

AKUMULASI PROLIN DAN INDEKS TOLERANSI KALUS PADI YANG DISELEKSI POLIETILEN GLIKOL (PEG) SECARA *IN VITRO* SEBAGAI MARKA TOLERANSI KEKERINGAN

Juswardi dan Nina Tanzerina
Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya

ABSTRACT

Proline accumulation and tolerance index in rice callus by in vitro selected on polyethylene glycol (PEG) as drought tolerance marker. The strain improvement of rice by in vitro has been done with selected callus rice on polyethylene glycol (PEG 6000). The research conducted to known proline accumulation and tolerance index in callus that selected by in vitro on PEG as tolerance index marker. Callus induced from endosperm of cultivars Rojolele rice on MS medium with $10^{-5}M$ 2,4-D. The selection of callus sub cultured step by step with add of PEG 250, 500, and 750 ppm on MS medium. Design of experiment used completely randomise design with two treatments that are selected callus and non selected callus, and 10 replications. The observed on callus weight and proline content. Data analysed by t test for proline content and tolerance index for callus weight. The result shown that non significant differ on proline content if compare selected callus to non selected callus respectively 105.12% and 100%. Tolerance index of selected callus not differ from non-selected callus. Proline accumulation and tolerance index not yet guarantee as tolerance marker to drought stress.

PENDAHULUAN

Padi, *Oryza sativa* L. adalah komoditas pertanian penting dan menempati posisi strategis dalam memenuhi kebutuhan, karena merupakan makan pokok sebagian besar penduduk. Sehingga produktivitas padi terus menerus menjadi perhatian yang serius. Oleh sebab itu pemerintah dalam setiap rencana pembangunan menempatan

pertanian khususnya padi pada skala prioritas utama pengembangan produktivitas.

Salah satu upaya untuk meningkatkan produktivitas padi di Indonesia adalah melalui program ekstensifikasi pada lahan-lahan kering. Menurut Prasetyo (1999) saat ini budidaya padi pada lahan kering mendapat perhatian yang lebih. Hal ini erat kaitannya dengan program pemberdayaan lahan kering. Upaya mengoptimalkan pemanfaatan lahan

kering untuk pengembangan padi memiliki keuntungan, yaitu ikut andil dalam usaha mempertahankan swasembada beras, mencegah erosi serta memperbaiki kondisi fisik dan kimia tanah.

Akibat sulitnya pengendalian variasi lingkungan di lapangan maka penelitian untuk mendapatkan varietas padi yang toleran kekeringan terus dikembangkan baik melalui persilangan maupun seleksi *in vitro* (kultur jaringan). Seleksi varietas padi toleran kekeringan dengan *in vitro* dapat lebih menguntungkan, diantaranya cekaman seleksi yang seragam pada populasi sel yang berjumlah jutaan untuk menghasilkan pinak tanaman.

Seleksi *in vitro* dapat dilakukan dengan penggunaan senyawa osmotik stress seperti poli etilen glikol (PEG) (Krizeck, 1985). Lebih lanjut Hedaryono dan Wijayani (1994) menyatakan bahwa penggunaan PEG sebagai osmotik stress sangat cocok digunakan dalam metoda seleksi *in vitro* untuk mendapatkan padi yang toleran kekeringan. Kunanuvachdaich *et al.* (1995) juga telah berhasil meregenerasi padi subspecies *indica* melalui seleksi 1000 ppm PEG 8000.

Selama kekeringan terjadinya akumulasi prolin sebagai adaptasi terhadap kekeringan tersebut karena prolin berperan penting dalam osmoregulasi. Pada tanaman gandum biosintesis prolin dapat digunakan untuk menduga sifat toleransi terhadap kekeringan (Bender, 1985). Hal yang sama terjadi pada tanaman tercekam salinitas (NaCl). Menurut Levit (1980) cekaman salinitas dapat menurunkan sintesis protein dan meningkatkan hidrolisnya. Meningkatnya hidrolis protein pada tanaman yang tersalinisasi sejalan dengan akumulasi produk hidrolisis yaitu asam amino.

