuning kontrol tanaman rentan yang mati terserang tungro

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa galur-galur padi mengandung gen *entC* dan *pmsB* menunjukkan adanya peningkatan resistensi terhadap penyakit tungro. Galur pAR_SA3 dan pAR_SA 6 menunjukkan reaksi

bersifat tahan dengan intensitas serangan 10 dan skala keparahan 1. Sedangkan galur pAR_SA 1 dan pAR_SA 7 menunjukkan gejala rentan dengan intensitas serangan 30-50 untuk masing-masing dengan skala keparahan 9.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada saudari Rezky Yuanikha Nur Sushanty SP yang telah membantu dalam analisis molekuler, dan INSINAS Kementerian Riset, Teknologi dan Perguruan Tinggi yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Manandhar, H.K., H.J.I. Jorgensen, S.B. Mathur, P. Smedegard. 1998. Resistance to rice blast induced by ferric chloride, di-potassium hydrogen phosphate and salicylic acid. *Crop Protection* 17:323-329.
- Ou, S.H. 1972. *Rice Disease*. Commonwealth Mycological Institute. England: Kew Surrey.
- Saikia S., E.J. Parker, A. Koulman, B. Scott. 2006. Four gene products are required for the fungal synthesis of the indole diterpene, paspaline. *FEBS Lett.* 580:1625-1630.
- Silverman, P. 1995. Salicylic acid in Rice: Biosynthesis, conjugation and possible role. *Plant physiol.* 108:633-634.
- Sujatmiko, B., E. Sulistyarningsih, R.H. Murti. 2012. Studi Ketahanan Melon (*Cucumis Melo* L) Terhadap Layu Fusarium Secara In vitro dengan Asam Salisilat. *Ilmu Pertanian.* 15(2): 1-18.
- Suzuki, Y., I.G.N. Astika, I.K.R. Widrawan, I.G.N. Gede, R.I.N. Soeroto. 1992. Rice Tungro Disease transmitted by the *green leafhopper*. Its epidemiology and forecasting technology. *Japan Agricultura Research Quarterly* 26:98-104
- Verberne, M.C., R. Verpoote, J.F. Bol, J. Mercado-Blanco, H.J.M. Linthors. 2000. Overproduction Of Salicylic Acid In Plants By Bacterial Transgenes Enhances Pathogen Resistance. *Nature Biotech* 18: 779-783.
- Wildermuth, M.C., J. Dewdney, G. Wu, F.M. Ausubel. 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature.* 29: 414(6863):562-5.