Gzik (1996) menyatakan bahwa perbandingan antara prolin dan asam amino lainnya sangat berbeda. Akumulasi prolin dapat mencapai tingkat yang cukup tinggi hanya dalam jangka waktu yang singkat setelah induksi cekaman. Perbedaan toleransi antara tanaman toleran dan non-toleran dalam biosintesis prolin sangat beda. Biosintesis prolin ini ditujukan sebagai respons sel untuk mentolerir cekaman kekeringan.

Padi yang umum hidup di kepulauan Indonesia adalah subspecies *javanica* walaupun ada introduksi subspecies *indica* dan *japonica*. Varietas seperti Rojolele

merupakan padi sawah yang berproduksi cukup tinggi dan berkualitas baik, tetapi tidak dapat dibudidayakan di lahan kering. Apakah padi Rojolele yang diseleksi dengan PEG dapat menghasilkan padi toleran untuk dibudidayakan di lahan kering.

Penelitian ini bertujuan mengetahui akumulasi prolin dan indeks toleransi pada kalus padi hasil seleksi *in vitro* dengan PEG. Hasil penelitian ini diharapkan sebagai informasi dasar tentang akumulasi prolin dan indeks toleransi padi pada cekaman kekeringan, dan penelitian awal untuk mendapatkan padi berproduksi tinggi dan berkualitas baik yang dapat dibudidayakan di lahan kering

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan dari bulan Mei sampai Oktober 2002, bertempat di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sriwijaya.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah benih tanaman padi (*Oryza sativa* L.) kultivar rojolele, medium MS, 2,4D agar-agar,

alkohol 70%, alkohol 96%, formalin 4%, tween 20, aluminium foil, triton-x100, bufer fosfat, reagen ninhidrin, prolin, dan PEG 6000.

Alat yang dipakai dalam penelitian ini adalah timbangan analitik, mortal, cawan petri, sentrifugasi, spektrofotometer, gelas ukur, cuvet, tabung epperdoff, magnitic stirrer hot plate, bunsen, mortar, botol kultur, laminar air flow cabinet, lampu florescen dan mikro pipet.

Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan acak lengkap dengan 2 perlakuan yaitu kalus kontrol dan kalus seleksi PEG. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 10 kali.

Cara Kerja

Sumber eksplan yang digunakan

Sumber eksplan yang digunakan yaitu endosperm padi yang matang secara fisiologi. Padi dikupas sekamnya lalu disterilisasi dengan Na hipoklorit, alkohol 70% dan 96%, lalu dikultur pada medium MS.

Medium Kultur

Induksi kalus menggunakan medium dasar MS (Murashige & Skoog, 1962) yang ditambahkan 10^{-5} M 2,4D. Sedangkan seleksi menggunakan medium yang sama tetapi ditambah PEG.

Prosedur seleksi PEG

Seleksi kalus dilakukan dengan subkultur kalus hasil induksi pada medium MS yang ditambah PEG mulai 250, 500 sampai 750 ppm. Sel-sel kalus yang dapat merespons PEG pada medium akan tetap tumbuh dan berproliferasi, tetapi kalus yang bukan embriogenik dibuang. Sebagai kontrol kalus hasil induksi disubkultur pada medium MS tanpa penambahan PEG.

Ekstraksi kalus

Kalus yang diekstraksi sebanyak 100 mg dan dihomogenkan dalam 4 ml bufer fosfat 50 mM, pH 7,8 yang ditambahkan dengan 0,01 % triton -X100 dan 1 % PVP pada suhu 0° . Homogenat yang didapatkan disentrifugasi dengan kecepatan 8.000g pada suhu 0° C selama 15 menit. Supernatan yang didapat disimpan dalam Eppendorf pada suhu $0-4^{\circ}$.

Penentuan Kadar Prolin

Kadar prolin ditentukan berdasarkan pada metoda Bates *et al* (1973 dalam Cano *et al.*, 1998). Sebanyak 200 μ l sampel dicampur dengan volume yang sama dengan reagen ninhidrin. Reagen ninhidrin terdiri dari 1,25 mg ninhidrin, 30 ml asam asetat glasial, 20 ml H_3PO_4 6 M dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 100° C. Reaksi dihentikan dengan menempatkan cuvet yang berisi sampel dan reagen ninhidrin dalam air es. Kemudian 200 μ l campuran sampel dan reagen ninhidrin diinkubasi dalam 4000 μ l toluen selama 50 menit. Selanjutnya diukur absorbansi pada fasa toluen pada panjang gelombang 520 nm. Kadar prolin ditentukan dengan menggunakan kurva standar.

Penentuan Indeks Toleransi

Untuk menentukan indeks toleransi dilakukan penimbangan berat segar kalus. Indeks toleransi dihitung dengan menggunakan rumus (Cano *et al.*, 1998) :

Indeks toleransi =

$$\frac{\text{berat segar kalus pada seleksi PEG}}{\text{berat segar kalus pada perlakuan kontrol}} \times 100\%$$

Analisa Data

Kadar prolin dibandingkan antara kalus kontrol dan seleksi PEG dengan uji t pada α 0,05. Sedangkan indeks toleransi hanya membandingkan nilai indeks antara kalus seleksi PEG dan kalus kontrol.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Akumulasi prolin dan indeks toleransi kalus padi yang diseleksi polietilen glikol secara *in vitro* didapatkan hasil sebagai berikut :

Kadar Prolin

Kadar prolin kalus padi yang diseleksi PEG secara *in vitro* tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Kadar prolin kalus padi seleksi PEG secara *in vitro* sebagai marka toleransi kekeringan

Kalus	Kadar Prolin (nmol/g)
Tanpa seleksi (kontrol)	37,48
Seleksi PEG	38,57

Keterangan : t hit : 0,501; t α 0,05 : 2,109

Tabel 1. terlihat kadar prolin kalus padi yang diseleksi PEG lebih tinggi dari kalus yang tidak diseleksi. Tetapi pada uji t terdapat perbedaan yang tidak nyata antara kalus seleksi dengan non-seleksi PEG (t hit : 0,501 ; t tabel α 0,05 : 2,109). Hal ini sesuai dengan penjelasan Vajranabhaiah & Reddy (1994), dari 7 kultivar padi yang dikultur *in vitro* dengan penambahan PEG 6000 didapatkan kesimpulan bahwa pertumbuhan padi *in vitro* di bawah cekaman osmotik tidak menunjukkan kandungan prolin yang berbeda.

Tidak terdapat perbedaan akumulasi prolin dari kalus yang diseleksi dengan non seleksi PEG mungkin disebabkan beberapa hal. Diantaranya, selektor PEG dengan konsentrasi 750 ppm belum efektif untuk mendapatkan kalus toleran kekeringan. Hal ini disebabkan karena konsentrasi PEG 750 ppm tersebut masih rendah, sehingga kalus tidak dalam kondisi yang tercekam. Kalus padi Rojolele ini akan merespons cekaman jika konsentrasi PEG yang diberikan mendekati ambang maksimal untuk kisaran toleransi kalus.

Menurut Handa *et al.* (1982 dalam Suryowinoto, 1996) bahwa penambahan PEG

bertujuan untuk seleksi *in vitro* terhadap cekaman kekeringan. Kehadiran PEG dalam seleksi *in vitro* dapat menurunkan potensial air hingga mencapai sekitar -1,3 MPa. Potensial air yang rendah ini mengakibatkan tekanan turgor sel tumbuhan berkurang dan akan menghambat pertumbuhan selanjutnya. Tetapi pada penelitian ini potensial osmotik tidak mencapai atau mendekati -1,3 MPa.

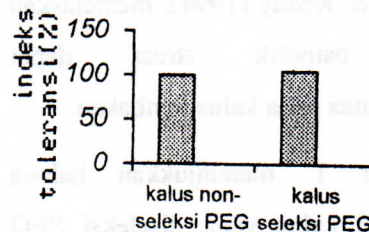
Penyebab lain diduga karena seleksi dilakukan secara bertahap yang dimulai dengan PEG 250, 500, sampai 750 ppm. Seleksi secara bertahap ini menyebabkan kalus beradaptasi pada PEG dan mengakibatkan sel-sel kalus tidak berada di bawah kondisi yang tercekam. Karena akumulasi prolin ini mungkin diikuti oleh perubahan fisiologi lainnya. Menurut Gzik (1996) bahwa prolin tidak hanya satu-satunya pengatur potensial osmotik. Senyawa-senyawa terlarut yang diakumulasi selama penyesuaian osmotik meliputi senyawa gula, asam organik, dan asam amino lainnya.

Prolin yang terakumulasi diduga hanya sebagai pencetus untuk akumulasi senyawa pengatur osmotik lainnya. Untuk itu juga perlu diamati senyawa gula, asam organik, dan asam amino lainnya. Hal lain

penting yang harus diperhatikan, aktivitas enzim biosintesis prolin seperti ornitin amino transferase, dan pyrrolin-5-karboksilat reduktase atau enzim degradasi prolin, prolin reduktase. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan ekspresi gen antara tanaman yang tercekam kekeringan dengan tanaman yang tidak tercekam.

Indeks Toleransi

Indeks toleransi kalus padi seleksi PEG secara *in vitro* didapatkan hasil seperti pada Gambar 1.



Gambar 1. Indeks toleransi kalus padi seleksi PEG secara *in vitro* sebagai marka toleransi kekeringan.

Berdasarkan perbandingan berat kalus yang dikultur pada medium seleksi PEG dengan medium tanpa PEG (kontrol), didapatkan indeks toleransi kalus seleksi PEG 105,12%. Indeks ini lebih besar dari indeks toleransi kalus non-seleksi PEG (100%).

Lebih besarnya indeks toleransi kalus seleksi PEG disebabkan karena kalus yang diseleksi PEG secara bertahap (mulai 250, 500, dan 750 ppm PEG), mampu beradaptasi terhadap kekeringan. Beberapa penelitian lain menunjukkan bahwa selain pengatur potensial osmotik, PEG juga digunakan untuk induksi pertumbuhan dan perkembangan tanaman secara *in vitro*. Menurut Kimball *et al.* (1975 dalam Kunanuvachaidach *et al.* 1995) bahwa substansi osmotik stress dapat meningkatkan pertumbuhan kalus kacang hijau. Brown & Thorpe (1980) dalam Vajranabhaiah & Reddy (1994), menjelaskan penggunaan osmotik stress dapat menginduksi tunas pada kalus tembakau.

Gambar 1. menunjukkan bahwa indeks toleransi kalus yang diseleksi PEG lebih besar dari kalus non-seleksi (kontrol). Hal ini disebabkan oleh seleksi PEG dilakukan secara bertahap yang dimulai dengan konsentrasi 250, 500, dan 750 ppm. Kalus yang telah melalui tahapan seleksi tersebut mampu tumbuh lebih baik karena kalus memberikan respons terhadap perubahan potensial osmotik medium yang semakin kecil. Menurut George & Sherington (1984), biasanya potensial air

medium lebih besar dari air yang masuk ke dalam sel. Konsentrasi osmotik medium kultur akan mempengaruhi pembelahan sel dan kesuksesan morfogenesis sel dan jaringan.

Hal lain mungkin disebabkan karena perubahan potensial osmotik medium yang tidak terlalu besar. Pada kalus non-seleksi, kondisi lingkungan terutama potensial osmotik medium sesuai dengan keadaan sel kalus karena penggunaan sukrosa yang berfungsi sebagai sumber karbon juga berfungsi sebagai pengatur osmotik medium. Pada kondisi ini kalus non-seleksi pertumbuhannya optimal tetapi berada dalam fase relaksasi.

Berbeda dengan kalus yang diseleksi dengan PEG, kalus dihadapkan pada kondisi yang kurang menguntungkan. Untuk itu kalus memresponsnya dengan mengubah metabolisme, yang diakhirnya mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan kalus. Akibatnya pertumbuhan kalus seleksi lebih baik dibandingkan kalus non-seleksi. Hal ini terjadi karena konsentrasi osmotik PEG yang digunakan untuk seleksi masih rendah sehingga kurang efektif. Menurut Kunanuvachdaich *et al.* (1995) untuk seleksi

digunakan 1000 ppm PEG 8000 tetapi pada penelitian ini hanya menggunakan 750 ppm PEG 6000.

Pada penelitian ini tidak dilakukan uji toleransi kalus terhadap PEG sehingga indeks toleransi maupun akumulasi prolin belum dapat digunakan untuk menentukan toleransi kalus terhadap kekeringan. Sebaiknya kalus hasil seleksi maupun non-seleksi PEG diuji toleransinya dengan membandingkan kalus yang disubkultur pada medium PEG lebih tinggi dengan kalus pada medium tanpa PEG. Pengujian biasanya menunjukkan bahwa kalus kalus yang toleran tetap mempertahankan pola pertumbuhan dan habituasi.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan penelitian tentang akumulasi prolin dan indeks toleransi kalus padi yang diseleksi polietilen glikol dapat diambil simpulan dan saran sebagai berikut :

Simpulan

Akumulasi prolin kalus padi yang diseleksi PEG berbeda tidak nyata dibandingkan kalus non-seleksi PEG dan

indeks toleransi yang hampir sama. Sehingga akumulasi prolin dan indeks pertumbuhan belum dapat digunakan sebagai marka toleransi kekeringan jika tidak dilakukan uji toleransi.

Saran

Penelitian selanjutnya akan dilihat kemampuan regenerasi kalus hasil seleksi PEG dengan 3 tahap subkultur untuk membentuk pinak tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

- Bender, D.A. 1985. *Amino Acid Metabolism*. Second Edition. Courtauld Institute of Biochemistry The Middlesex Hospital Medical School. London. : 460
- Cano, E.A., Alfocea, F.P., Moreno, V., Caro, M., dan Bolarin, M.C. 1998. Evaluation of Salt Tolerance in Cultivated and Wild Tomato Species Through in vitro Shoot Apex Culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Academic Publishers Planted in the Netherlands. 53 : 19 - 26
- George E.F. & P.D. Sherington. 1984. *Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories*. Exergetic Limited Press. London.

- Gzik, A. 1996. Accumulation of Proline and Pattern of α -Amino Acids in Sugar Beet Plants in Response to Osmotic, Water and Salt Stress. *Environmental and Experimental Botany*. 36 (1) : 29 – 38
- Hendaryono, S.P.D. & A. Wijayani. 1994. *Teknik kultur jaringan : Pengenalan dan petunjuk perbanyakan tanaman secara vegetatif*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta : 134.
- Krizeck, D.T. 1985. Methodes of incluing water stress in plant *Horticulture Science*. 20 : 10Please do not use illegal software...29-1035
- Kunanuvachaidach, R., I.D. Godwin & S.W. Adkins. 1995. High effeciency plant regeneration from callus induce on mature *indica* rice cariosis. *Aust. Jur. Bot.* 43 : 337 – 348
- Levitt, J. 1980. *Responses of Plants to Environmental Stresses*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida: 497
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay tabacco tissu culture. *Physiol Plant*. 15: 473 - 479
- Prasetyo, Y.T. 1999. *Bertanam padi gogo tanpa olah tanah*. Penerbit Penebar Swadaya. Jakarta : 65 .
- Suryowinoto, M. 1996. *Pemulian tanaman secara in vitro*. Cetakan ke-2. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Vajranabhaiah, S.N. & P.C. Reddy. 1994. Varieted responses of upland rice calli to polyethylene glycol (PEG 6000) stress. *Jurnal article in plant science & (1)* : 12 –17.